



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA & BIODIVERSIDADE

**ANÁLISE CARIOTÍPICA DE *Pimelodus blochii* (Valenciennes,
1840) (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) DO RIO TAPAJÓS
E BAIXO AMAZONAS**

IVANNY COELHO DA FONSECA

Santarém, Maio /2017

IVANNY COELHO DA FONSECA

ANÁLISE CARIOTÍPICA DE *Pimelodus blochii* (Valenciennes, 1840) (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) DO RIO TAPAJÓS E BAIXO AMAZONAS

Orientador: Prof. Dr. LUIS REGINALDO RIBEIRO RODRIGUES

Dissertação de Mestrado apresentado à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Ambiental, junto ao Programa de Pós-Graduação Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Genética e Conservação da Biodiversidade

Santarém, Maio / 2017

Fonseca, Ivanny coelho da,

Análise cariotípica de *Pimelodus blochii* (Valenciennes, 184), (Siluriformes, Pimelodidae) do rio Tapajós e Baixo Amazonas. Santarém, UFOPA, 2017.

50p.

Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Genética e Conservação da Biodiversidade. Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2017

Orientador: Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues

1. *Pimelodus blochii* 2. Citogenética 3. Cromossomo

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais que sempre me
Apoiaram e me incentivaram
Mostrando como nunca desistir.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela infinita misericórdia, que tem alcançado na minha vida;

Ao meu orientador, Professor Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues, pelo apoio, paciência, ensinamentos, pela oportunidade, pela orientação sabia e exigente, pelo incentivo e entusiasmo contagiante pela pesquisa, pela confiança, pela amizade e por tornar possível a realização desse trabalho. Meu muito obrigada.

A Professora Dr. Heloísa Nascimento, pelo convite em participar de seu trabalho e apresentar ao Prof. Luís e assim torna possível a participação no grupo LGBio.

A Msc. Maria Beatriz Viana, pela amizade, carinho, nossas conversas (confidencias) e por todo apoio que me proporcionou ao longo desse trabalho.

Ao Luan Maciel (Luanzito), pelo apoio e disponibilidade em ajudar no momento que mais precisei para conclusão desse trabalho.

A toda equipe do laboratório de Genética e Biodiversidade: Karen, Danna, Clarisse, Albino, Christian, Elenilze, Thaís, Prof. Gabriel, Ezequias, Felipe Ávila, Felipe Anjos, Amanda, Rose e Jamile, pelas discussões acadêmicas, favores prestados, ensinamentos e principalmente, pela tonelada de bobagens compartilhadas, que muito me fizeram rir. Sem esquecer da pessoa que mais me perturbou (de forma carinhosa) nesse último ano profa. Dra. Jocilene Guimarães, sua estadia no laboratório tornou nossos dias bem alegres.

A Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, que possibilitou a realização de minhas atividades. Ao programa de Pós Graduação de Recursos Naturais da Amazônia, coordenação e secretários. Aos professores, pelo conhecimentos compartilhados.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado a mim concedida e a CAPES pelo financiamento desta pesquisa que está vinculada ao projeto “Estudos citogenéticos e citogenômicos da biodiversidade da Amazônia, com implementação de avanços técnicos”, Edital Pró- Amazônia, AUXPE- 3318/2013.

À Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi (UFPA) pela coordenação do projeto/rede Pró-Amazônia.

Aos colegas do mestrados pelos momentos incríveis ao lado de vocês, principalmente Elen, Carla, Bruna e Leuzimar.

A prof. Dra. Eliana Feldberg pelo apoio em Manaus, junto ao seu laboratório no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Ao Ramon Favarato pela disponibilidade e paciência em ensinar as técnicas de FISH e a todos do laboratório.

Ao Melquíades Costa, técnico do laboratório de Ensino a Biologia UFOPA/Oriximiná, que acompanhou e tornou possível o trabalho de campo naquela localidade. Ao Haroldo Leite, pela ajuda e coleta com os espécimes. Ao meu amigo Marcos por me receber em sua humilde residência, durante a estadia na cidade.

Ao amigo Fabiano Hector, e todas as pessoas da Escola Presidente Castelo Branco UFOPA/Itaituba/Polo PARFOR, que tornaram possível a utilização de uma das sala na dependência do colégio, assim realizar os procedimentos necessário para trabalho. Aos pescadores seu Naldo e dona Madalena, pelo empenho em coletar os peixes. A Eloíza Soares e seus avós que nos acolherem em sua casa em Itaituba e tornar possível nossa estadia.

E principalmente as pessoas mais importantes de minha vida Edir Fonseca e Jucinalda Fonseca meus exemplos de vida, pais queridos, que mesmo sem entender o que é o mestrado me deram apoio incondicional e sempre fizeram de tudo para a alcançar meus objetivos. Aos meus irmãos que sempre estiveram comigo em toda essa caminhada.

E a todas as pessoas que contribuíram de forma direta e indireta para realização desse trabalho meu muitíssimo OBRIGADA!!!

EPÍGRAFE

**“Cada sonho que você deixa para trás,
É um pedaço do seu futuro que deixa de existir”.**

Steve Jobs

Fonseca, Ivanny Coelho da, **Análise cariotípica de *Pimelodus blochii* (Valenciennes, 1840), (Siluriformes, Pimelodidae) do rio Tapajós e Baixo Amazonas**. 2017. Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Genética e Conservação da Biodiversidade. Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2017.

RESUMO

O gênero *Pimelodus* é constituído por 33 espécies, distribuídas endemicamente na região neotropical e com ocorrência registrada nas bacias do Araguaia, Tocantins, Amazonas, Paraná e Orinoco. No presente trabalho analisamos o cariótipo de *P. blochii* do rio Tapajós e baixo Amazonas. Foram analisados 11 exemplares de *P. blochii* e o cariótipo foi caracterizado utilizando-se técnicas de coloração convencional por Giemsa, bandeamento C e marcações da Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) com nitrato de prata, Cromomicina A₃ e FISH de sondas DNAr18S e 5S. Os resultados apontaram variação do número diplóide ($2n=58$ e $2n=56$). Amostras de Itaituba, rio Tapajós, apresentaram cariótipo com número diplóide $2n=56$ cromossomos, enquanto que, as de Santarém, Almeirim e Oriximiná mostraram $2n=58$. As regiões organizadoras de nucléolos foram localizadas no braço curto de um par acrocêntrico, em posição semelhante aos sítios CMA3 positivos e localização da sonda DNAr18S. Os sítios DNAr18S e 5S foram co-localizados em um par cromossômico. Os resultados evidenciam divergência cariotípica entre a população de *P. blochii* do rio Tapajós e do baixo Amazonas, o que é interpretado em favor da hipótese de que *P. blochii* representa um complexo de espécies

Palavras chaves: Cariótipo, Ag-NOR, FISH

Fonseca, Ivanny Coelho da, **Análise cariotípica de *Pimelodus blochii* (Valenciennes, 1840), (Siluriformes, Pimelodidae) do rio Tapajós e Baixo Amazonas**. 2017. Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Genética e Conservação da Biodiversidade. Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2017.

ABSTRACT

The genus *Pimelodus* encompasses 33 species distributed endemically in the Neotropical region occurring in the Araguaia, Tocantins, Amazonas, Paraná and Orinoco basins. In the present study we analyzed the karyotype of *Pimelodus blochii* from the Tapajós and lower Amazonas Rivers. Were analyzed 11 specimens and the karyotype was studied with conventional giemsa staining, C banding, Ag-NOR, Chromomycin A3 and FISH of DNAr18S and 5S probes. The results showed variation in the diploid number ($2n=58$ and $2n=56$). Samples from Itaituba, Tapajos river have diplóide number of $2n=56$ chromosomes, while samples from Santarém, Almeirim and Oriximiná have $2n=58$. The nucleolar organizing regions were detected on the short arm of an acrocentric pair, with similar position of the positive CMA3 sites, and the localization of DNAr18S probes. The sites DNAr18S and 5S were co-localized in a chromosomal pair. The results evidenced karyotypic divergence between *P. blochii* population from the Tapajós River and lower Amazonas, what is interpreted in support to hypothesis of *P. blochii* species complex.

Key-words: Karyotype, Ag-NOR, FISH

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Revisão bibliográfica.....	2
1.1.1 Considerações taxonômicas da Família Pimelodidae, Ordem Siluriformes	2
1.1.2 A citogenética como ferramenta para estudos evolutivos em peixes	3
1.1.3 Estudos citogenéticos em Pimelodidae, Ordem Siluriformes	5
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo Geral.....	8
2.2 Objetivo específicos	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Locais de coleta e amostragem.....	9
3.2 Preparações citogenéticas	10
3.3 Registro de metadados e preservação de espécimes testemunho	10
3.4 Preparação das lâminas	10
3.5 Análise de coloração convencional e bandeamentos.....	11
3.6 Coloração por fluorocromo Cromomicina A3 (CMA ₃)	12
3.7 Detecção de sítios DNAr 18S e 5S por Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	12
3.8 Análise cariotípica.....	13
4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	9
Figura 2	11
Figura 3	19
Figura 4	20
Figura 5	21
Figura 6	22

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é líder mundial em biodiversidade onde se encontra cerca de 21% das espécies de peixes descritas para o mundo (Marques *et al.*, 2013; Copatti *et al.*, 2011). Segundo Galves *et al.* (2009) na região neotropical da América do Sul são encontrados mais de 6.025 espécies de peixes de água doce. Estima-se cerca de 2.500 a 3.000 espécies descritas, contudo esse número pode aumentar podendo chegar até 8.000 espécies para os rios de água doce, conforme novas áreas forem amostradas (Lewinsohn e Prado, 2002; Hoffmann *et al.*, 2005; Nelson, 2006; Buckup, *et al.*, 2007; Langeani, *et al.*, 2007).

A alta diversidade de peixes em regiões neotropicais ocorre devido aos processos geomorfológicos e hidrológicos que ocorreram ao longo dos anos (Brandão, 2008). No entanto, a diversidade íctica neotropical vem sofrendo drástica diminuição devido às mudanças ambientais como poluição, desmatamento, assoreamento construção de barragens entre outras (Braga & Andrade, 2005; Melo, *et al.*, 2006; Brandão, 2008; Barroso, *et al.*, 2013).

