

# UFRB

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

ALISON EDUARDO MELO DA PAIXÃO

Estudos genéticos em *Kalyptodoras bahiensis*, capturada na bacia do médio e baixo Paraguaçu-BA, através de marcadores citogenéticos e moleculares.

Cruz das Almas – BA

2010

**ALISON EDUARDO MELO DA PAIXÃO**

**Estudos genéticos em *Kalyptodoras bahiensis*, capturada na bacia do médio e baixo Paraguaçu-BA, através de marcadores citogenéticos e moleculares.**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientador: Profa. Dr. Soraia Barreto Aguiar Fonteles

**Cruz das Almas – BA**

**2010**

P149 Paixão, Alison Eduardo Melo da.

Estudos genéticos em *Kalyptodoras bahiensis*, capturada na bacia do médio e baixo Paraguaçu-BA, através de marcadores citogenéticos e moleculares. / Alison Eduardo Melo da Paixão. Cruz das Almas - Ba, 2010.

60f.; il.

Orientador: Soraya Barreto Aguiar Fonteles.

ALISON EDUARDO MELO DA PAIXÃO

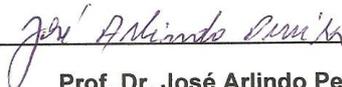
**Estudos genéticos em *Kalyptodoras bahiensis*, capturada na bacia do médio e baixo Paraguaçu-BA, através de marcadores citogenéticos e moleculares.**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi submetido à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

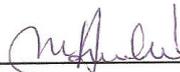
Aprovada em 06/12/2010



**Profa. Dr. Soraia Barreto Aguiar Fonteles**  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



**Prof. Dr. José Arlindo Pereira**  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



**Profa. Dr. Maria Vanderly Andréa**  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

"A fé em Deus nos faz crer no incrível, ver o invisível e realizar o impossível."

(autor desconhecido)

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por permitir meu “crescimento”;
- Em especial a minha professora – orientadora Soraia Barreto Aguiar Fonteles, pelo conhecimento e oportunidades oferecidas, além do auxílio nesse estudo. ”Obrigado pela oportunidade, carinho e amizade”;
- A Patrícia Reis, por colaborar com meu aprendizado e auxílio nesse trabalho;
- A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), que me acolheu e me proporcionou a realização deste sonho;
- Aos Professores da UFRB, pelo conhecimento transmitido, sem esse conhecimento hoje não seria quem sou;
- Aos meus amigos, Luiz Gustavo, Ebimael Paz (Você estará sempre aqui comigo!), e aos demais, pelo apoio nos momentos mais difíceis pelos quais passei nessa caminhada;
- Aos meus colegas de graduação, pela força, determinação, companheirismo e vitória que alcançamos juntos nessa trajetória;
- Aos meus pais, José e Teresinha, por ter gerado essa pessoa que hoje sou;
- A minha namorada Wanessa, pelo esforço, compreensão e por estar ao meu lado em todos os momentos;
- Aos meus irmãos, Adson, Cláudia, Kelly, Junior e Verena, por todos os momentos e pela força que até hoje me oferecem;
- Aos moradores que residem as margens do Paraguaçu, que muito contribuíram com sua luta e resistência, “nosso rio merece respeito”;
- A todos aqueles que de alguma forma participaram, colaboraram e apoiaram na realização desse trabalho e do meu aprendizado.

## RESUMO

A bacia do Rio Paraguaçu - BA tem sido alvo de diversas ações antrópicas, a principal delas foi a construção de 17 barramentos ao longo do rio. O barramento de um rio provoca notáveis alterações na comunidade aquática, em especial sobre a ictiofauna. As respostas da fauna aquática neotropical e as modificações hidrológicas proporcionadas pelos barramentos não estão ainda completamente claras. As peculiaridades da fauna local, características do reservatório, o desenho da barragem, procedimentos operacionais, usos da bacia, natureza do solo, vazão e interações resultantes entre estas variáveis constituem uma amostra dessa complexidade. Esse fato associado a grande influência provocada pela degradação que os mananciais aquáticos vêm sofrendo e a grande exploração das espécies que neles habitam, fazem dos estudos genéticos uma importante ferramenta para auxiliar na identificação de espécies e no monitoramento das variações genéticas ocorridas em estoques pesqueiros. *Kalyptodoras bahiensis* é um bagre da família doradidae endêmica do rio Paraguaçu – BA e encontra-se atualmente ameaçada de extinção devido às mais diversas atividades antrópicas realizadas. O presente trabalho foi realizado do período de Janeiro a Outubro de 2010 e teve como propósito caracterizar a *Kalyptodoras bahiensis*, através de marcadores citogenéticos clássicos (Giemsa) e marcadores genético-moleculares (ISSR), conhecendo o número cromossômico e a variabilidade genética intra e interpopulacional da espécie. Foram coletadas amostras de 121 animais para as análises morfológicas e 15 animais para análises citogenéticas em cinco pontos distribuídos ao longo do médio e baixo Paraguaçu. Os marcadores moleculares utilizados apresentaram bandas principais monomórficas e bandas secundárias polimórficas, caracterizados da seguinte forma: GGAC – três padrões; AAGC – quatro padrões; e, TAGG – dois padrões. *Kalyptodoras bahiensis* possui  $2n=58$  cromossomos tanto para os exemplares machos quanto para fêmeas. Estes resultados corroboram com os descritos na literatura, onde o menor número diplóide encontrado é  $2n=42$ , e o maior é  $2n=62$  para o gênero Siluriforme. O resultado é reafirmado com dados apresentados na literatura para a família Doradidae onde observa-se a manutenção do número diplóide de  $2n=58$  nas espécies estudadas. Com esse estudo foi possível concluir que *Kalyptodoras bahiensis* não apresentou variação significativa no padrão cromossômico espécie-específico, indicando que o foi mantido sem grandes alterações quando comparados com outros representantes da família Doradidae. Embora preliminar, esse estudo define o perfil genético da peracuca para três marcadores genéticos nucleares e sugere níveis de diversidade molecular intrapopulacional, a qual é de grande importância na manutenção da viabilidade e sobrevivência da espécie. Esse material servirá como um importante instrumento, podendo definir uma política de monitoramento e conservação do patrimônio genético de *Kalyptodoras bahiensis*.

Palavras chave:

Barramento, Exploração, Extinção, Número cromossômico, Patrimônio Genético.

## ABSTRACT

The Paraguaçu River Basin has been the target of various human actions, the main one was the construction of 17 dams along the River. The peculiarities of the local fauna, characteristic of the reservoir, dam design, operational procedures, uses of the basin, the nature of the soil, resulting flow and interactions between these variables constitute a sample of this complexity. This fact associated with the great influence that the degradation caused and the great exploitation of the species that inhabit them make the genetic studies an important tool to help species identification and monitoring of genetic variations occurring in fish stocks. *Kalyptodoras bahiensis* is a catfish of Doradidae's family endemic of the Paraguaçu river and is currently threatened with extinction due to various anthropic activities. This study was conducted from January-October 2010 and aimed to characterize the *Kalyptodoras bahiensis* through classical cytogenetic markers (Giemsa) and molecular-genetic markers (ISSR), knowing the chromosome number and genetic variability of the intra and inter species. Samples were collected from 121 animals for morphological and cytogenetic analysis for 15 animals at five sites distributed along the middle and lower Paraguaçu. Molecular markers used showed major bands monomorphic and polymorphic bands secondary, characterized as follows: GGAC - three patterns; AAGC - four patterns, and TAGG - two patterns. *Kalyptodoras bahiensis* presents  $2n = 58$  chromosomes for both males and for female specimens. These results agree with those described in the literature, where the lower number is diploid  $2n = 42$  and  $2n = 62$  is higher for the genus *Siluriforme*. The result is confirmed with the literature data to the family Doradidae where there is the maintenance of the diploid number of  $2n = 58$  in the studied species. With this study we concluded that *Kalyptodoras bahiensis* showed no significant variation in the species-specific chromosome pattern, indicating that the chromosomal number was maintained without major changes when compared with other representatives of the family Doradidae. Although preliminary, this study defines the genetic profile for three genetic markers and suggests levels of intrapopulation molecular diversity, which is of great importance in maintaining the viability and survival of the species. This material will serve as an important tool and may define a way for monitoring and conservation of the genetic heritage of *Kalyptodoras bahiensis*.

Keywords:

Bus, Exploration, Extinction, Number of Chromosomes, Genetic Heritage.

## LISTA DE FIGURAS:

**Figura 01** – Mapa evidenciando algumas barragens propostas na bacia do rio Paraguaçu.

**Figura 02** - Área de Proteção Ambiental do Lago de Pedra do Cavalo – 2007.

**Figura 03** - Área de Preservação Permanente do Lago de Pedra do Cavalo – 2007.

**Figura 04** – Início das obras da Barragem de Pedra do Cavalo – BA. 1979.

**Figura 05** – Comportas e tomadas d'água - Obras da Barragem de Pedra do Cavalo – BA. 1979.

**Figura 06** - Complexo de Abastecimento de Pedra do Cavalo – BA- 2007.

**Figura 07** - *Kalyptodoras bahiensis* (peracuca).

**Figura 08** – Pontos de coleta ao longo do rio Paraguaçu: 1 -Fazenda Palma, 2 - Bandeira de Melo, 3 – Igrejinha, 4 - Rafael jambeiro, 5 - Fazenda Touros.

**Figura 09** – Banco de tecido da *Kalyptodoras bahiensis*.

**Figura 10** - Banco de DNA preservado.

**Figura 11** – Padrões de bandeamento da *Kalyptodoras bahiensis* com os primer AAGC.

**Figura 12** – Padrões de bandeamento da *Kalyptodoras bahiensis* com os primer TAGG.

**Figura 13** – Padrões de bandeamento de duas populações da *Kalyptodoras bahiensis* com o primer GGAC.

**Figura 14** – Metáfase da *Kalyptodoras bahiensis* corada com prata.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01:** Pontos de coleta apresentando as respectivas coordenadas geográficas em SAD-69.

**Tabela 02:** Máxima e mínima concentração e pureza de DNA dentre as 121 amostras.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**APA** - Área de Proteção Ambiental

**APP** - Área de Preservação Permanente

**CONAMA** - Conselho Nacional de Meio Ambiente

**CRA** - Centro de Recursos Ambientais

**EMBASA** - Empresa Baiana de Águas e Saneamento

**IBAMA** - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**ISSR** - *Inter Simple Sequence Repeat*

**MMA** - Ministério do Meio Ambiente

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction*

**SPAR** - *Single Primers Amplifications Reactions*

**UFRB** - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

## RELAÇÃO DE ANEXOS

**Anexo 01** – Localização da bacia hidrográfica do rio Paraguaçu - Bahia .

**Anexo 02** – Material estocado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Anexo 03** – Banco de DNA preservado em freezer.

**Anexo 04** – Tabela apresentando dados das Amostras de *Kalyptodoras bahiensis* capturadas ao longo do rio Paraguaçu - Ba, com as respectivas localidades e coordenadas.

## SUMÁRIO

<b>1.0. Introdução</b>	<b>14</b>
<b>2.0. Revisão de literatura</b>	<b>16</b>
2.1. Área de Estudo	16
2.2. A ordem Siluriforme	24
2.3. Família Doradidae	26
2.4. Estudos Genéticos	28
<i>Estudos Citogenéticos e Moleculares</i>	29
<i>Ictiogenética</i>	30
<b>3.0. Justificativa</b>	<b>31</b>
<b>4.0. Objetivos</b>	<b>32</b>
4.1. Objetivo Geral	32
4.2. Objetivos Específicos	32
<b>5.0. Material e Métodos</b>	<b>32</b>
5.1. Espécimes coletados	32
5.2. Análise com marcadores genético - moleculares	34
<i>Extração do DNA total</i>	34
<i>Amplificação e Primers</i>	34
5.3. Análise com marcadores Citogenéticos	35
<b>6.0. Resultados e Discussão</b>	<b>37</b>
<b>7.0. Conclusão</b>	<b>43</b>
<b>8.0. Considerações Finais</b>	<b>44</b>
<b>9.0. Referências Bibliográficas</b>	<b>45</b>
<b>10. Anexos</b>	<b>54</b>

## 1.0 Introdução

A Bacia do Paraguaçu é conhecida por ser uma das mais estratégicas do Estado da Bahia. 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. Abrange uma área de 54.877 km<sup>2</sup>, dos quais 317 km<sup>2</sup> correspondem à massa de água (IBGE, 1993, p.11). Seu comprimento é de aproximadamente 360 km com largura média em torno de 200 km e sua forma é retangular alongada. (<http://arquivomunicipaldesaofelix.blogspot.com/2010/05/rio-paraguacu-e-sua-historia.html>). As peculiaridades da fauna local, características do reservatório, o desenho da barragem, procedimentos operacionais, usos da bacia, natureza do solo, vazão e interações resultantes entre estas variáveis são fatores que constituem uma amostra da complexidade desta bacia.

A grande influência provocada pela degradação que os mananciais aquáticos vêm sofrendo e a grande exploração das espécies que neles habitam, fazem dos estudos genéticos uma importante ferramenta para auxiliar na identificação de espécies e no monitoramento das variações genéticas ocorridas em estoques pesqueiros. Esses conhecimentos são dados indispensáveis em programas de conservação, a fim de evitar o declínio da variabilidade genética e o desaparecimento de espécies nativas.

Diante disso, vários trabalhos estão sendo realizados com esse enfoque nas últimas décadas (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1998; FERNANDES – MATIOLI; ALMEIDA TOLEDO, 2001; FONTELES - SANTOS *et al.*, 2008; HERBK; FARIAS, 2008; ALVES - COSTA *et al.*, 2008; SOFIA, *et al.*, 2008; ORTÍ, *et al.*, 2008; BARBOSA, *et al.*, 2005).

Dentre estes trabalhos, podemos citar estudos genético-bioquímicos, citogenéticos e estudos moleculares como auxiliares na formação e acompanhamento de Bancos Genéticos Preservados “*in vitro*”, “*in situ*” e “*ex situ*”. Esses Bancos têm sido destacados, nos últimos anos, por se constituir um acervo de material genético importante no intuito de conhecer e preservar o potencial genético das populações selvagens. Com isso os órgãos competentes têm acesso a

dados referentes à variabilidade genética das populações que existem nas regiões de estudo, podendo tornar esse local uma área de preservação ambiental, conservando o patrimônio genético das populações nativas.

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 pertencem. 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.

Os peixes constituem um dos grupos de vertebrados 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).

Devido ao grande número de espécies e por apresentarem características biológicas particulares, além de ocuparem uma posição central na evolução dos vertebrados, os peixes constituem um dos melhores grupos para estudos genéticos, citogenéticos e evolutivos (ALMEIDA-TOLEDO, 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, não somente sobre o número e fórmula cromossômica, mas também 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.

De acordo com Sá *et al.* (2003,) a ictiofauna vêm passando por um processo rápido de extinção por causa da deterioração de ambientes aquáticos, em especial no caso de córregos e riachos das cabeceiras de rios maiores. Devido as ações antrópicas, a extinção de espécies de peixes endêmicas, está aumentando na mesma proporção da destruição dos ecossistemas aquáticos.

Segundo Agostinho (2005), as principais causas da perda direta da biodiversidade em ecossistemas aquáticos continentais brasileiros são poluição, eutrofização, assoreamento, construção de barragens, pesca e introdução de espécies. As ameaças aos ecossistemas aquáticos variam consideravelmente em

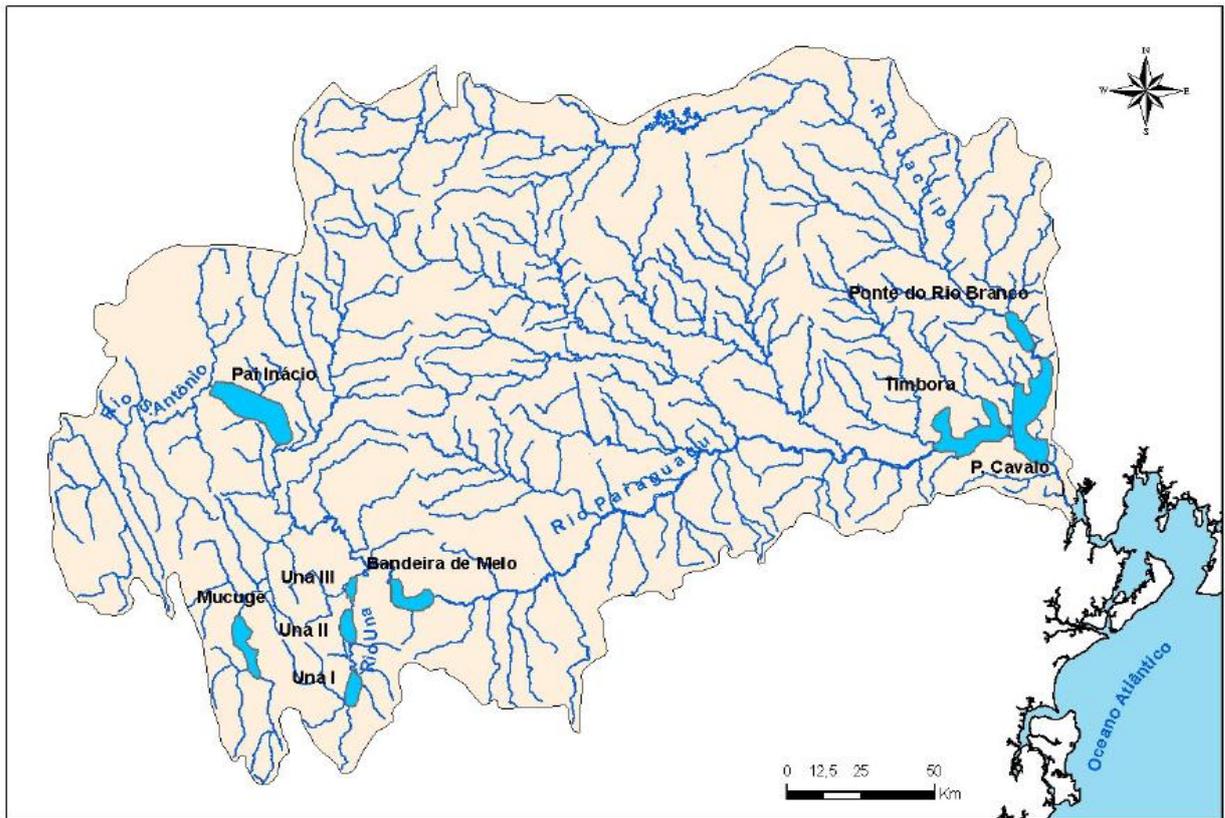
número e importância de acordo com as diferentes regiões do Brasil levando em consideração a densidade populacional humana, o uso do solo e as características socioeconômicas predominantes.

Diante a problemática do desaparecimento de espécies, muitos estudos estão sendo desenvolvidos com o propósito de conhecer grupos ameaçados, podendo assegurar a conservação e o manejo das regiões consideradas de riscos. Estudos genéticos, utilizando como ferramenta a genética molecular e a citogenética, são considerados de grande valia para a realização de trabalhos com o propósito de preservação biológica.

## **2.0 Revisão de literatura**

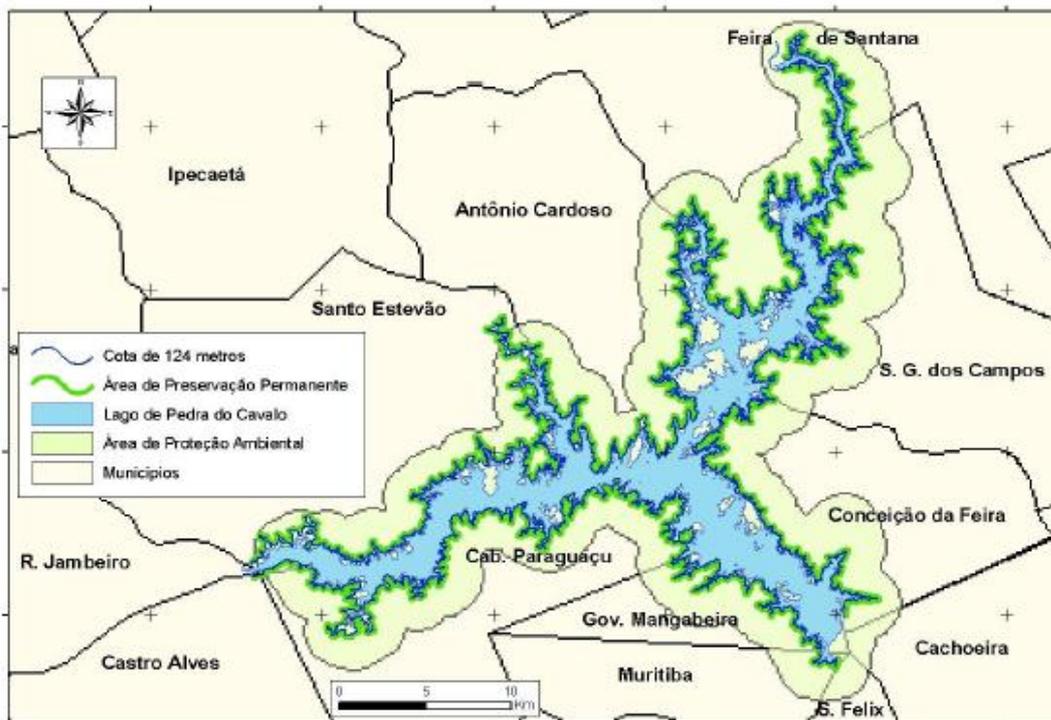
### **2.1 Área de Estudo**

A bacia do rio Paraguaçu - BA tem sido alvo de diversas ações antrópicas sendo a principal delas a construção de 17 barramentos ao longo do rio (Figura 01). O barramento de um rio provoca notáveis alterações na comunidade aquática, em especial sobre a ictiofauna. As respostas da fauna aquática neotropical e as modificações hidrológicas proporcionadas pelos barramentos não estão ainda completamente claras. A complexidade dada pelos inúmeros fatores envolvidos determina a dificuldade de previsão dos impactos. Os crimes ambientais tornam-se cada vez mais frequentes. Diversos ambientes naturais estão sendo devastados devido à ações antrópicas, podemos citar a destruição de matas ciliares de rios, reservatórios, bacias, etc.

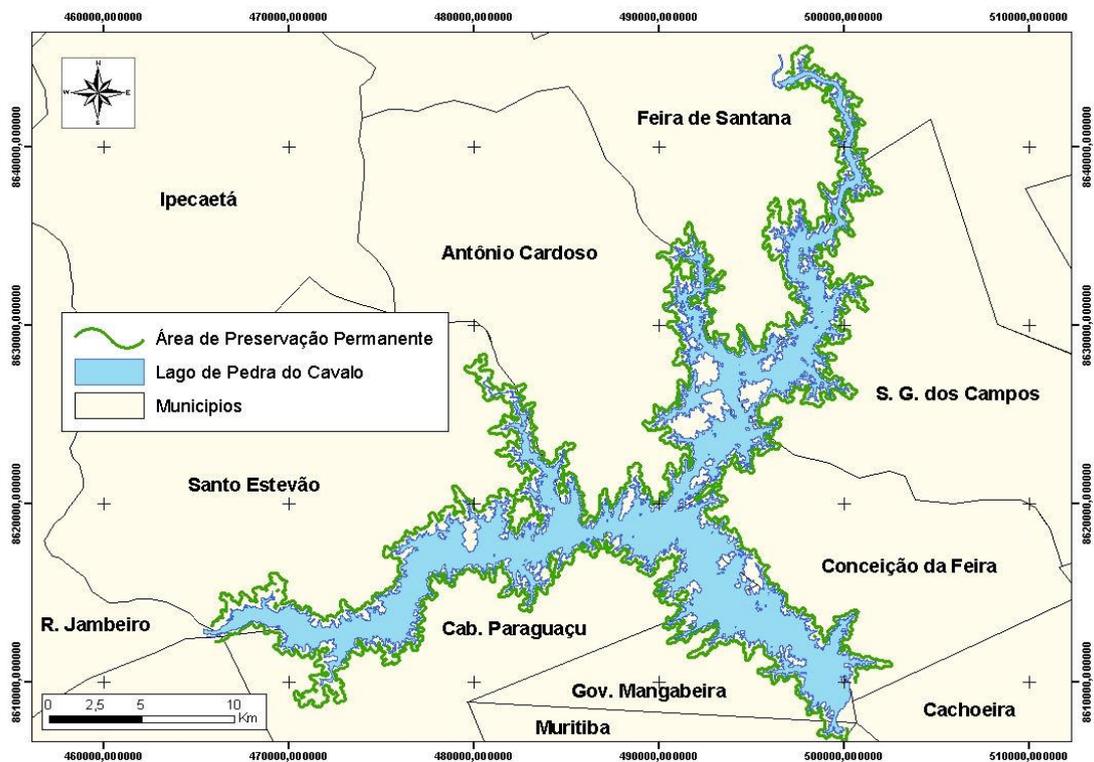


**FIGURA 01** – Mapa evidenciando algumas barragens propostas na bacia do rio Paraguaçu. Fonte: Plano de Valorização dos recursos hídricos da bacia do rio Paraguaçu - Bahia (1974) Elaborado por PALMA, E.G.A. (2007)

O Paraguaçu possui uma Área de Proteção Ambiental (APA) com cerca de 30.156 ha (Figura 02), e Área de Preservação Permanente (APP) com cota máxima maximorum de 124 m em linha horizontal (Figura 03). Esse contexto segue a Resolução do CONAMA 302 e 303 de 20 de março de 2002 que dispõe sobre os parâmetros, definições e limites de Área de Preservação Permanente de reservatórios artificiais e o regime de uso do entorno e sobre os parâmetros, definições e limites de Área de Preservação Permanente, respectivamente. Segue também a Resolução CONAMA 369 de 28 de março de 2006 que dispõe sobre os casos excepcionais, de utilidade pública, interesse social que possibilitam a intervenção ou supressão de vegetação em Área de Preservação Permanente – APP.