Os principais grupos representados na ictiofauna brasileira são: Characiformes (lambaris, dourados, curimatás, entre outros.); Siluriformes (peixes de couros e cascudos); Gymnotiformes (túviras, sarapós, etc.); Perciformes (acarás, tucunarés, etc.) e Cyprinodontiformes (barrigudinhos, guarus, etc.) (Bizerril & Primo, 2001). A ictiofauna amazônica se destaca pela variabilidade do número de espécies e de sua diversidade morfológica e ecológica (Gravello e Shibatta, 2007; Val *et al.*, 2010).

Os peixes apresentam uma ampla variedade em hábitos alimentares quanto a morfologia, comportamento, métodos reprodutivos, crescimento, ciclo de vida e resposta às alterações ambientais, além de servirem como indicadores para monitoramento biológico (Oba *et al.*, 2009; Nirchio *et al.*, 2014).

Estudos citogenéticos em peixes visam uma maior compreensão das estruturas cromossômicas, além de contribuir com as análises filogenéticas e taxonômicas dos grupos (Andreatta *et al.*, 1992; Artoni, 1996; Oliveira *et al.*, 2009;). As ordens Characiformes e Siluriformes com 475 e 318 espécies que já foram estudadas, respectivamente. Apesar de sua ampla riqueza, os estudos citogenéticos em regiões neotropicais ainda são incompletos, quando comparado ao número de espécies descritas.

Tendo em vista a importância dos estudos citogenéticos para conhecimento da biologia, sistemática e evolução dos grupos, fazem-se necessários os estudos que possam contribuir de forma significativa, assim como o conhecimento necessário para a classificação e conservação

dessas espécies (Artoni *et al.*, 2000, Oliveira *et al.*, 2009), uma vez que os estudos com cariótipos de peixes já somam mais de 2.600 espécies em todo o mundo, sendo mais de 921 nas regiões neotropicais com cerca de 252 gênero e 44 famílias (Oliveira e Gosztanyi, 2000;). O aperfeiçoamento das técnicas em citogenética, vem contribuindo para grandes avanços taxonômicos e evolutivos dos peixes, levando a compreensão de suas estruturas genéticas/genômicas, assim como as suas características cromossômicas (Martins, *et al.*, 2006).

No presente trabalho investigamos um tema ainda pouco explorado que trata da diversidade genética de *Pimelodus blochii*. Esta espécie nominal tem sido reportada como um complexo de espécies por apresentar variação morfológica o que contribui para dificultar a identificação taxonômica neste grupo. Visando contribuir para o conhecimento da diversidade cariotípica em *Pimelodus*, o objetivo principal deste trabalho é comparar os padrões citogenéticos de *P. blochii* provenientes dos rios Tapajós, Amazonas e Trombetas.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Considerações taxonômicas da Família Pimelodidae, Ordem Siluriformes

A Ordem Siluriformes é formada por 39 famílias, 478 gêneros e 3.500 espécies, conhecidos popularmente por bagres e cascudos (Ferraris, 2007; Eschmeyer, 2017). Nesta ordem destacamos as famílias Trichomycteridae, Callichthyidae, Loricariidae e Pimelodidae, que são as mais diversas encontradas na região neotropical. Os representantes destas famílias se caracterizam por apresentarem corpo nu e alguns coberto por placa óssea, com acúleo nas nadadeiras peitorais e dorsais, com quatro pares de barbilhões (Nelson, 2006).

A família mais diversificada desta Ordem é Loricariidae com 900 espécies descritas e classificadas em seis subfamílias: Delturinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae e Neoplecostominae (Eschmeyer e Fong 2017). Os loricarídeos apresentam variadas formas, cores e tamanhos, além de possuírem características distintas como ausência de escamas e corpo coberto parcial ou totalmente por placas ósseas (Ferraris, 2007).

A Família Pimelodidae possui distribuição restrita na região neotropical ocorrendo nas bacias dos rios Amazonas, Paraná, Orinoco e nas Guianas, e em alguns rios do sudeste do Brasil, noroeste da Colômbia e leste do Panamá (Lundberg & Littmann, 2003; Eschmeyer e Fong, 2017). Compreende 32 gêneros e 112 espécies validas descritas atualmente, as quais habitam

ambientes de água doce (Eschmeyer e Fong, 2017). Os pimelodídeos não possuem escamas, sendo conhecidos como peixes de couro. Muitas espécies desta família, tais como a piramutaba, são capazes de nadar em grupos por quilômetros de distância, subir grandes rios à procura de alimentos e locais para reprodução (Brandão, 2008). Podem apresentar uma coloração cinza uniforme como observado em *Iheringichthys*, até padrões mais elaborados como listras, pintas e manchas escuras e claras, como observado em *Pimelodus maculatus*, *P. bristik* (Rocha & Zuanon, 2013).

O gênero *Pimelodus* (Lacepède, 1803) possui 33 espécies validas (Ribeiro et al, 2016) sendo amplamente distribuído ao longo de toda drenagem de água doce da região Neotropical, estendendo-se do Panamá na América Central até a Argentina na América do Sul (Ferraris, 2007; Ribeiro et al, 2011). Costumam habitar o leito dos rios, possuem dieta variada como larvas, insetos, algas e fragmentos vegetais (Maciel *et al.*, 2014). Apresentam espinhos nas nadadeiras peitorais e dorsal, boca grande, tamanho moderado e grande (Souza- Filho e Shibatta, 2007). A primeira revisão do gênero *Pimelodus* foi feita por Eigenmann & Eigenmann (1890), difere dos demais pelas características dentárias, comprimento frontal, número de raios e nadadeiras dorsais (Ribeiro et al, 2008).

Na bacia amazônica foram reportadas as ocorrências de oito espécies de *Pimelodus*: *Pimelodus albofasciatus*, *P. blochii*, *P. altissimus*, *P. jivaro*, *P. microstoma*, *P. ornatus*, *P. pictus* e *P. tetramerus* (Ribeiro et al, 2006).

1.1.2 A citogenética como ferramenta para estudos evolutivos em peixes

Os estudos citogenéticos em peixes são valiosos para a compreensão da taxonomia e reconstrução da história filogenética dos grupos, além de contribuir para a maior compreensão nos processos de evolução cromossômica (Artoni et al., 2000). A citogenética permite a análise da morfologia e estrutura dos cromossomos gerando informações úteis para explicar a diversidade cariotípica observada (Guerra, 1988; Loureiro, 1999; Perazzo, 2010).

A maioria dos estudos citogenéticos já realizados em peixes utilizaram técnicas clássicas de coloração e bandeamento, tais como a coloração convencional por Giemsa, a detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) por impregnação de nitrato de prata, o bandeamento C e uso dos fluorocromos Cromomicina A₃ / DAPI (Gold *et al.*, 1990).

A técnica de coloração convencional por Giemsa permite compreender a morfologia e outros aspectos da macroestrutura cariotípica, além da identificação do número diplóide e da

constituição cariotípica de uma espécie, podendo revelar marcadores citogenéticos úteis na interpretação de relações filogenéticas (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Nirchio & Oliveira, 2006).

O método de coloração com nitrato de prata (AgNO_3) detecta as regiões organizadoras de nucléolo (NOR) que foram ativas durante a prófase que precede a metáfase em análise devido a associação da prata com proteínas nucleolares (Faleiro *et al.*, 2005). A NOR é a região do cromossomo onde está localizado os principais genes do DNA transcritos em uma molécula de RNA (45S).

O bandeamento C consiste na coloração de regiões heterocromáticas de cada cromossomo que frequentemente ocorrem na posição do centrômero e regiões distais e com menor frequência em posições intersticiais. A heterocromatina constitutiva contém sequências de DNA altamente repetitivas, as quais, em geral, não codificam proteínas, ela se concentra em blocos, em algumas regiões do braço curto e longo dos cromossomos próximos às constrições secundárias (Faleiro, *et al.* 2005). A coloração pela Cromomicina A3 (CMA3) deve-se a ligações entre as regiões ricas em bases nitrogenadas guanina e citosina (GC) que possuem alta afinidade por este fluorocromo. Por outro lado, o fluorocromo DAPI tem afinidade nas bases nitrogenadas adenina e timina (AT) e se mostra apagada quando ligada a GC, essa coloração emite a uma cor azul brilhante, é utilizado como contracorante nuclear clássico na microscopia de fluorescência (Brammer *et al.* 2013).

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH - *fluorescent in situ hybridization*) possibilitou um grande avanço no campo da citogenética, pois permite a identificação dos segmentos do DNA cromossômico que são hibridizados com sondas marcadas por uma molécula repórter (fluoróforo). Assim, é possível detectar especificamente um único par de cromossomo ou mesmo sub-regiões cromossômicas como, por exemplo, o centrômero e telômero (Faleiro *et al.* 2005). Os estudos com FISH tem demonstrado o envolvimento de sequências repetitivas de DNA nos processos de replicação, recombinação, expressão gênica, na diferenciação de cromossomos sexuais em peixes, e também em rearranjos cromossômicos como inversões e deleções, sendo responsáveis pelas variações cariotípicas observadas (Liu *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002).

O DNA repetitivo é classificado em dois grupos principais, sequências de DNA “repetitivas organizadas *in tandem*” ou “repetitivas diversas”, sendo a primeira representada por, minissatélites e microssatélites e sequências que codificam RNA ribossomais, e a segunda que englobam os elementos transponíveis do genoma como sequências transposons e retrotransposons (Sumner, 2003; Guerra, 2004).

O DNA microssatélite é um tipo de DNA repetitivo formado por regiões dispersas em números variados de repetições de dinucleotídeos (Torres, *et al.*, 2004), as sequências de DNA ribossomal estão organizadas em duas famílias multigênicas, o DNAr 45S que codifica o RNAr 18S, 5,8S e 28S, sendo que 18S é o mais utilizado em peixes, formando blocos com repetições de um ou mais pares, podendo ser observado pela coloração por Nitrato de prata (Guerra, 2004; Junior & Martins, 2004) e DNAr 5S que é uma sequência mais variada, podendo ser encontrada em um par ou mais pares, de acordo com a espécie a ser estudada (Guerra 2004). Os elementos transponíveis têm capacidade de se replicar fazendo cópias de si mesmo e movendo-se para outras regiões no genoma (Torres, *et al.*, 2004; Thomas, *et al.*, 2011). Os retrotransposons se propagam pela enzima transcriptase reversa com a habilidade de formar um filamento de DNA através de moléculas RNA (Torres *et al.*, 2004).