**FIGURA 02** - Área de Proteção Ambiental do Lago de Pedra do Cavalo – 2007.  
 Fonte: SRH (2004), SEI (2002), Brasil (1985) e Bahia (1997). Elaboração: PALMA, E.G.A. e ALMEIDA, R. A (2007).



**FIGURA 03** - Área de Preservação Permanente do Lago de Pedra do Cavalo – 2007.  
 Fonte: SRH (2004) , SEI (2002) e BRASIL (1985). Elaboração: PALMA, E.G.A. e ALMEIDA, R. A (2007).

O DECRETO Nº 6.548 DE 18 DE JULHO DE 1997, Art. 1º, relata: Fica criada a Área de Proteção Ambiental - APA do Lago de Pedra do Cavalo, nos Municípios de Conceição de Feira, Cachoeira, Antônio Cardoso, Santo Estevão, Governador Mangabeira, Castro Alves, Cruz das Almas, Feira de Santana, Muritiba, São Félix e São Gonçalo dos Campos, tendo como limite a faixa com largura de 2.000 (dois mil) metros, medida a partir da faixa de proteção de 100 (cem) metros, estabelecida pela Resolução nº 004/85, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE a maioria do território que inclui o rio Paraguaçu encontra-se situada na região da Chapada Diamantina. A Bacia do Paraguaçu abrange partes de cinco municípios, alguns deles considerados de importância histórica, como Mucugê e Andaraí, criados no período áureo da exploração de diamante, na década de 1840. A região é ocupada por uma população de aproximadamente 18.292 habitantes e abrange uma área de aproximadamente 2.561km<sup>2</sup>, que representa 5% do total da área da Bacia do Rio Paraguaçu, o mais importante conjunto hidrográfico internamente localizado no Estado da Bahia.

O Rio Paraguaçu é exclusivamente baiano, é o maior rio que corta a Bahia, possui nascentes diamentíferas e margens bastante férteis, devido ao solo massapé (solo constituído a partir da decomposição de rochas com características minerais de gnaisses de tonalidade escura, calcários e filitos)" <http://www.brasilecola.com/brasil/tipos-solo-brasil.htm>"), esse solo é principalmente encontrado no litoral do nordeste, é bastante escuro e rico em húmus. O Paraguaçu já foi a principal via de transporte e comunicação para toda a Região, nele é encontrada uma grande diversidade ictiológica, o que faz do rio um grande gerador de renda para a região através da pesca.

Ele nasce no município de Barra da Estiva que fica situado na região da Chapada Diamantina, segue em direção norte passando pelos municípios de Ibicoara, Mucugê e até cerca de 5km a jusante da cidade de Andaraí, quando recebe o rio Santo Antônio. Muda de direção em seu curso para oeste e leste, servindo como divisor entre os municípios de Itaeté, Boa Vista do Tupim, Marcionílio Souza, Itaberaba, Iaçú, Argoim, Santa Teresinha, Antônio Cardoso, Castro Alves, Santo Estevão, Cruz das Almas, Governador Mangabeira, Cabaceiras do Paraguaçu, Conceição da Feira, Muritiba. Após a barragem da Pedra do cavalo

encontra as cidades de São Felix e Cachoeira, desembocando logo depois na Baía de Todos os Santos entre os municípios de Maragogipe e Saubara.

O rio Paraguaçu possui cerca de 600 km de extensão, mas só é navegável em seu baixo curso, que vai da foz até as cidades de São Félix e Cachoeira. O traçado dele é orientado por estruturas geológicas ocorrentes na sua extensão, notadamente em seu alto curso, onde atravessa áreas de rochas tassedimentares cujas falhas e fraturas facilitam o encaixamento dos vales (IBGE, 1993).

Os principais afluentes do Paraguaçu são os rios Capivari, Santo Antônio, Tupim, e Jacuípe. Alguns afluentes são periódicos, com regime torrencial em época de chuvas, essa torrencialidade interfere no regime do rio, o que no passado provocou diversas enchentes provocando diversos transtornos nas cidades de Cachoeira e São Felix, assim como para outras cidades ao longo do curso do rio.

Segundo o Centro de Recursos Ambientais - CRA (2001), as águas do rio Paraguaçu e afluentes são utilizados no abastecimento público, doméstico e industrial, geração de energia, esportes náuticos no estuário e na barragem de pedra do cavalo, além de corpo receptor de efluentes. Na utilização do solo citam a agropecuária, pastagem e pecuária (bovino, equinos, caprinos, etc. associada à agricultura e ao extrativismo, exploração mineral), ferrovias e rodovias, atividades industriais, comerciais e turísticas. Além da aquicultura que vem se disseminando consideravelmente e abastecimento industrial, não citado pelo CRA.

As atividades ocorrentes na região como a agropecuária e o extrativismo vegetal, por exemplo, o desmatamento, a utilização de agrotóxicos, as atividades urbanas, como lançamento inadequado de resíduos sólidos e de esgotos domésticos, e a demasiada exploração dos recursos hídricos, vêm cada vez mais degradando o rio, destruindo a imensidão de recursos benéficos que esse oferece. Podemos destacar as posições de Rocha (2007) sobre a utilização indiscriminada dos bens naturais:

[...] A história humana tem sido marcada pela utilização dos recursos naturais e intervenção do ser humano no mundo natural. Contudo, durante milhares de anos a ação antrópica causou, essencialmente, efeitos em escala local, mantendo a capacidade auto - regeneração dos recursos naturais renováveis. Pode-se afirmar que os principais problemas ambientais (catástrofes naturais) com que as comunidades se defrontavam, revelavam um temor reverencial profundo pelas

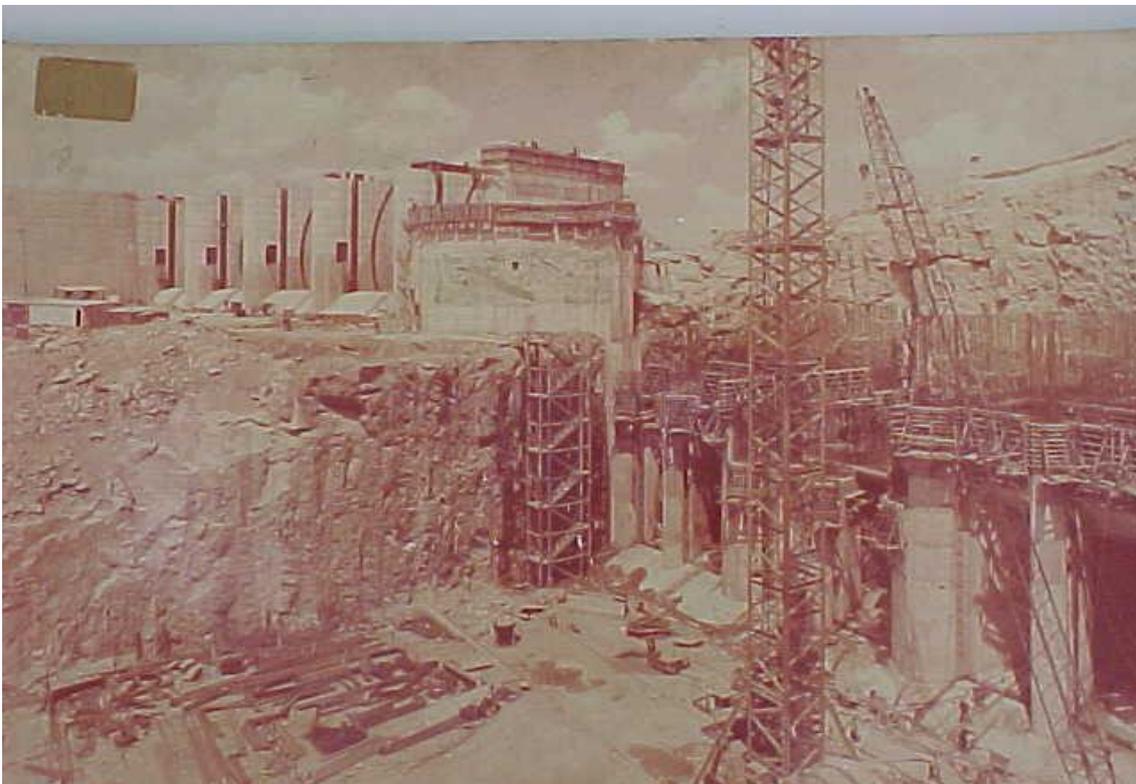
manifestações da natureza. Nesse sentido, o ser humano somente gradualmente foi conseguindo aplacar e dominar o ambiente. Contudo, após a emergência da industrialização, da produção em massa, e das modificações tecnológicas, foram produzidos impactos ambientais com capacidade para interferir seriamente na vida planetária, verificando-se um crescimento vertiginoso da intensidade e exploração da natureza. [...] (ROCHA, 2007, p. 15)

Apesar de gerar emprego e renda, essas empresas vêm trazendo uma série de problemas para a região, elas despejam dejetos muitas vezes tóxicos que acarretam uma imensidão de problemas, a água fica contaminada, a fauna e flora local morrem, e o ser humano também sofre com enfermidades podendo ocasionar até morte como já relatado por pescadores e moradores circo vizinhos (Comunicação pessoal).

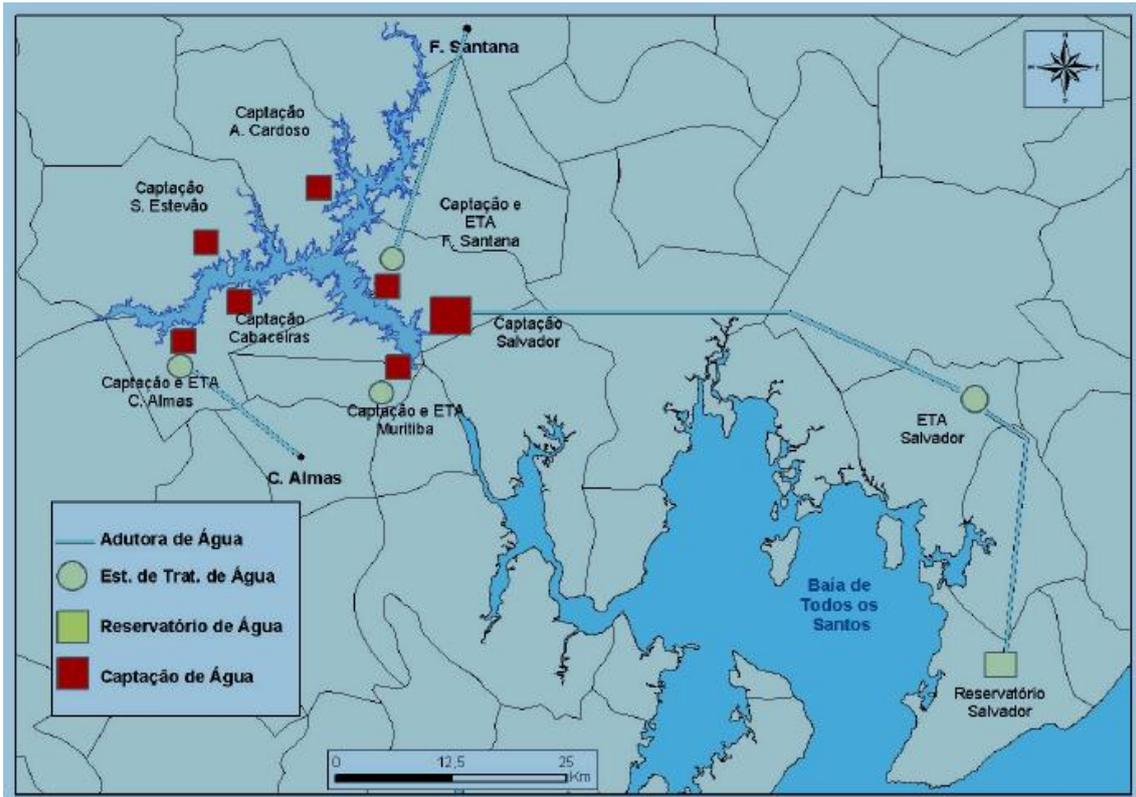
Após a construção da barragem de Pedra do Cavalo (figuras 04 e 05) na década de 80, ocorreram diversas mudanças no regime hidrológico local, até início de 2005 as águas da barragem eram utilizadas pela EMBASA para o abastecimento humano dos municípios circo vizinho e a grande metrópole Salvador (Figura 06). Essa barragem também era utilizada para contenção das cheias nas cidades de Cachoeira e São Felix, o rio começou a ser utilizado para outros fins, como: gerador de energia elétrica, com capacidade de gerar 165,3 MW, para isso a descarga de vazão pelas turbinas variavam entre 40 e 160 m<sup>3</sup>/s. No início de 2007 foi mudada a operação da barragem devido as condições estabelecidas pela licença ambiental de operação, mantendo uma vazão mínima de 11 m<sup>3</sup>/s.