1.1.3 Estudos citogenéticos em Pimelodidae, Ordem Siluriformes

Os estudos citogenéticos em peixes neotropicais são mais comuns na ordem Characiformes e Siluriformes (Artoni *et al.*, 2000). Entre os siluriformes observamos o extremo da variação em número diplóide de 20 cromossomos em *Pterolebis longipinnis* até 134 em *Corydoras aeneus*. Na família Loricariidae foram estudadas 56 espécies, que revelaram uma variação de $2n=36$ em *Rineloricaria latirostris* até $2n=80$ em *Hypostomus sp.* (Oliveira *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2006).

Na família Pimelodidae 32 espécies foram estudadas e revelaram um padrão conservativo da macroestrutura cariotípica, sendo que a maioria dos cariótipos observados mostrou número diplóide $2n=56$ cromossomos, destes apenas seis espécies possuem o número diplóide diferente de 56 cromossomos, sendo elas: *Calophysys macropteros*, $2n=50$ (Ramirez-Gil *et al.*, 1998), *Pimelodus blochii*, $2n=58$ (Della-Rosa *et al.*, 1980), *Pimelodus fur*, $2n=54$ (Garcia & Moreira-Filho, 2008), *Pinirampus pirinampu*, $2n=50$ (Vasconcelos & Martins-Santos, 2000), *Luciopimelodus plati*, $2n=50$ (Sánchez *et al.*, 2006) e *Megalonema platanum*, $2n=54$ (Sánchez *et al.*, 2000; Carvalho-Costa *et al.*, 2011).

Além da variação do número diplóide básico de $2n=56$, o gênero *Pimelodus* apresenta variação como a presença de cromossomos B, observado nas espécies *P. ortmanni* e *Pimelodus sp.* (Borin & Martins-Santos, 2004). Souza *et al.* (2004a) encontraram número diplóide $2n = 56$ cromossomo e NOR simples nas espécies *Pimelodus sp.*, *P. heraldoi*, *P. maculatus*, *P. argenteus* e *P. misteriosus*. O estudo realizado por Treco & Dias (2009) com *Pimelodus*

paranaensis e *Pimelodus heraldoi*, também evidenciaram o número diplóide $2n = 56$ cromossomos, onde a NOR foi identificada em um par de cromossomo subtelocêntrico, sendo que *P. paranaensis* foi localizado no par 24 e em *P. heraldoi*, no par 23. Souza et al (2004b) analisando o cariótipo de *P. heraldoi* e *P. sp.*, foi encontrado $2n = 56$ cromossomos com variação em sua fórmula cariotípica, com presença de NOR no braço longo de um cromossomo subtelocêntrico. Neto et al (2011) encontrou $2n = 56$ cromossomo em *Pimelodus britskii*, com NOR múltipla. Della-Rosa et al (1980), descreveu *Pimelodus blochii* do rio Solimões – AM, $2n=58$ cromossomos. Farias et al (2000) caracterizou *P. blochii* do Rio Araguaia, MT, com $2n = 56$ e NOR simples em um par telocêntrico. Por outro lado, Silva et al (2004) encontrou variação na população de *P. blochii* do rio Araguaia, MT, com $2n=56/58$ cromossomos.

A localização do DNAr 18S já foi mapeada nas posições terminais de um par de cromossomo curto, e um par de cromossomo longo ou no centrômero dos cromossomos, essas marcações foram observadas em *Pimelodus sp.*, *P. heraldoi*, *P. maculatus*. Em *P. argenteus* e *P. misteriosus* a sonda 18S foi localizada no braço curto do cromossomo subtelocentrico, confirmando a NOR (Souza et al, 2004). Em *Iheringchthys labros*, na posição terminal do braço longo (Carvalho et al, 2010).

Nas espécies *Pseudoplatystoma reticulatum*, foi localizado na região terminal do cromossomo submetacêntrico, confirmada pela NOR *Pimelodus britskii*, foi encontrado na região terminal do cromossomo subtelocêntrico, em sentença com 5S, confirmado pela NOR, *Steindachneridion parahybae* localizado na posição terminal de um par de cromossomo submetacêntrico, confirmado pela NOR e *Sorubim lima*, localizado na posição terminal do cromossomo subtelocêntrico, confirmado pela NOR (Neto, et al, 2011).

Em *Hemisorubim platyrhynchus*, o DNAr 18S foi encontrado em um par cromossomo na posição terminal do subtelocêntrico (Swarça et al, 2013). Prado et al, (2012) em estudo com as espécies *Pseudoplatystoma corruscans* e *P. reticulatum* foi confirmado a localização dos genes ribossomais 18S em dois pares de cromossomos subtelocêntrico, correspondendo a NOR. Em *Pimelodus blochii* presente estudo a localização da sonda 18S foi observada no centrômero de um par de cromossomo submetacêntrico.

Com tudo o trabalho de Souza et al, (2004), mencionado anteriormente as marcações com a sonda 5S DNAr, nas espécies estudadas também foram encontrados nas regiões distais de em um par de cromossomo submetacêntrico, assim como no trabalho de Carvalho et al, (2010) a espécies *Iheringchthys labrosus* a sonda 5S foi localizada um par subtelocêntrico, em posição intersticial do braço longo próximo ao centrômero. No trabalho de Neto et al, (2011), as *Pseudoplatystoma reticulatum*, *Steindachneridion parahybae* e *Sorubim lima*, a marcação da

sonda 5S foi observada em um par de cromossomo acrocêntrico e *P. britiskii* apresentou marcação no par de cromossomos submetacêntrico na região intersticial e na região terminal do cromossomo subtelocêntrico, sistêmico com 18S.

Swarça et al (2007), em seu trabalho com revisão de Pimelodidae sugere a divisão da família em dois grupos com base na diferenciação do cariótipo: o “grupo Pimelodus” com as espécies que apresentarem $2n=56$, e o grupo “Sorubiminae”, caracterizado de acordo com as análises citogenéticas e marcação pela NOR em um único par de cromossomo, sendo o primeiro com marcação no braço longo e o segundo na posição terminal do braço curto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Comparar os padrões citogenéticos de *Pimelodus blochii* provenientes dos rios Tapajós e baixo Amazonas.

2.2 Objetivo específicos

- ✓ Descrever os cariótipos da espécie *Pimelodus blochii* por marcadores de citogenética clássica e molecular;
- ✓ Caracterizar as possíveis variações cromossômicas encontradas;
- ✓ Discutir sobre a diversidade citogenética intraespecífica e a hipótese de *Pimelodus blochii* como um complexo de espécies;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de coleta e amostragem

Exemplares de *Pimelodus blochii* foram coletados em quatro localidades: 1) Almeirim – PA, margem esquerda do rio Amazonas, Comunidade do rio Chicaia (n=4); 2) Santarém – PA, margem direita do rio Tapajós, orla da cidade de Santarém (n=4); 3) Oriximiná – PA, margem esquerda do rio Trombetas, orla da cidade de Oriximiná e Lago Iripixi (n=1); 4) Itaituba – PA, margem direita do rio Tapajós, orla da cidade de Itaituba (n=2) (Figura 1).

Os peixes foram capturados por pescadores artesanais dos próprios locais de coleta, utilizando-se malhadeiras, tarrafas e linhas com anzol. Após a coleta os peixes foram mantidos em tanques (caixa plástica 50L), contendo água do rio e aeradas mecanicamente por compressor de ar para uso em aquários. Nas localidades 2 e 3 os tanques foram transferidos para laboratórios da UFOPA, onde ocorreu a preparação cromossômica, enquanto que, nas localidades 1 e 4, as preparações foram conduzidas em laboratório de campo improvisado.

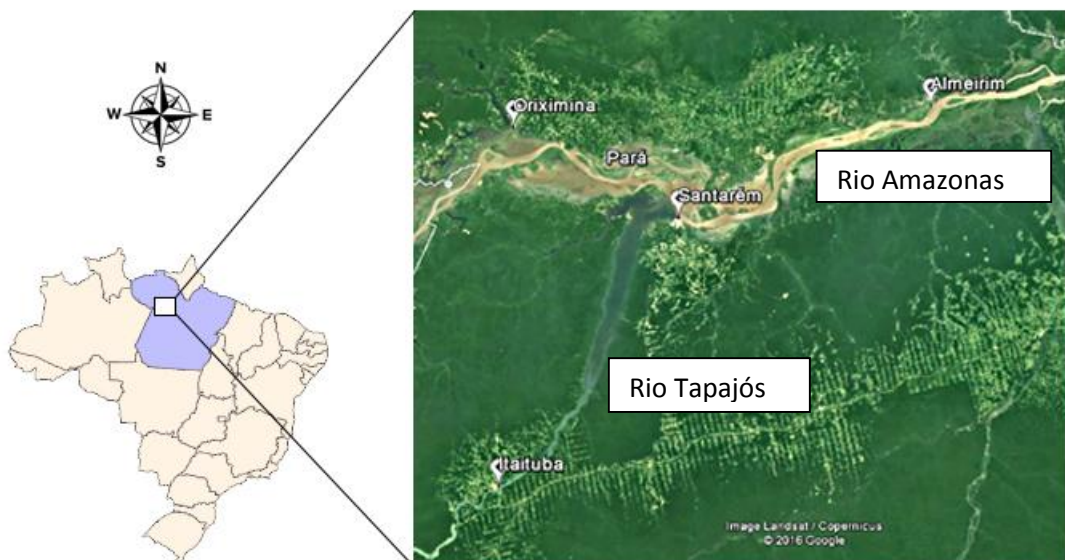


Figura 1: Mapa do Brasil indicando a localização dos locais de coleta de *Pimelodus blochii* analisados no presente trabalho.

3.2 Preparações citogenéticas

Cromossomos mitóticos em metáfases foram obtidos a partir de tecidos renais (rim caudal) mediante tratamento por Colchicina 0.025% e foram anestesiados e mortos por imersão em eugenol segundo Bertollo *et al* (1987), Apêndice I.

3.3 Registro de metadados e preservação de espécimes testemunho

Todos os exemplares foram etiquetados com número de campo, pesados e fotografados. O comprimento padrão foi registrado em mm. Após a retirada de tecidos para estudos moleculares, os espécimes testemunho foram preservados por injeção e imersão em formol a 10% por 48h e depois lavados em água corrente abundante e transferidos para recipientes com etanol a 70%. Ao final da pesquisa os exemplares serão depositados na Coleção Ictiológica do Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, UFOPA. A Figura 2 mostra o aspecto da coloração e morfologia externa dos exemplares coletados.

3.4 Preparação das lâminas

No laboratório, as preparações cromossômicas foram fixadas por mais dois ciclos de centrifugação e troca do fixador Carnoy. Ao final deste processo, os tubos foram deixados em volume proporcional ao tamanho do sedimento celular visando obter o adequado espalhamento dos cromossomos e evitando-se o excesso de material celular na lâmina. Para isso, deve-se gotear 10 a 15 µl da suspensão celular sobre uma lâmina limpa e previamente umedecida com o vapor do banho Maria a 50°C. Após preparadas, as lâminas foram secas a temperatura ambiente e utilizadas para a análise convencional por Giemsa, envelhecidas em estufa a 60° C para uso em técnicas de bandeamento e estocadas em geladeira para uso das técnicas de marcação por fluorocromos ou hibridização *in situ* (FISH).

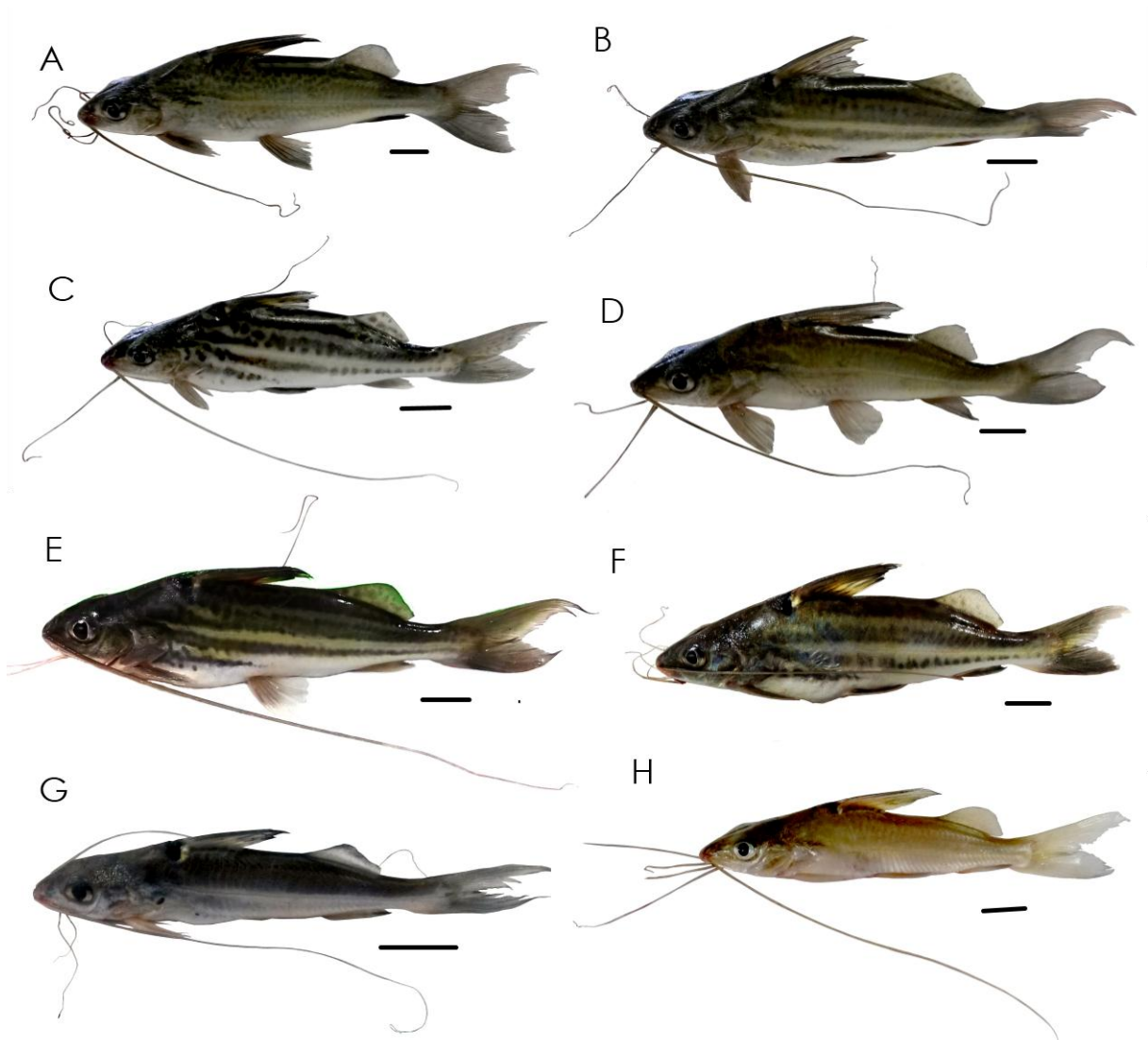


Figura 2. Aspectos da coloração a fresco e morfologia externa de *Pimelodus blochii* analisadas no presente estudo. Espécimes de Oriximiná (A ,B,C, D), de Santarém (E), de Itaituba (F) de Almeirim (G, H). A barra equivale a 1 cm.

3.5 Análise de coloração convencional e bandeamentos

As lâminas foram coradas por 12 minutos com Giemsa diluída em tampão fosfato pH 6,8 a 5%. A solução corante é depositada sobre a lâmina, que fica exposta horizontalmente em um suporte colocado na pia do laboratório. Após a lâmina ser coberta com o corante aguarda-se por 12 minutos e em seguida lava-se com água destilada e deixa secar à temperatura ambiente. O bandeamento C, foi conduzido conforme o protocolo tradicional proposto por

Sumner (1972), Apêndice 3. Para o método de bandeamento NOR foi adotado o protocolo proposto por Howell & Black (1980), Apêndice 4.

3.6 Coloração por fluorocromo Cromomicina A3 (CMA₃)

A marcação com Cromomicina A3 (CMA₃), foi feita conforme o protocolo de Schweizer (1976).

3.7 Detecção de sítios DNAr 18S e 5S por Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

As sondas para detecção dos sítios de DNA repetitivo DNAr 5S e 18S foram produzidas no próprio laboratório por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os primers: DNAr 5S (A 5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Komiya & Takemura, 1979); - DNAr 18S (IpF 5'CCGCTTTGGTGACTCTTGAT e IpR 5'CCGAGGACCTCACTAAACCA) desenhados a partir da sequência completa do gene RNAr 18S de *Ictalurus punctatus* disponível nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (código identificador da sequência AF021880) e gentilmente cedido pela Dra. Eliana Feldberg (INPA).

As reações de PCR foram compostas em volume de 25µl, contendo: 12,5 µl de PCR mastermix 2X (Fermentas), 0,5 µL de cada *primer* (5 mM); 1 µL de DNA genômico; 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5U/ µl)(KAPA Biosystems) e 10,25 µl de água ultrapura estéril. Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes etapas: a) 5S: 1 minuto a 94 °C (desnaturação inicial); [1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 57 °C e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C] ciclagem por 35 ciclos; 5 minutos a 72 °C (extensão final); b) 18S: 1 minuto a 95 °C (desnaturação inicial); [1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C] ciclagem por 35 ciclos; 5 minutos a 72 °C (extensão final). As reações foram processadas no termociclador PxE 0.2 (ThermoScientific).

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium-Uniscience) e nas reações positivas, foram marcados com biotina-14-dATP por *nick translation* usando-se o kit Bionick Labeling System (Invitrogen) e digoxigenina seguindo-se as instruções do fabricante.

As reações de hibridização *in situ* foram realizadas de acordo com Pinkel *et al.* (1986) com modificações segundo o protocolo padronizado no LGBIO (Apêndice 5). Os sinais de hibridização foram detectados usando os anticorpos Avidina-FITC para o espectro verde e anti-digoxigenina conjugada com Rodamina para o espectro vermelho. As metáfases foram contracorados com DAPI+Antifading.

As melhores metáfases foram fotografadas digitalmente com auxílio do programa NIS-Elements usando-se um microscópio de epifluorescência Nikon EclipseCsI dotado de câmera CCD monocromática. A montagem dos cariótipos e ajustes de brilho e contraste foi efetuada com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0.

3.8 Análise cariotípica

As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio óptico, estabelecendo-se o número diploide modal pela contagem mínima de 30 metáfases por espécime, presente em cada espécie/população amostrada. As melhores metáfases foram capturadas com câmera digital Motic CCD de 10 megapixel acoplada ao fotomicroscópio Zeiss Axioskop 40. Os cariótipos montados digitalmente com auxílio do software Adobe Photoshop CS6. Na organização do cariótipo para o arranjo dos grupos observamos modelos previamente publicados na literatura e os pares cromossômicos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), e acrocêntricos (a), como proposto por Levan *et al.* (1964).