**FIGURA 04** – Início das obras da Barragem de Pedra do Cavalho – BA. 1979.  
Elaboração PALMA, E.G.A. (2007)



**FIGURA 05** – Comportas e tomadas d'água - Obras da Barragem de Pedra do Cavalho – BA. 1979.  
Elaboração PALMA, E.G.A. (2007)



**FIGURA 06** - Complexo de Abastecimento de Pedra do Cavalo – BA- 2007.  
 Fonte: BAHIA (1974), SRH (2004) e SEI (2002).

É inegável a influência que esse barramento causou no rio Paraguaçu e no rio Jacuípe. Podemos destacar a problemática de aumento do espelho d'água, a mudança entre o antigo e o atual leito, a capacidade de contenção de água do atual e do antigo reservatório, e por fim, o aumento da capacidade hidráulica para geração de energia. Isso surtiu numa gama de mudanças neste ambiente. A mata ciliar foi alagada, animais tiveram que se refugiar em outros locais, além da grande problemática de peixes migradores. Esses não puderam mais descer ou subir o rio no seu período reprodutivo, fazendo com que diversas espécies desaparecessem das proximidades do barramento Santos (2005).

[...] é mister conhecer bem o território para nele agir. É necessário conhecer para gerir, não só o recurso natural, mas também aqueles que nele vivem. O geógrafo Milton Santos (1996), ao propor o espaço geográfico como uma indissociável de sistemas de objetos e ações, nos mostra que tanto o meio natural (rochas, rios, florestas) quanto o meio antrópico (casas, vilas, cidades), fazem parte de um mesmo sistema que é comandado pela vida social e cultural de cada

território, isto é, os mecanismos de gestão passam pelo conhecimento, e também pela ação das instituições, dos grupos econômicos, dos grupos sociais e culturais que vivem e interagem neste lugar, no sentido de legitimar a posse e o uso dos recursos naturais por parte daqueles que estão no Espaço Geográfico (Estado, empresas, ONGs, comunidades, grupos culturais). [...] (PALMA, 2003, p. 26 e 27).

A região Neotropical possui uma grande rede hidrográfica com uma ictiofauna de água doce grandiosa e extremamente variada (REIS *et al.*, 2003). Dentro dessa rede encontra-se o rio Paraguaçu com sua grande diversidade ictiológica, com espécies de peixes pertencentes principalmente às ordens Characiformes e Siluriformes, onde pode-se destacar: *Cichla spp.* (tucunarés), *Hoplias spp.* (traíras) e *Leporinus spp.* (piaus), no baixo curso podem ser encontrados *Dicentrarchus spp.* (robalos) e *Mugil spp.* (tainhas), além das espécies de camarões *Litopenaeus Vannamei* (camarão-branco-do-pacífico) e *Macrobrachium Amazonicum* (camarão-da-amazônia).

## 2.2 A ordem Siluriforme

Os Siluriformes compreendem uma vasta quantidade de espécies, que se distribui pelas regiões tropicais do planeta (BURGESS, 1989; TEUGELS, 1996 e FERRARIS, 2007), essa ordem é foco de vários estudos, e está compreendida dentro da Superordem Ostariophysi, ela contém 5 grupos, 63 famílias, 1.000 gêneros e 6.500 espécies (NELSON, 2006). Em sua maioria os representantes habitam as águas doces das regiões tropicais, existindo uma família ocorrente na América do Norte, Ictaluridae (GREENWOOD *et al.*, 1966), e duas com representantes marinhos, Ariidae e Plotosidae (LOWE-MCCONNELL, 1975), além de algumas famílias, como por exemplo a Auchenipteridae e a Aspredinidae que habitam ambientes estuarinos (PINNA, 1998).

Segundo Britski *et al.*, 1988, os Siluriformes são facilmente identificados, eles possuem características morfológicas distintas. Não possuem escamas, o corpo nu, envolvido por pele espessa e coberto totalmente ou parcialmente por placas ósseas, suas nadadeiras são bem separadas e constituídas por raios, no primeiro raio das nadadeiras peitorais e dorsal existe um acúleo forte e pontiagudo. Também

possuem uma nadadeira adiposa bem desenvolvida e geralmente possuem três pares de barbilhões sensitivos (MEES, 1974).

Os Siluriformes são animais que habitam regiões escuras entre rochas nos fundos dos rios, com algumas exceções, seu tamanho é variado assim como sua forma (Ferraris, 2007). Os peixes desse grupo são conhecidos como bagres, eles possuem grande importância tanto para a pesca comercial como de subsistência, e vem sendo explorados há várias décadas (Ferreira, 2008).

Apesar da importância científica e econômica dos Siluriformes, o grupo apresenta diversos problemas sistemáticos e taxonômicos. Mesmo o consenso geral de que a família Diplomystidae constituiria o grupo irmão de todos os outros Siluriformes, tem sido questionado com base em dados moleculares (SULLIVAN *et al.*, 2006). 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. Sullivan e colaboradores (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. *apud* Ortiz (2008).

No Brasil os primeiros estudos genéticos envolvendo os Siluriformes foram realizados por Toledo e Ferrari (1976a, b), os quais analisaram espécies pertencentes aos gêneros *Pimelodella*, *Rhamdia* e *Pimelodus*. Ainda hoje são poucos os dados citogenéticos existentes para essa ordem, e poucas famílias possuem cariótipo determinado.

Informações que envolvem dados genéticos para a ordem Siluriforme no rio Paraguaçu são inexistentes, devido a isso se faz necessário iniciar e expandir estudos envolvendo grupos de peixes nesta bacia.

### 2.3 Família Doradidae

Os peixes da família Doradidae pertencem à ordem siluriforme, e compreendem uma família de bagres de água doce, endêmica da América do Sul, e podem ser separados em dois grupos segundo a presença de barbilhão no maxilar, simples ou ramificado. Estes animais são reconhecidos como um grupo monofilético, cujas relações intra-genericas são pouco definidas (ORTIZ, 2008).

Estes animais são caracterizados pela presença de uma série de placas ósseas ao longo da linha lateral, cobrindo-a total ou parcialmente, em alguns casos estas placas ósseas estão restritas à base da nadadeira caudal ou à região logo após a cabeça. Popularmente os representantes deste grupo são conhecidos como bacu, cuiu-cuiu, armado, abotoado, serrudo, etc. (FENOCCHIO *et al.*, 1993). Estes peixes são algumas vezes chamados peixes-gato, devido a habilidade em produzir sons movendo suas nadadeiras peitorais ou vibrações com sua bexiga natatória, característica compartilhada com algumas outras famílias de Siluriformes com as quais guardam diferentes níveis de relações de parentesco. O estudo das relações de parentesco entre as diferentes famílias de Siluriformes, e também 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 pertencentes a essa família possuem hábitos alimentares bastante variados, eles são onívoros, e grande parte alimenta-se de invertebrados encontrados nos fundos lodosos, outros consomem frutas e folhas, moluscos, larvas de insetos e caranguejos (PINNA, 1998). Sua boca encontra-se localizada inferiormente e não possuindo dentes, seu focinho é alongado e tem a função de capturar os alimentos. As espécies desta família podem ser encontrados em vários habitats, incluindo matas inundadas, lagos de várzea e canais quando os cardumes sobem os rios ([http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/pesca\\_esportiva\\_em\\_agua\\_doce/abot\\_oado\\_-\\_oxydoras\\_spp.html](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/pesca_esportiva_em_agua_doce/abot_oado_-_oxydoras_spp.html)).

A família Doradidae compreende mais de 80 espécies e cerca de 30 gêneros:

*Acanthodoras, Agamyxis, Amblyodoras, Anduzedoras, Anodoras, Astroadoras, Centrochir, Centrodoras, Doraops, Doras, Franciscodoras, Hassar, Hemidoras, Hypodoras, Kalyptodoras, Leptodoras, Lithodoras, Megalodoras, Nematodoras, Opsodoras, Orinocodoras, Oxyodoras, Physopyxis, Platyodoras, Pterodoras, Rhinodoras, Scorpioras, Stenodoras, Trachydoras e Wertheimeria.* (PINNA, 1998).

*Kalyptodoras bahiensis* (Figura 07), é um bagre da família *Doradidae*, conhecido popularmente como peracuca. É uma espécie monotípica, encontrada principalmente no médio curso do rio Paraguaçu - BA, encontra-se atualmente relacionada como espécie ameaçada de extinção de acordo com a instrução normativa de n 5 do IBAMA, de 21 de maio de 2004. A espécie somente foi observada a partir de exemplares coletados durante a pré-construção da barragem de Pedra do Cavalo no baixo curso do rio, e desde então suas populações vêm apresentando uma diminuição em seus estoques naturais (SANTOS, 2005). Devido a esse declínio, estudos relacionados com sua biologia, ecologia e genética tem sido levados a efeito no intuito de colaborar em ações de sua preservação e manejo dos estoques. As ameaças de extinção são provenientes da intensa pesca predatória aliada construção de barragens ao longo do curso do rio.



**FIGURA 07 - *Kalyptodoras bahiensis* (peracuca).**

A morfologia dessa espécie é peculiar, seu corpo é recoberto por pele, possuem uma fileira de placas ósseas laterais ao longo do corpo com 4-6 raios na nadadeira dorsal com um espinho na raia anterior (primeira) e 3 pares de barbilhões, podendo alcançar no máximo 80 cm de comprimento descrito principalmente, para o baixo curso do rio Paraguaçu (HIGUCHI *et al.*, 1990).

De acordo com Livro Vermelho vol. II, (MMA e Fundação Biodiversitas, 2008) por meio da Instrução Normativa nº 3 (2003) e nº 5 (2004), a *Kalyptodoras bahiensis* é uma espécie relativamente rara, endêmica do 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 de grandes correntes Machado *et al.*, (2008). Por esse motivo, o represamento de alguns trechos do rio pode ter causado a extinção dessa espécie nestas áreas. O trecho médio do rio Paraguaçu apresenta-se relativamente bem preservado. A poluição das águas e a destruição da vegetação ripária marginal podem ter efeitos negativos na população desta espécie. Outra preocupação é a introdução de espécies como o tucunaré (*Cichla sp.*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*), espécies atualmente disseminadas na bacia do Paraguaçu que competem naturalmente com as populações naturais.

### **2.3 Estudos Genéticos**

Os trabalhos de genética com peixes podem resolver questões estruturais de populações selvagens e até mesmo cultivadas em diversas espécies, como por exemplo, a taxa de diferenciação e variabilidade genética, estudos de migração e tamanho de populações, sucesso reprodutivo, dentre outros. Esses estudos são de grande interesse, pois podem ser realizados projetos com intuito de conservação desses recursos naturais, verificando as variações genômicas, em respostas ambientais, principalmente as de origem antropogênica (SILVESTRE MARQUES, 2002).

No Brasil os estudos genéticos em peixes encontram - se em plena expansão. O grande potencial em diversidade de espécies encontradas, juntamente com o avanço nos estudos genômicos, tornaram mais frequentes modelos de estudo utilizando a ictiofauna (MARTINS, 2009).

Os peixes possuem características biológicas únicas dentre os vertebrados, a enorme biodiversidade que se traduz em uma vasta variação de habitats, hábitos alimentares e reprodutivos, apresenta o grupo como um potencial objeto de estudos e pesquisas aplicadas. Possuem uma grande importância nas diversas regiões do mundo, tanto na pesca, quanto na aquicultura envolvendo ainda aspectos da conservação e preservação da biodiversidade aquática. Estudos citogenéticos e moleculares são ferramentas valiosas e podem auxiliar no conhecimento da ictiofauna e suas relações e em programas de conservação dos recursos pesqueiros (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1992b; WARD; GREWE, 1994).

### *Estudos Citogenéticos e Moleculares*

Os estudos de citogenética começaram no século XVII, após a invenção do microscópio, esses estudos indicaram a existência de unidades elementares nos seres vivos, o que veio a desenrolar a teoria celular proposta em 1850, que dizia que os seres vivos são formados células e produtos celulares. Entre 1850 e 1900 ocorreu um grande avanço nas pesquisas dos constituintes celulares e de seus processos biológicos, nesse período foram descritos os processos mitóticos e meióticos.

Na maioria dos estudos citogenéticos realizados em peixes são utilizadas técnicas básicas, como coloração convencional por Giemsa, detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) por impregnação por nitrato de prata e bandeamento C. Mas existem alguns entraves, a utilização de bandeamentos cromossômicos neste grupo animal é considerado mínimo, isso quando comparamos com os demais grupos de vertebrados. Este fato é devido as dificuldades na obtenção dos resultados (GOLD *et al.*, 1990), os cromossomos apresentados por este grupo são de tamanho reduzido, e com grau de compartimentalização diferenciado (PENDÁS *et al.*, 1994). Apesar das dificuldades, vários resultados, quando interpretados do ponto de vista evolutivo, concebem uma importantes ferramentas para elucidar os processos evolutivos que ocorrem nos diferentes grupos de peixes (SOUZA *et al.*, 1996).

Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como por exemplo, um segmento específico de DNA. A função de um

marcador pode ser ou não conhecida, assim como a sequência de nucleotídeos. Esses marcadores são muito utilizados para caracterizar o genótipo de um determinado indivíduo a partir de amostra de células ou tecidos.

Os marcadores moleculares são co-dominantes, e contém sua maior quantidade de informação por loco, já os marcadores morfológicos em sua maioria são dominantes ou recessivos (Tanksley, 1983a,b; Beckman; Soller, 1983; Burr *et al.*, 1983; Stuber, 1992).

Na década de 80, uma nova tecnologia foi criada: PCR (*Polymerase Chain Reactio*) – reação de polimerase em cadeia (MULLIS; FALOONA, 1987), essa técnica foi revolucionária em diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais. A PCR sintetiza milhões de cópias de um segmento específico de DNA e baseia – se no anelamento de pequenas moléculas de DNA de fita simples utilizando *primers* para delimitar a sequência de DNA de fita dupla.

*Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) ou *Single Primers Amplifications Reactions* (SPAR), é uma técnica molecular baseada em amplificações de DNA via PCR, empregando um único *primer* com sequência repetitiva de um microsatélite. Os *primers* são marcadores estáveis com sequências tetranucleotídicas e são bastante eficientes na produção de informações sobre padrões polimórficos intraespecíficos e interespecíficos ( GUPTA *et al.*, 1994; FERNANDES – MATIOLI, 1999).

Para a utilização desses marcadores, não se faz necessário o conhecimento prévio sobre a sequência de DNA, eles geram um alto grau de polimorfismo com a utilização de uma pequena quantidade de DNA por reação, devido a isso eles são muito utilizados nos estudos genéticos.

### *Ictiogenética*

Estudos estruturais de peixes possuem fundamental importância, eles elucidam várias respostas para diversos fatores, como a desestruturação ou degradação de uma determinada espécie ou até populações.

Segundo Toledo Filho *et al.*, (1992), os marcadores genéticos-bioquímicos e morfogenéticos são os mais utilizados atualmente em estudos genéticos. O sequenciamento do DNA traz diversas vantagens, eles utilizam marcadores

moleculares, como por exemplo, scn DNA, mt DNA, microssatélites multilocos, esse último é constituído por duas a várias centenas de cópias de DNA, para estudos de linhagens comerciais, estruturação populacional de peixes, mapeamento genômico, estudo de conservação, dentre outros. Esses marcadores possuem características excelentes, são abundantes no genoma, altamente polimórficos, apresentam herança mendeliana, além de serem co-dominantes e utilizar a técnica PCR, sendo necessário pouca quantidade de DNA para as análises.

O progresso da ictiologia neotropical está amplamente reconhecido, ele é dependente do inventário biótico de áreas pobremente amostradas para identificação da diversidade de peixes (SCHAEFER, 1998). Amostragens devem ser feitas em regiões de cabeceira, pois lá habitam várias espécies de pequeno porte, com restrição em sua distribuição geográfica. Nesses locais ocorrem um endemismo acentuado, ou seja, com ocorrência exclusiva de um táxon em uma localidade ou região particular. (MENEZES *et al.*, 1990; BUCKUP, 1998; CASTRO, 1999; MENEZES, 1998). Devido ao baixo interesse econômico e distribuição geográfica, pouca atenção é voltada para os animais de pequeno porte (BÖHLKE *et al.*, 1978; VARI; MALABARBA, 1998; LOWE- MC CONNELL, 1987, 1999).

Esse estudo, embora preliminar, define o número cromossômico e o perfil genético molecular da *Kalyptodoras bahiensis* para três marcadores genéticos nucleares (ISSR), AAGG, TAGG e GGAC.

### **3.0 Justificativa**

O desenvolvimento desta pesquisa se justifica por ser promovida em um rio exclusivamente baiano, de grande importância econômica e ecológica para a região em que se encontra. Este estudo possui um caráter pioneiro, buscando informações relevantes a cerca da caracterização e variabilidade genética intra e interpopulacional de *Kalyptodoras bahiensis*, que se encontra na lista de espécies em extinção, podendo posteriormente fornecer dados para políticas de conservação e administração de suas populações..

## 4.0 Objetivos

### 4.1 Objetivo Geral

No presente trabalho foram aplicadas metodologias genéticas com o objetivo de caracterizar a *Kalyptodoras bahienses*, espécie ameaçada de extinção, fornecendo assim subsídios básicos para o conhecimento, preservação e conservação genética da espécie.

### 4.2 Objetivos Específicos

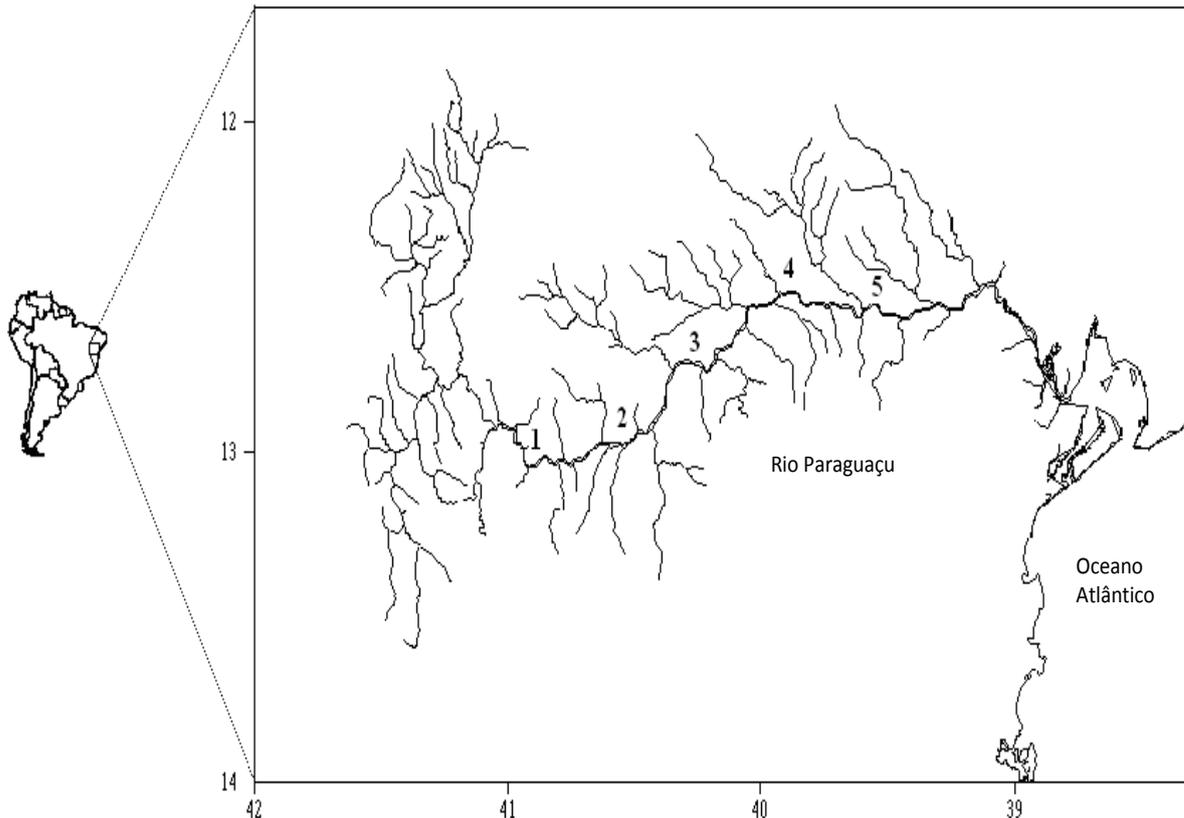
- ✓ Criar um banco de DNA preservado “in vitro” de *Kalyptodoras bahienses*, reunindo em um acervo material a ser utilizado em futuros estudos de caracterização e conservação genética de populações nativas desta bacia hidrográfica
- ✓ Caracterizar a *Kalyptodoras bahienses*, através de marcadores citogenéticos clássicos (Giemsa), conhecendo o número cromossômico da espécie.
- ✓ Caracterizar a *Kalyptodoras bahienses*, através de marcadores genético - moleculares (ISSR).
- ✓ Analisar a variabilidade genética intra e interpopulacional da espécie.

## 5.0 Material e Métodos

### 5.1 Espécimes coletados

O trabalho foi realizado no período de Fevereiro a Outubro de 2010, nele foram coletados um total de 121 exemplares de *Kalyptodoras bahiensis* em 5 expedições de coleta na porção do médio e baixo Paraguaçu, que compreende desde o município de Itaête até o município de Cabaceiras do Paraguaçu. Em cada ponto de coleta foi feito o georreferenciamento através de GPS modelo GARMIM e Trex Legend. De cada ponto de coleta (Ponto 1 -Fazenda Palma, Ponto 2 -Bandeira de Melo, Ponto 3 – Igreja, Ponto 4 - Rafael jambeiro, Ponto 5 - Fazenda Touros, (Figura 08), foi preservado um espécime inteiro para posterior identificação. Para as análises citogenéticas três exemplares foram trazidos

vivos de cada coleta e mantidos sob aeração constante em bombonas até a utilização nas análises citogenéticas.



**FIGURA 08** – Pontos de coleta ao longo do rio Paraguaçu: 1 -Fazenda Palma, 2 - Bandeira de Melo, 3 – Igreja, 4 - Rafael Jambeiro, 5 - Fazenda Touros.

De todos os indivíduos amostrados foi retirada uma porção de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de tecido da nadadeira caudal, tecido de baixo risco, ou seja que não envolve o sacrifício do animal. Esse material foi acondicionado em tubos tipo Eppendorf, devidamente identificado e estocado em álcool etílico comum (92,8°), na proporção de 1:3, em temperatura ambiente. Ao final da coleta, o material foi levado para laboratório, retirado uma porção do tecido amostrado e separado para o banco de tecidos. Com o material restante foi dado prosseguimento às extrações de DNA.

O material para as análises moleculares e citogenéticas foram trazidos para o Laboratório de Ictiogenética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), onde se procederam as análises.

## 5.2 Análise com marcadores genético - moleculares

### *Extração do DNA total*

Em laboratório, 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 100µl de tampão TE (tris-EDTA) e deixado no banho-maria a 37°C, durante 24 horas, para diluir o DNA. No dia seguinte, o material diluído foi levado ao espectrofotômetro modelo Bioespecto SP22 para medir a concentração e o grau de pureza. Todo material foi rotulado e estocado em freezer a – 20°C. Esse material faz parte do acervo de banco genético “in vitro” de amostras do Paraguaçu.

No dia seguinte, o material diluído foi levado ao espectrofotômetro modelo Bioespecto SP22 para medir a concentração e o grau de pureza. A concentração e a qualidade do DNA isolado também foram avaliadas em gel de agarose 1,0%.

### *Amplificação e Primers*

Os padrões de amplificação de fragmentos de DNA flanqueados por sequências repetitivas foram obtidos através do emprego da técnica de SPAR-PCR (*Single Primer Amplification Reaction - Polymerase Chain Reaction*), proposta por GUPTA e colaboradores (1994). O DNA total foi submetido à PCR, empregando-se *primers* tetranucleotídico de sequência repetitiva simples, selecionados a partir de testes preliminares com um total de oito *primers* diferentes, a saber: (TAGG)<sub>4</sub>, (GGAC)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub>, (GGAT)<sub>4</sub>, (AAGC)<sub>4</sub>, (CACT)<sub>4</sub>, (GGGT)<sub>4</sub>, e (AACC)<sub>4</sub>. O DNA molde (5-10 ng) foi amplificado, em um volume final de 30 µL contendo:

- 10mM Tris-HCl, pH 8,4,
- 50 mM KCl,
- 5,0 mM MgCl<sub>2</sub>,
- 100 µM de cada dNTP,
- 5pmol de *primers*
- 1,25 unidade de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies)

A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® Mastercycler Gradient. Esse processo foi realizado em alguns ciclos e em cada ciclo, inicialmente o DNA foi desnaturado em elevada temperatura, em seguida a temperatura foi baixada, onde se permitiu o anelamento do *primer* (58° C) em regiões homólogas encontradas no genoma. Logo em seguida a temperatura foi elevada, permitindo assim a atuação da Taq polimerase e a síntese de polinucleotídeo complementar em 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 é iniciado e novamente os componentes são misturados. Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação: 15 ciclos de 45 s a 94 °C, 60 s a 58 °C e 60 s a 72 °C, e 20 ciclos de 45 s a 94 °C, 60 s a 57 °C e 60 segundos a 72 °C. totalizando 35 ciclos. 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 foram fotografados em sistema de fotodocumentação de gel.

### 5.3 Análise com marcadores Citogenéticos

As preparações citológicas para estudo de cromossomos metafásicos somáticos utilizadas como base para o presente trabalho, se deu a partir das células do rim (anterior e posterior) obtidos, “in vivo” dos animais coletados, uma vez que o rim possui função hematopoiética, apresentando assim, 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. Foi preparada uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7 ml de água destilada.
2. Ela foi incubada em banho-maria a 37°C por cerca de 20 minutos.