Capítulo 1

VARIAÇÃO CARIOTÍPICA EM *Pimelodus blochii* (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) DOS RIOS TAPAJÓS E BAIXO AMAZONAS

IVANNY COELHO DA FONSECA

LUIS REGINALDO RIBEIRO RODRIGUES

Capítulo 1

VARIAÇÃO CARIOTÍPICA EM *Pimelodus blochii* (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) DOS RIOS TAPAJÓS E BAIXO AMAZONAS

Ivanny Coelho da Fonseca¹, Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues²

O gênero *Pimelodus* é constituído por 33 espécies, distribuídas endemicamente na região neotropical e com ocorrência registrada nas bacias do Araguaia, Tocantins, Amazonas, Paraná e Orinoco. No presente trabalho analisamos o cariótipo de *P. blochii* do rio Tapajós e baixo Amazonas. Foram analisados 95 exemplares de *P. blochii* e o cariótipo foi caracterizado utilizando-se técnicas de coloração convencional por Giemsa, bandeamento C e marcações da Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) com nitrato de prata, Cromomicina A₃/DAPI e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) Os resultados apontaram variação do número diplóide ($2n=58$ e $2n=56$) entre amostras dos rios Tapajós e baixo Amazonas. Amostras de Itaituba, rio Tapajós, apresentaram cariótipo com número diplóide $2n=56$ cromossomos enquanto que as de Santarém, Almeirim e Oriximiná mostraram $2n=58$. As regiões organizadoras de nucléolos foram localizadas no braço curto de um par acrocêntrico, em posição semelhante aos sítios CMA3 positivos e localização da sonda DNAr18S. Os sítios DNAr18S e 5S foram co-localizados em um par cromossômico. Os resultados evidenciam divergência cariotípica entre a população de *P. blochii* do rio Tapajós e do baixo Amazonas, o que é interpretado em favor da hipótese de que *P. blochii* representa um complexo de espécies.

Palavras chave: Cariótipo, Ag-NOR, FISH

Introdução

O gênero *Pimelodus* é constituído por 33 espécies, distribuídas endemicamente na região neotropical, com ocorrência registrada nas bacias do Araguaia, Tocantins, Amazonas, Paraná e Orinoco (Maciel et al 2014). Na bacia amazônica são conhecidas oito espécies: *Pimelodus albofasciatus*, *P. blochii*, *P. altissimus*, *P. jivaro*, *P. microstoma*, *P. ornatus*, *P. pictus* e *P. tetramerus* (Ribeiro, 2006). Estudos citogenéticos realizados previamente no gênero *Pimelodus* mostraram que o número diplóide variou de 56 a 58 cromossomos (Maciel et al. 2014; Rocha 2006).

No presente trabalho foi investigado *Pimelodus blochii* (Valenciennes 1840), popularmente conhecido como mandii, é distribuído endemicamente nas regiões neotropicais seu habita é de água doce (Eschmeyer e Fong, 2017). Estudos citogenéticos sobre *P. blochii* indicam um número diplóide $2n = 56/58$ cromossomos em exemplares coletados no rios Tocantins – Araguaia e Solimões (Maciel et al. 2014; Rocha 2006). Estudos com as técnicas de AgNOR e Banda C e FISH DNAr 18S/5S, são poucos para *P. blochii* e algumas nem foram publicadas, haja vista que os trabalhos encontrados estão com enfoque em sua morfologia e reprodução (Ferreira et al 2014; Rocha, 2006).

Tendo em vista que há ampla ocorrência desta espécie na região amazônica e o conhecimento ainda é raro, foi realizado análise citogenética básicas e moleculares em *Pimelodus blochii* de quatro localidade Almeirim, Itaituba, Oriximiná e Santarém, com o objetivo de identificar e comparar os padrões citogenéticos de *P. blochii* dos rios Tapajós, Amazonas e Trombetas.

Materiais e Métodos

As amostras foram obtidas de quatro localidades na região oeste do estado do Pará, compreendendo os rios Tapajós e baixo Amazonas: 1) localidade de Itaituba (n=2); 2) localidade de Santarém (n=4); 3) localidade de Almeirim (n=4); 4) localidade de Oriximiná (n=1). Os peixes foram coletados com o auxílio de pescadores artesanais, moradores dos próprios locais de coleta, os quais utilizaram como apetrechos de pesca: malhadeiras, linha e anzol e tarrafa. Após a retirada de amostra biológica para o estudo citogenético, os peixes foram etiquetados com número de campo, fotografados e o comprimento padrão. Finalmente os espécimes foram fixados em formol a 10% e após 48h transferidos para recipientes com etanol

a 70%. Os espécimes encontram-se provisoriamente depositados no Laboratório de Genética e Biodiversidade – UFOPA.

A obtenção dos cromossomos seguiu conforme o protocolo descrito por Bertollo *et al.* (1987). Foram utilizadas análises convencionais por coloração com Giemsa, bandeamento C (Summer, 1972) e marcação das regiões organizadoras de nucléolo Ag-NOR (Howell & Black, 1980). Regiões ricas em pares de base GC foram localizadas pela marcação com Cromomicina A3 contrastada com verde metil (Schweizer 1976; Donlon & Magenis, 1983). A detecção dos sítios de DNA ribossomal 18S e 5S foram realizadas por hibridização *in situ* (FISH) de acordo com Pinkel *et al.* (1986) com modificações segundo o protocolo padronizado no LGBIO (Apêndice 5). Os sinais de hibridização foram detectados usando os anticorpos Avidina-FITC para o espectro verde e anti-digoxigenina conjugada com Rodamina para o espectro vermelho. As metáfases foram contrastadas com DAPI associado ao antifading Vectashield.

As melhores metáfases foram capturadas com câmera digital CCD acoplada ao fotomicroscópio NIKON Eclipse CI e os cariótipos foram montados com o auxílio do software Adobe Photoshop CS6. Na organização do cariótipo para o arranjo dos grupos observamos modelos previamente publicados na literatura e os pares cromossômicos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), e acrocêntricos (a), como proposto por Levan *et al.* (1964).

Resultados

Foram observados cariótipos com $2n=56$ nas amostras de Itaituba, rio Tapajós e $2n=58$ nas amostras de Santarém, Almeirim e Oriximiná, entretanto, nestes últimos nota-se variação da fórmula cariotípica, sendo $30m/sm+28a$ nas amostras de Santarém e Almeirim, e $26m/sm+32a$ nas amostras de Oriximiná (Figura 3).

O bandeamento C revelou pequeno acúmulo de heterocromatina constitutiva principalmente na região centromérica. Nas amostras de Almeirim, dois blocos heterocromáticos foram fortemente evidenciados nos braços curtos dos pares 1 e 3, o que não se repetiu nas amostras de outras localidades (Figura 4).

A Ag-NOR foi localizada em um par de cromossomo acrocêntrico na posição do centrômero (Figura 5). Este padrão de NOR foi coincidente com a localização de sondas DNAr 18S (Figura 5). Entretanto, uma marca adicional da sonda DNAr18S foi observada em posição subterminal de um cromossomo na amostra de Itaituba, sendo neste co-localizada com a sonda DNAr 5S (Figura 5E). Nas amostras de Oriximiná e Almeirim, a sonda DNAr5S marca um par

cromossômico sendo co-localizada com a sonda DNAr18S (Figura 5G, H). Na primeira, os sinais das sondas DNAr18S (verde) e DNAr5S (vermelho) apresentam-se visualizados lado a lado (Figura 5G), enquanto que na segunda parece ocorrer uma sobreposição dos sinais de fluorescência (Figura 5H). Nas amostras de Itaituba e Santarém, os sítios DNAr 5S foram observados em dois cromossomos, porém apenas um deles mostrou co-localização com a sonda DNAr18S (Figura 5E, F).

A marcação de sítios ricos em GC pela CMA3 revelou um par cromossômico marcado nas amostras de Santarém e Oriximiná, cuja localização coincide com a marcação das NOR (Figura 6).

Discussão

Estudos citogenéticos prévios em *P. blochii* mostraram a ocorrência de $2n = 58$ e $2n=56$ cromossomos com variação da fórmula cariotípica entre os diferentes locais de coleta (Farias *et al.* 2000; Silva *et al.* 2004; Della-Rosa *et al.* 1980). Tal variação também foi detectada no presente trabalho, os espécimes coletados em Santarém na confluência dos rios Tapajós e Amazonas e Almeirim (rio Amazonas) mostraram $2n=58$ e mesma fórmula cariotípica, enquanto que, espécimes de Oriximiná com $2n=58$ cromossomo mas tiveram variação da fórmula cariotípica. Amostras de *P. blochii* do rio Solimões no estado do Amazonas também apresentaram $2n=58$ (Della-Rosa *et al.*, 1980).

Por outro lado, *Pimelodus blochii* da localidade de Itaituba, rio Tapajós apresentou número diploide de $2n=56$, da mesma forma como observado em amostras do rio Araguaia (Silva *et al.* 2004). Uma diferença do número diploide de 58 para 56 poderia ser explicada por um rearranjo cromossômico do tipo fusão/fissão, enquanto que, para explicar variações do número de braços cromossômicos levando a modificação da fórmula cariotípica seriam necessários rearranjos do tipo inversão pericêntrica e/ou adição de heterocromatina levando ao aparecimento de pequenos braços curtos.

O padrão de marcação Ag-NOR simples sendo um par de cromossomo acrocêntrico marcado nas região do centrômero é o mais comum encontrado nos peixes, e tem sido previamente observado em *Pimelodus*. Entretanto, variações deste padrão com NOR localizada no braço longo de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos já foram observadas em *Pimelodus mysteriosus* (Azepelicueta, 1998), *P. ornatos* (Borin e Martins – Santos, 2002; Swarça *et al.* 2007) e *P. argenteus* (Perugia, 1891) da bacia do Paraguai e da bacia do rio Paraná.

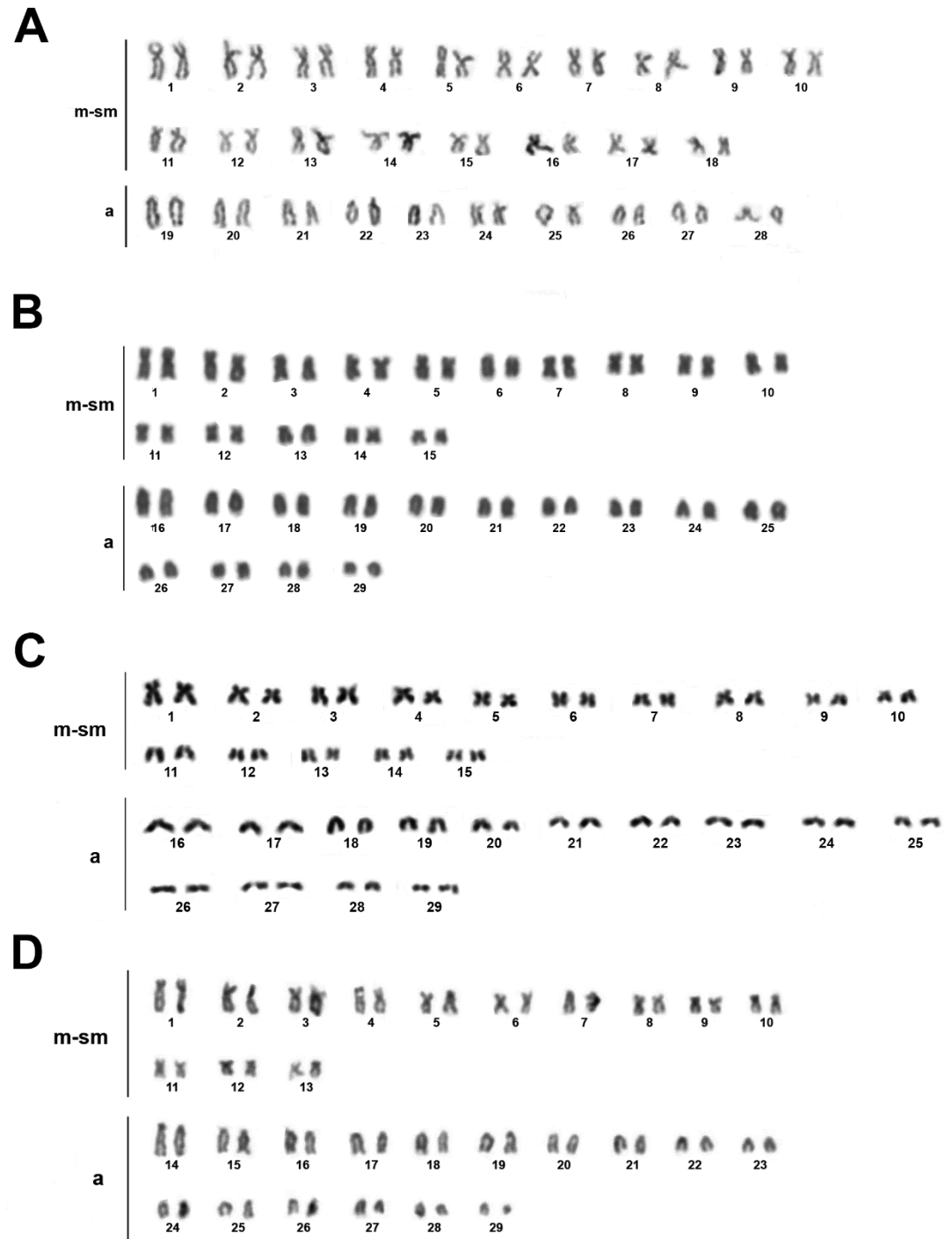


Figura 3. Cariótipo de *Pimelodus blochii* de Itaituba (A), Santarém (B), Almeirim (C), Oriximiná (D), Coloração convencional com giemsa.

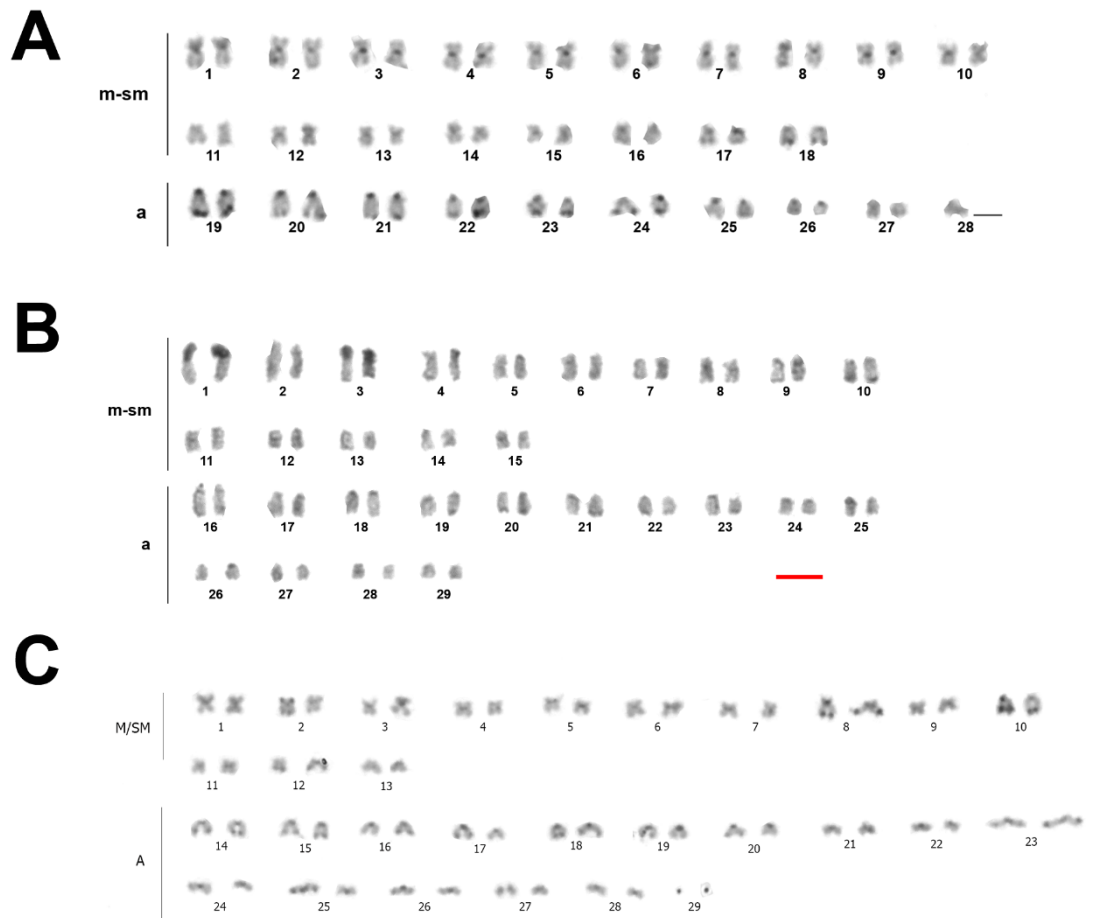


Figura 4: Padrão de bandeamento C em *Pimelodus blochii* do rio Tapajós e baixo Amazonas. A) amostra proveniente de Itaituba, B) amostra proveniente de Almeirim, C) amostra proveniente de Oriximiná.

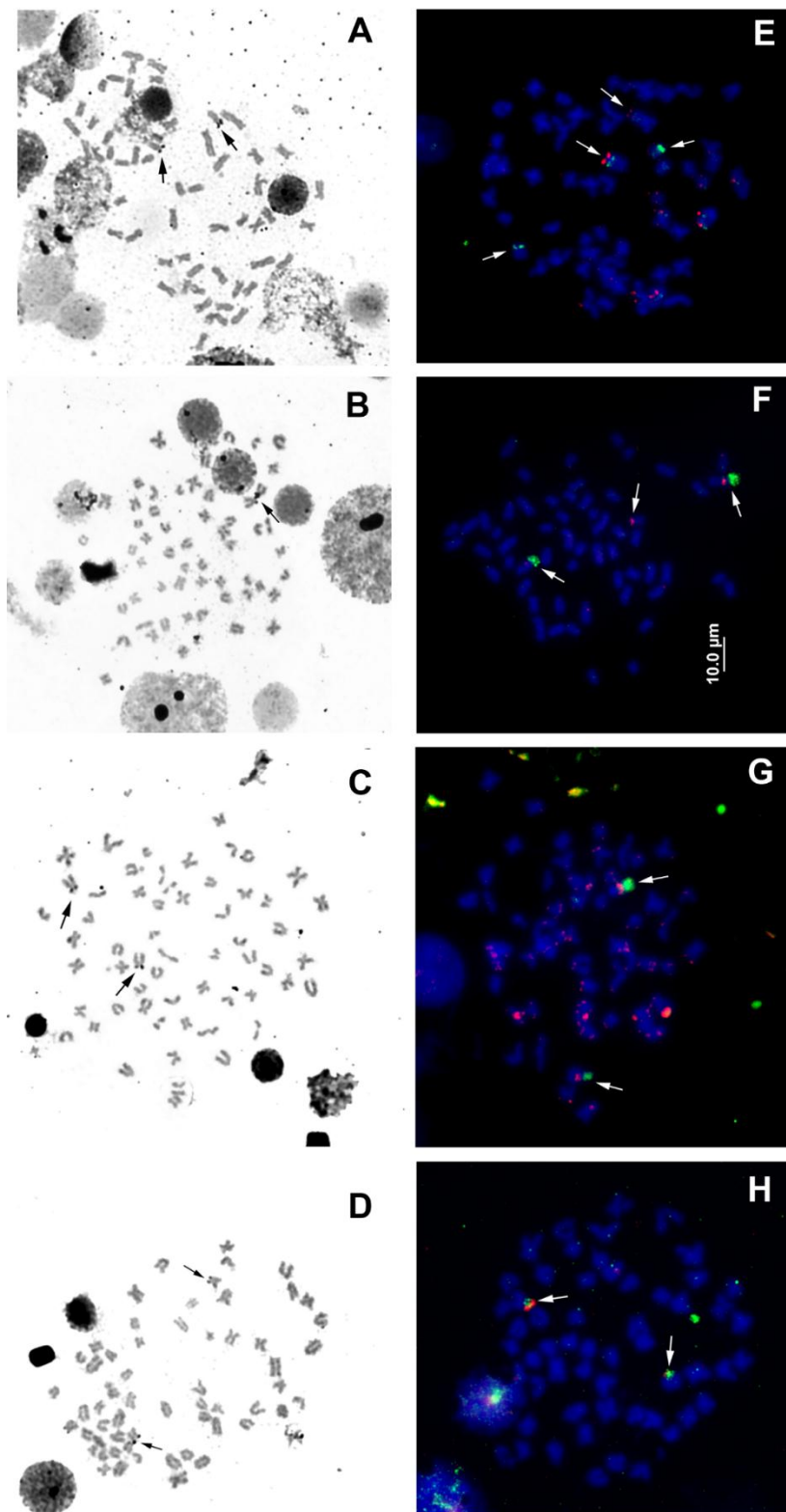


Figura 5. Metáfases de *Pimelodus blochii* evidenciando a localização da NOR (A, B, C, D) e dos sítios DNAr18S (verde) e DNAr5S (vermelho). Amostras proveniente de Itaituba (A, E) Santarém (B, F) e Oriximiná (C, G) e Almeirim (D, H).