3. A solução foi injetada dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1ml para cada 100g de peso do animal.

4. O animal foi deixado em aquário bem aerado por 48 horas.

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

1. Injetar intraperitonealmente, fermento biológico. Deixá-lo nadando livremente em aquário com aeração por aproximadamente 24 a 48 horas.

2. Sacrificar o animal, retirando uma porção anterior e posterior do rim.

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 centrífuga. Deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por cerca de 15 minutos.

8 Retirar e por 10 minutos na centrífuga 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 vezes.

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 6ml de fixador, ressuspender por 100 vezes e por 6 minutos na centrifuga a mesma velocidade.

20 Repetir o item 17 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 foi utilizada a técnica básica de coloração por Giemsa e prata.

## 6.0 Resultados e Discussão

Foram realizadas coletas dos indivíduos em cinco pontos de amostragem na bacia do Paraguaçu - BA para o estudo da espécie. Os pontos de amostragem foram marcados com GPS e estão em anexo (Tabela 01). Foram amostrados 27 indivíduos na Fazenda Palmas, 27 em Bandeira de Melo, 28 em Igrejinha, 9 em Rafael Jambeiro e 30 na fazenda Touros, totalizando 121 exemplares (Anexo 04).

	A	B	C	D	E	F
1	Localidades/ coordenadas	Fazenda Palma	Bandeira de Melo	Igrejinha	Rafael jambeiro	Fazenda Touros
2	Latitude	12° 56'42,03"	13°02'08,63"	13° 01' 28,10"	12° 32' 13,33"	12° 41' 24,30"
3	Longitude	40° 28'59,14"	40°48'39,02"	40° 40' 52,98"	39° 48' 13,72"	40° 07' 01,10"

**Tabela 01- pontos de coleta:** Dados das Amostras de *Kalyptodoras bahiensis* capturadas ao longo do rio Paraguaçu - Ba, com as respectivas localidades e coordenadas: **Coordenadas Geográficas em SAD-69.**

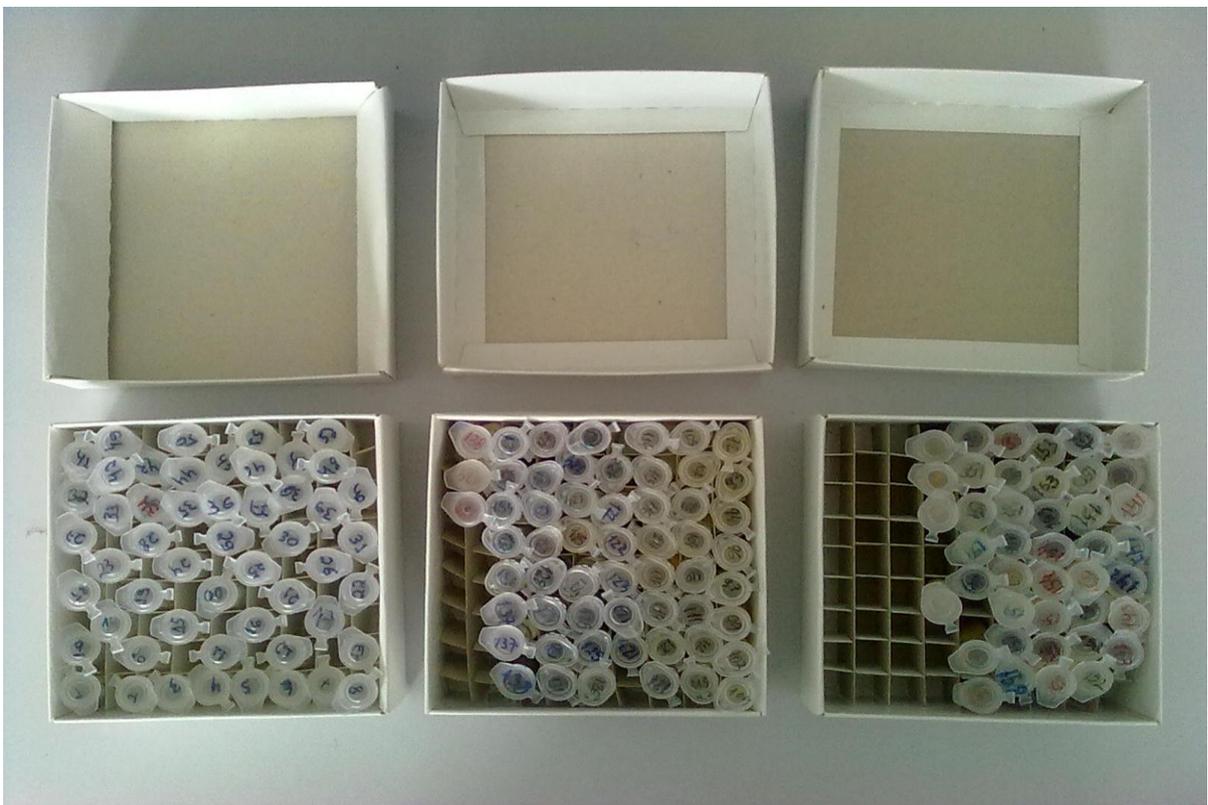
Nas amostragens só foram encontrados exemplares da espécie em estudo nas porções do médio e baixo Paraguaçu. Os dados coletados concordam com os achados de Santos (2005), que relata que a espécie em questão foi muito explorada no passado, a jusante da barragem Pedra do Cavalo e hoje não tem sido mais

registrada nesse local, com suas populações apresentando sinais significativo de declínio em seus estoques nos outros locais de captura.

A partir do material coletado foi criado um banco de tecidos (Figura 09). O banco de tecido foi utilizado para a formação do banco de DNA “in vitro”. Nas extrações foram obtidas excelentes concentrações de DNA, 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 (Tabela 02) ambos analisados em espectrofotômetro modelo Bioespectro SP22. Isto possibilitou um melhor aproveitamento dessas amostras. Com esses resultados, acreditamos que as normas do protocolo foram seguidas corretamente.

	CONCENTRAÇÃO	PUREZA
MÁXIMO	$C=75\text{ng}/\mu\text{l}$	$P=1.8$
MÍNIMO	$C=30\text{ng}/\mu\text{l}$	$P=1.7$

**TABELA 02** - Máxima e mínima concentração e pureza de DNA dentre as 121 amostras.



**FIGURA 09** – Banco de tecido da *Kalyptodoras bahiensis*.

A partir do banco de DNA constituído (Figura 10), foi iniciado o trabalho de caracterização genética por meio de marcadores moleculares (marcadores de microssatélites ISSR, SPAR-PCR).



**FIGURA 10** - Banco de DNA preservado

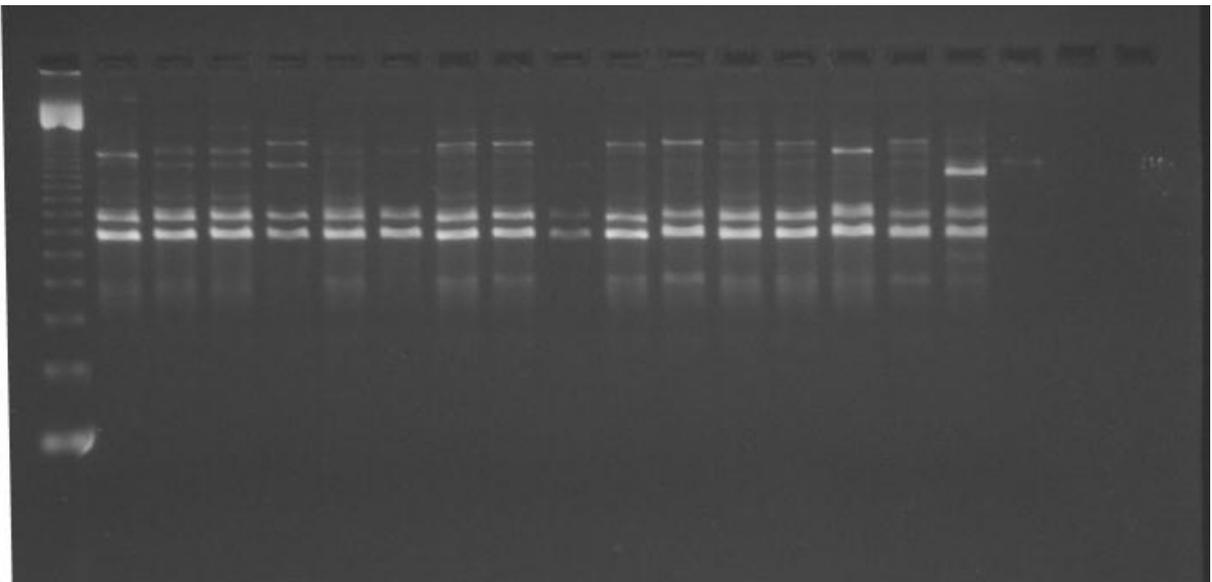
Através da técnica SPAR-PCR foram realizadas amplificações, que refletiram diretamente a distribuição de seqüências repetitivas simples no genoma dos espécimes analisados, onde foram obtidos perfis eletroforéticos da espécie, os quais apresentaram poucas diferenças. Dessa forma, tornaram-se disponíveis marcadores diagnósticos, ou seja, espécie-específicos, que caracterizaram a espécie. A técnica SPAR também tem gerado marcadores diagnósticos em outras espécies de peixes Lucio (2002); Almeida (2005) citado por Martin (2009) e Fonteles-Santos e Fernandes – Matioli (2003).

A técnica de SPAR-PCR usada na identificação de polimorfismo em populações é muito informativa pois detém um caráter conservado nas populações. Esta técnica reflete uma excelente ferramenta em ictiologia, uma vez que esses tipos de análises são úteis na detecção de polimorfismos e fornecem informações

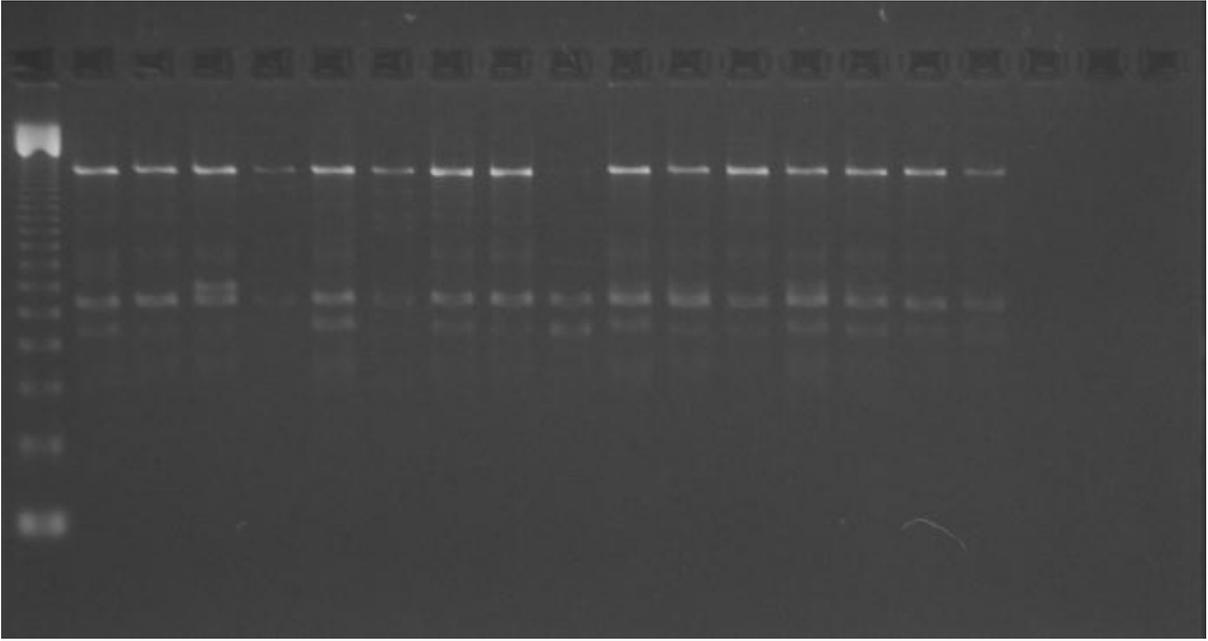
seguras sobre os níveis de variabilidade e similaridade entre distintas populações naturais (MARTINS, 2002).

Através da técnica SPAR-PCR foram realizadas amplificações, que refletiram diretamente a distribuição de sequências repetitivas simples no genoma dos espécimes. Os *primers* testados e selecionados para a amplificação do DNA via PCR produziram diferentes padrões de fragmentos SPAR (Figuras 11, 12 e 13).

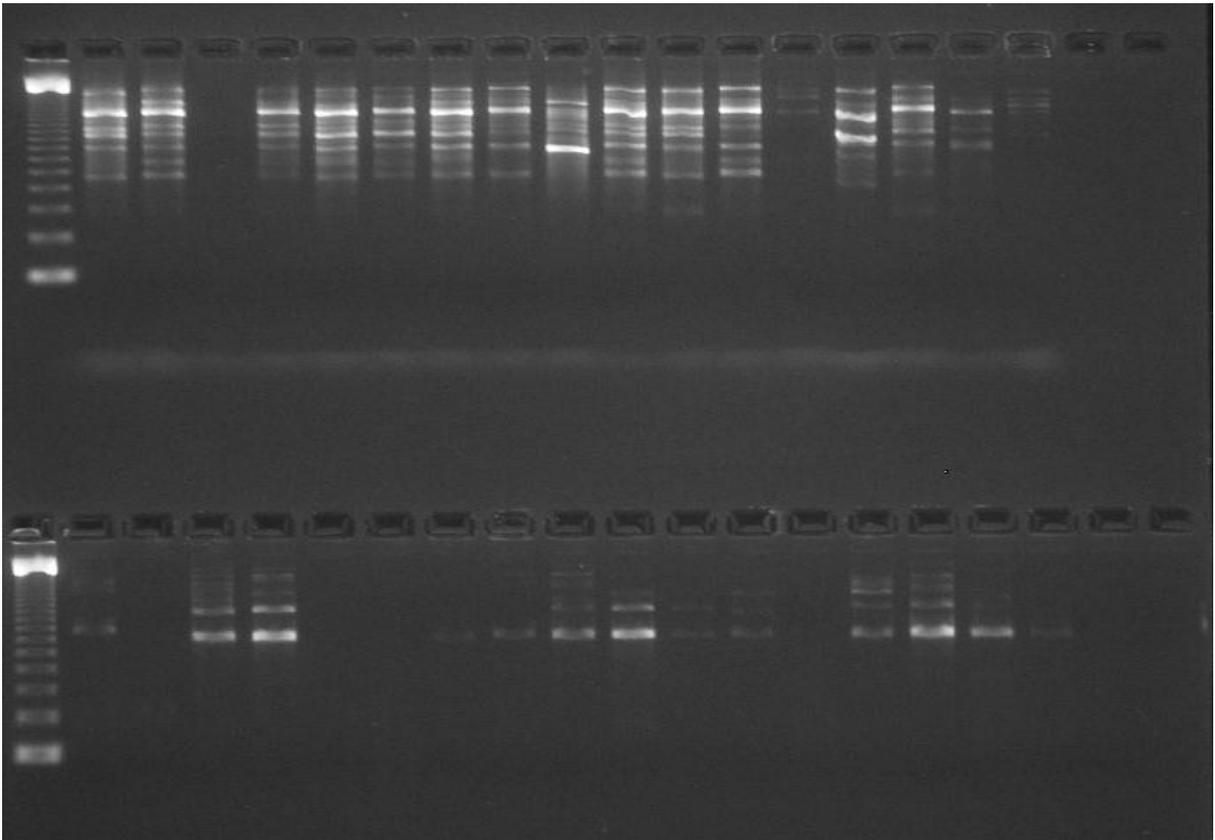
Os marcadores apresentaram bandas principais monomórficas e bandas secundárias polimórficas, caracterizados da seguinte forma: AAGC – quatro padrões (Figura 11), TAGG – dois padrões (Figura 12) e GGAC – três padrões (Figura 13). Embora haja uma diferença marcante na frequência de ocorrência desses padrões dentro das populações, os resultados são insuficientes para se determinar se há algum nível de estruturação entre elas, o que deverá ser feito com o aumento da amostragem analisada e a implementação de novos marcadores. A técnica SPAR também tem gerado marcadores diagnósticos em outras espécies de peixes.



**FIGURA 11** – Padrões de bandejamento da *Kalyptodoras bahiensis* com os primer AAGC.

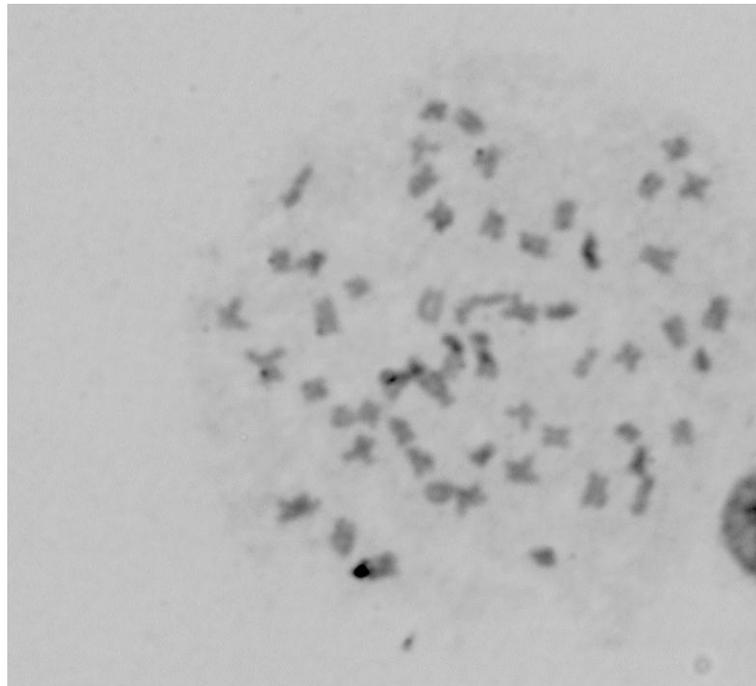


**FIGURA 12** – Padrões de bandeamento da *Kalyptodoras bahiensis* com os primer TAGG.



**FIGURA 13** – Padrões de bandeamento de duas populações da *Kalyptodoras bahiensis* com o primer GGAC.

Em relação as preparações citogenéticas os resultados obtidos revelaram que *Kalyptodoras bahiensis* possui  $2n= 58$  cromossomos tanto para exemplares machos como para as exemplares fêmeas (Figura 14).



**FIGURA 14** – Metáfase da *Kalyptodoras bahiensis* corada com prata,  $2N= 58$ .

Na análise das lâminas foi possível perceber que a preparações citogenéticas foram realizadas com sucesso devido à grande quantidade de metáfase encontradas. Analisando a morfologia dos cromossomos mitóticos, foi observado que estes encontravam-se bastante condensados dificultando assim a observação da morfologia de cada um.

Os resultados obtidos corroboram com aqueles já descritos na literatura, onde o menor numero diplóide encontrado é  $2n=42$ , e o maior numero diplóide é  $2n=62$  para o gênero Siluriforme (GARCIA, 2003). Sendo reafirmado com os dados visto na literatura para a família Doradidae onde observa-se a manutenção do numero diplóide de  $2n=58$  nas espécies estudadas, sendo que o seu cariótipo é principalmente constituído por elementos de dois braços (RIBEIRO, 2009).

Para Lacerda (2005) no grupo dos peixes existe aqueles que mantêm-se com o número de cromossomos do cariótipo relativamente constante, existe ainda aqueles que apresentam grande variação no número e morfologia dos cromossomos.

Os dados desse trabalho também concordam com os achados de Jorge *et al.* (1992) & Fenocchio *et al.*, (1993), eles relatam que na família Doradidae observa-se a manutenção do número diploide com  $2n= 58$  para a maioria as espécies analisadas, com exceção de apenas uma, a *Trachydoras*, que apresenta  $2n=56$  uma situação única dentro do grupo (FECNOCCIO *et al.*, 1993). Também evidenciam que do ponto de vista evolutivo, dentro da família Doradidae, não foram encontradas grandes variações. No entanto quando se compara estes resultados com outros já descritos para todo o grupo Siluriforme, nota-se uma maior distinção com relação ao número e fórmula cromossômica relacionado à sua evolução (ENDO, 2006).

## 7.0 Conclusão

Com os estudos realizados em *Kalyptodoras bahiensis*, espécie presente na lista da ictiofauna ameaçada de extinção :

Foi obtido um banco genético em forma de DNA preservado de qualidade, com boas concentrações e ótimos graus pureza. O banco de biomateriais em forma de DNA preservado “*in vitro*” obtido nesse trabalho poderá ser usado com eficiência em estudos genéticos utilizando marcadores moleculares a qualquer tempo.

Na utilização da técnica SPAR-PCR foram encontradas distribuições de sequências repetitivas simples, obtendo-se perfis eletroforéticos com pouca diferença, mostrando assim que não há polimorfismo evidente nessa espécie e entre as populações.

Ficou definido o perfil genético de *Kalyptodoras bahiensis* para três marcadores genéticos nucleares e sugere níveis de diversidade molecular intrapopulacional, a qual é de grande importância na manutenção da viabilidade e sobrevivência da espécie, contribuindo para a conservação do potencial biológico das populações selvagens de peixes.

Nos estudos citogenéticos *Kalyptodoras bahiensis* possui  $2n=58$  cromossomos e não apresentou variação significativa no padrão cromossômico espécie-específico, indicando que o número diplóide se manteve sem grandes alterações quando comparados com outros representantes da família Doradidae.

## 8.0 Considerações Finais

Os dados aqui apresentados são em sua maioria inéditos para a espécie *Kalyptodoras bahiensis*, evidenciando a grande necessidade da expansão de estudos genéticos para essa espécie. Essa análise poderá servir de subsídio para outras pesquisas, ligadas à evolução do grupo e a conservação do potencial genético desta espécie.

O material produzido será um importante instrumento, podendo definir uma política de monitoramento e conservação do patrimônio genético da *Kalyptodoras bahiensis*, viabilizando assim a conservação dessa espécie neotropical.

## 9.0 Referências Bibliográficas

ALVES COSTA, F. A. et Al. **5S Rdna, caractereization in tweleve Sciaenidae fish species(Teleostei Perciformes):** Depicting gene diversity and molecular markers. *in Genetics and Molecular Biology*. Sociedade Brasileira de Genetica : Abril 2008, volume 31,1. p. 304-307.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1978). **Contribuição à citogenética dos Gymnotoidei (Pisces, Ostariophys).** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 128p.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. et Al. (1988). **BrdU replication patterns demonstrating chromosome homeologies in two fish species, genus *Eigenmannia*.** *Cytogenet. Cell Genet.* 48:117-120.

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

ABUCARMA, M.; MARTINS-SANTO I.C. **Caracterização cromossômica de duas Citogenetica Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais.** São Carlos (SP), 1996, p.73.

ARTONI, R.F. (1996) **Estudos Citogenéticos da Família Loricaridae com ênfase no gênero *Hipostomus* (Laceprde, 1803)(pisces, Siluriforme).** *Discertação de Mestrado.* Universidade Federal de São Carlos, São Carlos,SP.

CARLOS, S.P.; AFFONSO.P.R.A.M. (2000) **Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Peciformes).** *Disertação de Mestrado.* Universidade Federal de São Carlos.São Carlos. SP.

BAHIA. **Plano de Valorização dos Recursos Hídricos da Bacia do Rio Paraguaçu.** Volume I – Secretaria Estadual de Saneamento e Recursos Hídricos, Salvador, 1974a.

BARBOSA, R. D. A. et Al. 2008. **Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*: Depicting gene diversity and molecular markers.** *in Genetics and Molecular Biology*. Sociedade Brasileira de Genetica : Abril 2008, volume 31,1. p. 357-360.

- BECKMANN, JS, SOLLER M. 1983. **Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement methodologies, mapping and costs.** Theor. Appl. Genet. 67: 35-43.
- BERTOLLO, L. A. C. et Al. (2000). **A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, Karyotypic survey, geographical distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations.** Chromosome Research 8: 603 - 613.
- BOTSTEIN, D. et Al. (1980). **Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism.** American Journal of Human Genetics 32, 314-331.
- Britski, H. A.; Sato, Y. & Rosa, A. B. S. 1988. **Manual de Identificação de Peixes da Região de Três Marias, com Chaves de Identificação para os Peixes da Bacia do São Francisco.** (3a. Ed.), Brasília, CODEVASF, Câmara dos Deputados. 115 pp.
- BRITO, M.R.; LIMA, F.C.T.; SANTOS, A.C.A. 2005. **A new Aspidoras (Siluriformes: Callichthyidae) from rio Paraguaçu basin, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil.** Neotropical Ichthyology, 3(4): 473-479.
- BUCKUP, P.A. 1998. **Biodiversidade dos Peixes da Mata Atlântica.** In: Base de Dados Tropical (ed.). Biodiversity Patterns of South and Southeast Atlantic Rain Forest.
- BURGESS, W. E. (1989) **Na Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A Preliminary Survey of Siluriformes.** T.F.H. Publications, Neptune, NJ.
- BURR B. *et al.* 1983. **The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding.** In: Sellow JK, Hoilaender A. [eds]. Genetic engineering: principles and methods. Plenum Press, Vol. 5.
- CARVALHO R.A.; DIAS, A.L. (2001) **Caracterização Citogenética de *Rhamdia quelem* (Piscse Rhamdiidae) proviniente da Bascia do Rio Tibaji / PR.** Resumo do congresso internacional de ictiologia.
- CASTRO. R.M.C. 1999. **Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. Pp. 139-155** In: E.P. Caramaschi, R. Mazzoni, C.R.S.F. Bizerril & P.R. Peres-Neto (Eds.), Ecologia de peixes de riachos. Série Oecologia Brasiliensis, vol. 7, PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, 260 pp.