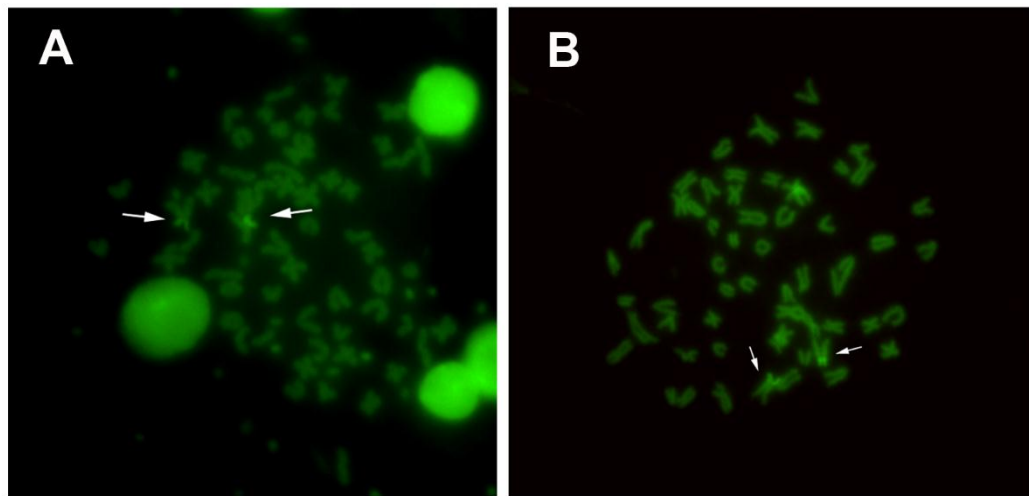


Figura 6: Metáfases de *Pimelodus blochii* mostrando sítios ricos em GC (seta) marcados por Cromomicina A₃. A) amostra proveniente de Santarém, B) amostra proveniente de Oriximiná.

A marcação de sítios GC por CMA₃ como observada no presente estudo, coincide com o padrão previamente encontrado em *Pimelodus sp* e *P. ortmani* do rio Iguaçu (Borin e Martins-Santos, 2004), *Parapimelodus nigribarbis* e *P. maculatus* no lago Guaíba, Rio Grande do Sul (Trego et al. 2008); *P. heraldoi* do rio Tabagi, *Pimelodus sp*, do rio Iguaçu; *P. argenteus*, *P. maculatus* e *P. misteriosus* do rio Paraguai (Souza et al. 2004), *P. fur*, *P. heraldoi*, *P. maculatus*, *Pimelodus sp*. (Ferreira et al. 2014), o que demonstra um alto conservadorismo destas regiões cromossômicas.

A co-localização dos sítios de DNAr5S e 18S não é um padrão comumente observado no genoma de peixes (Martins e Galetti Junior, 1999; 2001; Martins e Wasko 2004), entretanto, isto tem sido observado em algumas espécies, inclusive de *Pimelodus*, como é o caso de *P. maculatus* (Moraes-Neto, 2011). A ocorrência de sítios DNAr 5S em um par cromossômico, tal como observado no presente trabalho, já foi previamente detectada em *Pimelodus* do Alto rio Paraná, rio Paraguai, rio Iguaçu e rio Paraíba do Sul (Ferreira et al. 2014). Entretanto, o padrão com múltiplos sítios já foi observado em *Pimelodus misteriosus*, *P. paranaenses* e *P. britiski* (Sousa 2003; Girardi, 2015).

Nos estudos com Pimelodidae a presença de um par de cromossomo no sítio de DNAr 5S é esperado, no entanto em *Pimelodus* é esperado a presença de sítios múltiplos, podendo indicar a presença de rearranjos cromossômicos do tipo transposição/ translocação, o qual ocorre durante o processo de especiação do grupo (Girardi, 2015).

Conclusão

Pimelodus blochii do rio Tapajós, região de Itaituba, possui cariótipo com $2n=56$ sendo distinto de *P. blochii* do baixo Amazonas (Santarém, Almeirim e Oriximiná) que apresentam cariótipos com $2n=58$. A variação cariotípica observada apoia a hipótese de que *P. blochii* representa um complexo de espécies.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*; *Caryologia* Vol. 49, n. 1: 81-90, 1996.
- ARTONI, R. F. et al. Citogenética de peixes Neotropicais: Métodos, Resultados e Perspectivas: *Biological and Health Science* 6(1); 43-60, 2000.
- ANDREATA, A. A. et al. Chromosome Studies in Hypoptopomatinae (Pisces, siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY Sex Chromosome Heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*; *Japan Mendel Society, Cytologia* 57: pg. 369-372, 1992
- ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K. Analysis of genetic variability in three species of Pimelodidae (Ostariophysi Siluriformes): *Genet. Mol. Biol.* vol. 21 n. 4, São Paulo. 1998.
- BARTHEM, R. B., et al. *Biologia e Diversidade dos Recursos Pesqueiros da Amazônia. – Pró várzea – Manaus, 2004.*
- BARROSO, A. S., et al. Composição da Ictiofauna em Canal de Irrigação No Rio Caiapó, Tributário do Rio Araguaia (Tocantins): *Revista Integralização Universitária - RIU – ISSN: 1982-9280 - v.7, n.9 - Março/2013 – Setembro/2013.*
- BIZERRIL, C. R. S. F.; PRIMO, P. B. S: Peixes de águas interiores do Estado do Rio de Janeiro: Peixes de Águas Interiores do Estado do Rio de Janeiro/Rio de Janeiro: FEMAR – SEMADS, 2001.
- BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, C. M. Cytogenetic Aspects in Species of the Genus *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the River Paraná Basin: *The Japan Mendel Society; Cytologia* 67: 199-204, 2002.
- BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, C. M. Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the river Iguaçu. *Hereditas* 140: 201/209. Lund, Sweden, 2004.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A. GHAZZI, M. S. A.: *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil / Rio de Janeiro : Museu Nacional. 195 p., 2007;*
- BRAGA, F. M. S.; ANDRADE, P. M. Distribuição de peixes na microbacia do Ribeirão Grande, Serra da Mantiqueira Oriental, São Paulo, Brasil: *Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 95(2):121-126, 2005.*
- BRANDÃO, L. G: Peixes da Estância Ecológica SESC Pantanal: Rio de Janeiro : SESC, Departamento Nacional, 127 (Conhecendo o Pantanal ; v. 4); *Bibliografia: p. 62-68, 2008*
- BRITSKI, H. A.; LANGEANI, F. *Pimelodus paranaensis*. Sp. N.; Um Novo Pimelodidae (Pisces, Siluri-Formes) do alto Paraná, Brasil, *Revta bras. Zool., 5(3) pg. 409-417, 1988.*

BRAMMER, S. P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L. B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal; *Biotechnology/ Scientific communication*, 2013

CARVALHO, R. A. et al. Cytogenetic analysis of the 18S, 5S rDNA and B chromosome of *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes, Pimelodidae). *Braz. J. Biol*, vol. 70, no. 3, p. 631-636, 2010.

CARVALHO, R. A, et al. Chromosomal analyses in *Megalonema platanum* (Siluriformes: Pimelodidae), an endangered species from South American rivers. *Neotropical Ichthyology*, 9:177–182, 2011.

CADERNO DA REGIÃO HIDROGRÁFICA AMAZÔNICA / MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, SECRETARIA DE RECURSOS HÍDRICOS. – Brasília: MMA, 124 p, 2006;

DELLA-ROSA, V. A.; et al. Estudos citogenéticos de peixes da Amazônia. II. Ordem siluriformes. *Ciência e Cultura*, 32:735, 1980.

CIOFFI, M. B.; Marcadores Cromossômicos em *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Citogenética Comparativa entre Cariomorfos./ Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos – São Carlos, SP, 2010.

CIOFFI, M. B.; MARTINS,C.; BERTOLLO, L. A.C. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish, *Evolutionary Biology*, 10:271, 2010

CLARO-JR, L., et al. O efeito da floresta alagada na alimentação de três espécies de peixes onívoros em lagos de várzea da Amazônia Central, Brasil: *Acta- Amazonica* VOL. 34(1) 133 – 137p, 2004.

EIGENMANN, C. H. & R. S. EIGENMANN. A revision of the South America Nematognathi or catfishes. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, 1(2): pg. 1-508, 1890.

ESCHMEYER, W. N. Catalog of fishes: genera, species, references. IOP Publishing PhysicsWeb.
<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.
Accessed 25 abril, 2017.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Catalog of fishes. California Academy of Sciences. 2014. Available at www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes. Accessed May 8, 2017.

FARIA, A. A.; BRITO, J.G.; VENERE, P. C. Citogenética de Pimelodidae: Caracterização cromossômica de *Pimelodus blochii*, *Pimelodellacristatae* *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes) do médio Araguaia. In: *Proceedings of VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Manaus, pp 92, 2000.

FERREIRA, R. O., et al. Caracterização citogenética de uma espécie de *Spatuloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Xingu, (Pará, Amazônia, Brasil); *Biota Amazônia* ISSN 2179-5746; Macapá, v. 4, n. 1, p. 30-36, 2014:

ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K. Analysis of genetic variability in three species of Pimelodidae (Ostariophysi Siluriformes): Genet. Mol. Biol. vol. 21 n. 4, São Paulo. 1998.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Livro, Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético; Planaltina, DF, EMBRAPA Cerrado, 2005.

FARIA, A. A.; BRITO, J.G.; VENERE, P. C. Citogenética de Pimelodidae: Caracterização cromossômica de *Pimelodus blochii*, *Pimelodella cristata* e *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes) do médio Araguaia. In: Proceedings of VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Manaus, pp 92, 2004.

FERRARIS – JUNIOR, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of Siluriforme primary types: Magnolia Press Auckland, New Zealand ; *Zootaxa* 1418: 1–628 ,2007.

GARCIA, C., & MOREIRA - FILHO, O. 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, 3(2):285-290; São Carlos, SP, Brazil, 2005.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O; Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites, Genetics and Molecular Biology, 31, 1 (suppl), 261-264, 2008.