CRA. **Bacia Hidrográfica do Rio Paraguaçu**. Salvador, 2001. Cesar Martins. **Genética de Peixes: Perspectivas e Aplicações**. Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

COLE, C.J.; LEAVENS, C.R. (1971). **Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique**. *Herpetol. Rev.*, 3: 102- 1971.  
Cremer, T. & Cremer, C. C. **Centennial of Wilhelm Waldeyer's introduction of the term "chromosome" in 1888**. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1988.

DECRETO Nº 6.548 DE 18 DE JULHO DE 1997. **Dispõe sobre a criação da Área de Proteção Ambiental - APA do Lago de Pedra do Caval**. Bahia, 1997.

DELLA-ROSA V.A. et Al. (1980). **Estudos Citogenéticos de Peixes da Amazônia. Segunda Ordem Siluriforme**. Ciências e Cultura.

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

FENOCCHIO, A.S. et Al. (1993) **Karyotypic characterizations and nucleolus organizer regions in three species of Doradidae (Pisces, Siluriformes)**. *Rev. Brasil. de Genet.*, 16(4): 1097-1101.

FERNANDES-MATIOLI F.M.C.; ALMEIDA-TOLEDO L.F. 2001. **Species diversity and Geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) through analysis of nuclear (GGAC) microsatellites**. *Genetics and Molecular Biology* 23:1-5.

FERRARIS, C.J. (2007) **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types**. *Zootaxa*, 1418:1-628.

FERREIRA S.R.B. 2007. **Variabilidade Genética Da Dourada (*Brachyplatystoma Rouseauxii* - Siluriformes: Pimelodidae), Na Bacia Do Rio Branco, Roraima, Amazônia Brasileira**. *Dissertação*. Universidade Federal de Roraima.

FONTELES-SANTOS, S.B.A.M *et al.* (2008) **Molecular markers in Chinese carps and their interspecific hybrids**. *Genetics and Molecular Biology* 28 (1) : 172-174.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1993). **A method for**

**chromosomo preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine.** *Experientia*, 49: 810-813.

GALLETI JR., P.M. et Al. (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.

GOLD, J.R. *et al.* **Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding.** *Journal of Fish Biology*, v. 37, p. 563-575, 1990.

GREENWOOD, P. H. *et al.*, (1966) **Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms.** *Bulletin of the American Museum of Natural History* 131:341–455.

GRODZICKER, T. et Al. **Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses.** *Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology* 39: 439-446, 1974.

GUPTA M. (1994). **Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats.** *Theor Appl Genet* 89:998-1006.

HERBK, T. **The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Ariapaima gigas*, Aripaimidae, Osteolossiformes).** *in Genetics and Molecular Biology*. Sociedade Brasileira de Genetica : Abril 2008, volume 31,1. p. 293-302

HIGUCHI, H.; BRITSKI, H.A. ; GARAVELLO, J.C. (1990). **"*Kalyptodoras bahiensis*, a new genus and species of thorny catfish from northeastern Brazil (Siluriformes: Doradidae)".** *Ichthyol. Explor. Freshwat.* 1 (3): 219–226.

IBGE. **Diagnóstico Geoambiental e Sócio-Econômico da Bacia do Paraguçu.** Série estudos e pesquisas em geociências. Nº 1. Rio de Janeiro, 1993.

**Instrução Normativa de nº 5 do IBAMA, de 21 de maio de 2004,** anexo I. Lista Nacional das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçadas de Extinção. Brasília, 2004.

LACERDA, M.C.V. **Análises citogenéticas em espécies de peixes *Gymnotus* (Pisces, Gymnotidae), coletadas no córrego Fundo, Alfenas, Minas Gerais./ Alfenas.** Dissertação de Mestrado. UNIFENAS, Alfenas – MG, 2005.

LEE, M.R.; ELDER, F.F.B. (1980). **Yest simulation for bone marrow mitosis for cytogenetic investigation.** Cytogenet Cell Genet, v.26, p.36-40.

LOWE-MCCONNELL, R.H. (1975) **Fish communities in tropical freshwaters.** Longman, London. 337p.

LUCIO, L. C. **Caracterização Molecular e Variabilidade Genética em Populações de *Hoplias aff. malabaricus* da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná.** 2002. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, 2002.

MACHADO, A.B.M. et Al. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção.** 1.ed. - Brasília, DF : MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008. 2v.

MARTINS, C. *et al.* **Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura.** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 28, 12-15, 2002. MEES, G.F. (1974) Auchenipteridae and Pimelodidae. **Zool. Verh.** 132: 115- 246.

MENEZES, N.A.; WEITZMAN, S.H.. 1990. **Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the glandulocaudin fishes of Brazil and Paraguay.** Proc. Biol. Soc. Washington 103(2); 380-426

\_\_\_\_\_. 1998. **Padrões de distribuição da biodiversidade da mata atlântica do sul e sudeste brasileiro: peixes de água doce.** In: Base de Dados Tropical (ed.). Biodiversity Patterns of South and Southeast Atlantic Rain Forest.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction.** Methods in Enzymology, New York, v. 155, p. 335-350,

MORITZ, C. **Applications of metochondrial DNA analysis in conservation: a critical review.** Mol. Ecol., v. 3, p. 401-411, 1994.

NELSON, J.S. (2006) **Fishes of the world.** New york, john Wiler ; sons,inc., 624p.

OLIVEIRA, C. et Al. (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.

PENDÁS A.M. et Al. **Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA**. *Cytogenet Cell Genet* 67: 31-36, 1994.

PINNA, M. C. C. (1988) **A new genus of trichomycterid catfish (Siluroidei, Glanapteryginae), with comments on its phylogenetic relationships**. *Revue Suisse de Zoologie*, 95(1): 113-128.

REIS, R. E.; KULLANDER S. O.; FERRARIS, JR. C. J. (2003). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Editora da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

**Resolução CONAMA nº 302, de 20 de Março de 2002**. Dispõe sobre as Áreas de Preservação Permanente de Reservatórios artificiais. Brasília, 2002.

\_\_\_\_\_. **Resolução CONAMA nº 303, de 20 de Março de 2002**. Dispõe sobre as definições e parâmetros das Áreas de Preservação Permanente. Brasília, 2002

\_\_\_\_\_. **Resolução CONAMA nº 369, de 28 de Março de 2006**. Dispõe sobre os casos excepcionais, de utilidades públicas, interesse social ou baixo impacto em Áreas de Preservação Permanente de Reservatórios artificiais. Brasília, 2006.

RIBEIRO, L. B. (2009). **Análise citogenética das espécies do gene *Hypophthalmus* (Siluriformes, Pimelodidae) da região do Lago Catalão, Amazonas, Brasil**. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus – AM

ROCHA, J. C. de S. da. **Direito, democracia e meio ambiente**: mediação de interesses pela ação estatal. Salvador: Superintendência de Recursos Hídricos, 2007.

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.**

SAIKI, R. K. et Al. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. Science, Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan. 29. 1988.

SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS T. 1989. **Molecular cloning. A Laboratory Manual**. 2<sup>o</sup>ed. 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.

SCHAFFER, S.A. 1998. **Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae)**. In L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, C.A.S. Lucena (eds), Phylogeny and classification of neotropical fishes. Mus. Ciênc. Tecn. PUCRGS, Porto Alegre.

SILVESTRE – MARQUES, D.K. **Aplicações da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Brasília: Embrapa, 2002.

SOUZA I.L.; MOREIRA-FILHO O.; GALETTI JR. P.M. (1996). **Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis***. Bras. J. Genet., 19: p. 405-410.

SOFIA, H. S., et Al. **Genetic diversit of *Hypostomus ancistroides*(Teleostei, Loricariidae) for na urban stream**: Depicting gene diversity and molecular markers. in Genetics and Molecular Biology. Sociedade Brasileira de Genetica : Abril 2008, volume 31,1. p. 317-323.

STUBER C.W.1992. **Biochemical and molecular markers in plant breeding**. In: Dudley, JW, Hallauer AA, Ryder M [eds]. Plant breeding reviews. John Wiley & Sons, Inc. Vol. 9.

SULLIVAN, P. ; LUNDBERG, J. G.; HARDMAN, M. 2006. **A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(3): 636-662.

SWANSON, C.P.; MERZ, T.; YOUNG, W.J. **Citogenetica.** Editora da Universidade de São Paulo, Editora Polígono, 1969.

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 Doutorado, Engenharia de Produção da Universidade Federal de Santa Catarina, capítulo 2.

TEUGELS, G.G. (1996) **Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei);** an overview. *Aquat. Living Resour.*, 9:9-34.

TOLEDO-FILHO, S. A. et Al. (1998). **Projetos de bancos genéticos na piscicultura brasileira.** Cadernos de ictiogenética 5, CCS/USP, São Paulo.

\_\_\_\_\_ **Conservação Genética de Peixes em Projetos de Repovoamento de Reservatórios.** Caderno de Ictiogenética 1: 1-39, 1992.

Ward, R.D.; Grewe, P. **Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries.** *Rev. Fish Biol. Fish.*, v. 4, 1994.

TOLEDO, V.; FERRARI, I. (1976a). **Estudo citogenético de *Pimelodella* sp. e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces):** Cromossomo marcador. *Científica* 4: 120-123. WYMAN, A. ;

WHITE, R. (1980) **A highly polymorphic locus in human DNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6754–8.

#### **Sites:**

FREITAS, E. de. **Tipos de Solo do Brasil.** Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/brasil/tipos-solo-brasil.htm>>. Acesso em 25 de outubro de 2010.

**Citogenética de peixes.** Disponível em: <[www.ufscar.br/~labcito/citog.htm](http://www.ufscar.br/~labcito/citog.htm)>. Acesso em 22 de Julho de 2010.

**Arquivo Publico Municipal São Felix-Ba. Rio Paraguassú e sua historia.**  
Disponível em: <<http://arquivomunicipaldesaofelix.blogspot.com/2010/05/rio-paraguacu-e-sua-historia.html>>. Tipos de solo do Brasil. Acesso em 05 agosto de 2010.

## 10.0 Anexos



**ANEXO 01** – Localização da bacia hidrográfica do rio Paraguaçu - Bahia.



**ANEXO 02** – Material estocado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**ANEXO 03** – Banco de DNA preservado em freezer.

**ANEXO 04-** Tabela apresentando dados das Amostras de *Kalyptodoras bahiensis* capturadas ao longo do rio Paraguaçu - Ba, com as respectivas localidades e coordenadas.

<b>N°</b>	<b>Ponto</b>	<b>Localidade</b>	<b>Animal</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitudes</b>
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	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"

		Melo			
<b>24</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>25</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>26</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>27</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>28</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>29</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>30</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>31</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>32</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>33</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>34</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>35</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>36</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>37</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>38</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>39</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>40</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>41</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>42</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>43</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>44</b>	3	Igrejinha	vivo	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>45</b>	4	Rafael Jambeiro	vivo	-12° 32' 13,33"	39° 48' 13,72"
<b>46</b>	4	Rafael Jambeiro	vivo	-12° 32' 13,33"	39° 48' 13,72"
<b>47</b>	4	Rafael Jambeiro	vivo	-12° 32' 13,33"	39° 48' 13,72"
<b>48</b>	4	Rafael Jambeiro	vivo	-12° 32' 13,33"	39° 48' 13,72"
<b>49</b>	4	Rafael Jambeiro	vivo	-12° 32' 13,33"	39° 48' 13,72"
<b>50</b>	4	Rafael Jambeiro	morto	-12° 32' 13,33"	39° 48' 13,72"
<b>51</b>	3	Igrejinha	morto	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>52</b>	3	Igrejinha	morto	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>53</b>	3	Igrejinha	morto	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>54</b>	3	Igrejinha	morto	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>55</b>	3	Igrejinha	morto	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>56</b>	3	Igrejinha	morto	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>57</b>	3	Igrejinha	morto	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>58</b>	3	Igrejinha	morto	-13° 01' 28,10"	40° 40' 52,98"
<b>59</b>	1	Fazenda	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"

		Palmas			
<b>60</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>61</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>62</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>63</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>64</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>65</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>66</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>67</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>68</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>69</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>70</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>71</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>72</b>	4	Rafael Jambeiro	vivo	-12° 32' 13,33"	39° 48' 13,72"
<b>73</b>	4	Rafael Jambeiro	vivo	-12° 32' 13,33"	39° 48' 13,72"
<b>74</b>	4	Rafael Jambeiro	vivo	-12° 32' 13,33"	39° 48' 13,72"
<b>75</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>76</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>77</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>78</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>79</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>80</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>81</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>82</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"
<b>83</b>	2	Bandeira de Melo	vivo	-13° 02' 08,63"	40° 48' 39,02"

<b>84</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>85</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>86</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>87</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>88</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>89</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>90</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>91</b>	1	Fazenda Palmas	vivo	12° 56' 42,03"	40° 28' 59,14"
<b>92</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>93</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>94</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>95</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>96</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>97</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>98</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>99</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>100</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>101</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>102</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>103</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>104</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>105</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>106</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>107</b>	5	Fazenda Touros	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"
<b>108</b>	5	Fazenda	morto	-12° 41' 24,30"	-40° 07' 01,10"

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