GALVES, W.; SHIBATTA, O. A.; JEREP, F. C. Studies on fish diversity of the upper Paraná river basin: a historical review; Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 30, n. 2, p. 141-154, 2009.

GIONGO, P.: Estudos citogenéticos em peixes do gênero *Astyanax* (Teleostei: Characiformes) das bacias dos rios Paraguai, Araguaia e Alto Paraná / Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa.. – Viçosa, MG, 2014.

GOLD, J.R.; LI, C.; SHIPLEY, N. S.; POWERS, P.K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: pg. 563-575, 1990

GUERRA, M.; FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética; Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 184p. il. ISBN – 85-89265-06-4, 2004;

GARAVELLO, J. C.; SHIBATTA, O. A. A new species of the genus *Pimelodus* La Cépède, 1803 from the rio Iguaçu basin and a reappraisal of *Pimelodus ortmanni* Haseman, 1911 from the rio Paraná system, Brazil (Ostariophysi: Siluriformes: Pimelodidae), Neotropical Ichthyology, 5(3):285-292, 2007.

HOFFMANN, A. C., ORSI, M. L., SHIBATTA, O. A.: Diversidade de peixes do reservatório da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Cativara), Rio Paranapanema, bacia do alto rio

Paraná, Brasil, e a importância dos grandes tributários na sua manutenção: Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 95(3):319-325, 30 de setembro de 2005.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver – staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1 – step method. *Experientia*, v . 36, p. 1014 – 1015, 1980.

ICMBIO,; INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE: Plano de Manejo Reserva Extrativista Tapajós-Arapiuns Volume 1 - Diagnóstico - Brasília - DF,2014.

JÚNIOR, G. J. S., *et al.*; Levantamento dos Impactos Causados Pelos Empreendimentos nas Proximidades do Lago do Juá - Santarém/PA;15º Congresso Brasileiro de Geologia de Engenharia e Ambiental, 2012

Lacadena, J. R.; *Citogenética*. Editorial Complutense, S. A. Madri, Espanha, 928p, 1996.

Disponível em

<>https://books.google.com.br/books?id=vcmrqr8fdksc&pg=pa5&lpg=pa5&dq=citogen%20%20a9tica.+editorial+complutense&source=bl&ots=ljj2lghh6d&sig=2fxlubidturfxopr7cosoh9ixvk&hl=pt-pt&sa=x&ved=0ahukewj60ej-t5_kahucxd4khztmcwoq6aeiqdaf#v=onepage&q=citogen%20%20a9tica.%20editorial%20complutense&f=false // Acesso em: 09 de outubro 2015

LANGANI, F. *et al.* Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras: *Biota Neotropica*, v7 (n3) - bn0340703, 2007.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO,P.I.; Biodiversidade Brasileira. In: Síntese do Estado atual do conhecimento. Editora Contexto, 2002

LI, Y.C., *et al.*; E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 2453-2465. 2002.

LIU, Z., *et al.*; Microsatellite-Containing Genes from the Channel Catfish Brain: Evidence of Trinucleotide Repeat Expansion in the Coding Region of Nucleotide Excision Repair Gene RAD23B; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 317–324 (2001).

SOUZA, L.; SWARCA, A. C.; DIAS, A. L. Analysis of the nucleolus organizer regions in 5 species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae), using AgNO₃, CMA3 and FISH with the 18S rDNA probe, *Caryologia*, 57:2,144-150, 2004.

LUNDBERG J. G.; LITTMANN M. W. Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (eds) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America, Edipucrs, Porto Alegre, pg. 432–446, 2003

MALABARBA, L. R., *et al.* Guia de Identificação dos Peixes da Bacia do Rio Tramandaí. / – Porto Alegre: Ed. Via Sapiens, 2013.

MARQUES, D. F., *et al.* Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River: *Neotropical Ichthyology*, 11(2):459-466, 2013.

MACIEL, L. G, SANTOS, J. S, ARAÚJO, J. A. Relação das características morfométricas externas do mandi (*Pimelodus blochii*) em relação ao seu potencial de produção de filé: Revista AGROTEC – v. 35, n. 1, p 113–120, 2014.

MARTINS, C.; GALETTI-JUNIOR, P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7:363–367, 1999.

MARTINS, C.; GALETTI JUNIOR, P. M. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes?. *Genetica* 111:439–446, 2001.

MARTINS, C; WASKO, A. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR (ed) *Focus on Genome Research*, Nova, New York, pp 335–363, 2004

MELO. D.C., *et al.* Genetic characterization of six commercial stocks of tilapia (*Oreochromis spp*) using microsatellite markers: *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.1, p.87-93, 2006

MORELLI, S. *et al.*; Cytogenetic Considerations On The Genus *Asty Anax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic Variability; Published online: 31 Jan 2014. ISSN: 0008-7114 (Print) 2165-5391 (Online)
Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/tcar20>

NELSON, J. S. *Fishes Of the world*. John Wiley & Sons. New York. Ed 4:600. 2006

NETO, A. M., *et al.* Karyotype variability in neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes): *Neotropical Ichthyology*, 9(1); 97-105, 2011.

NIRCHIO, M., J. I. *et al.* Cytogenetic analysis of three species of the genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita island, Venezuela. *Genetic*, 131: pg. 135-140, 2006.

NIRCHIO, M., *et al.* Chromosome evolution in fishes: a new challenging proposal from Neotropical species: *Neotropical Ichthyology*, 2014

OBA, E. T., *et al.*; Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para manejo rentável: *Manejo e Sanidade de Peixe em Cultivo*: Embrapa, Amapá, Macapá, 2009.

OYAKAWA, O. T.; MATTOX, G. M. T. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species: *Neotropical Ichthyology*, 7(2):117-140, 2009.

OLIVEIRA, C.; GOSZTONYI A.E.: A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriforms. *Caryologia*, 53(1): pg. 31-37, 2000.

OLIVEIRA, R. R., SOUZA, I. L., VENERE, P. C.: Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003: Neotropical Ichthyology, 4(1):93-97, 2006.

Oliveira, *et al.*; Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations: Fish Physiol Biochem 35:81–100, 2009.

OLIVEIRA, M. L. M. Mapeamento físico de sequências repetitivas de DNA no genoma de espécies do gênero *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae). Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, SP, 2015.

OZOUF-COSTAZ, C., *et al.*: Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish; Antarctic Science 16 (1): 51–57, 2004.

OURRA, A. K., & MOREIRA, M. S. P. P.; Rima AHE São Luiz do Tapajós:
Disponível em <http://www.grupodeestudostapajos.com.br/site/wp-content/uploads/2014/08/RIMA_SLT.pdf // Acesso em 25 de Novembro 2015.

Paxton, J.R.; Eschmeyer, W.N. Encyclopedia of fishes. Academic Press, San Diego, 1995.

PERAZZO, G. X.; Análise Citogenética de Cichlidae (Perciformes, Pisces) do Sul do Brasil: Dissertação (Mestrado em Genética); CURITIBA, 2010.

PISANO, E.; GHIGLIOTTI, L. Ribosomal genes in notothenioid fishes: Focus on the chromosomal organisation: Elsevier B.V. All rights reserved; Marine Genomics 2, pg.75–80, 2009.

PRADO, F. D., *et al.*; Cytogenetic characterization of F1, F2 and backcross hybrids of the Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Pimelodidae, Siluriformes), Genetics and Molecular Biology, Printed in Brazil 35, 1, pg. 57-64, 2012.

RICARDO S.; ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Peixes : Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção :
Disponível em <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/livro-vermelho/volumeII/Peixes.pdf> . Acesso em 9 de março de 2015.

RIBEIRO, F. R. V.; LUCENA, C. A. S. Nova espécie de *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) dos rios Tapajós e Tocantins, Brasil, Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 96(3):321-327, 2006.

RIBEIRO, F. R. V.; LUCENA, C. A. S.; LUCINDA, P. H. F. Three new *Pimelodus* species (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio Tocantins drainage, Brazil, Neotropical Ichthyology, 6(3): pg. 455-464, 2008.

RIBEIRO, F. R. V., LUCENA, C. A. S., E OYAKAWA, O. T.; A new species of *Pimelodus* La Cépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) from rio Ribeira de Iguape basin, Brazil, Neotropical Ichthyology, 9(1): pg. 127-134, 2011.

ROCHA, M. S.; ZUANON J. Pimelodidae. In: Queiroz, L. J. de; Torrente-Vilara, G.; Ohara, W. M.; Pires, T. H. Da S.; Zuanon, J.; DORIA C. R. da C (Org.). Peixes do rio Madeira. Vol. III. São Paulo, Santo Antonio Energia, 413, 2013.

ROCHA, M. S. Sistemática e Filogeografia de *Pimelodus blochii* (Siluriformes: Pimelodidae) da Amazônia, dissertação Mestrado (Instituto Nacional De Pesquisas Da Amazônia – Inpa, Universidade Federal Do Amazonas – Ufam), 2006.

SANTOS, G. M.: Composição do Pescado e Situação da Pesca no Estado de Rondônia: ACTA AMAZÔNICA, 16/1? (n9 único): Sup.3 - 84- 1986/87.

SARMENTO-SOARES, L. M.; MAZZONI, R., MARTINS-PINHEIRO, R. F.: A fauna de peixes dos Rios dos Portos Seguros, extremo sul da Bahia, Brasil: BOL. MUS. Biol. Mello Leitão (N. SÉR.) 24:119-142, 2008.

SÁNCHEZ, S.; FENOCCHIO, A. S.; JORGE, L. C. . Estudios citogenéticos en peces de la familia Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) de la cuenca del río Paraná, Argentina. Análisis cromosómico de dos especies de Luciopimelodinae. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000.

UNNE, IOP Publishing PhysicsWeb:

http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/4_veterinarias/v_pdf/v_050.pdf

Acessado maio de 2017.

SILVA, L. V. B.; ABREU, M. F.; SOUZA, I. L.; VENERE, P. C. Caracterização Cromossômica de *Hemisorubim platyrhynchos*, *Sorubim lima* e *Pimelodus blochii* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) do Médio Araguaia. In: *Proceedings of X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Natal, RN pp. 132, 2004.

SOUZA, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L.; Banding Chromosome Pattern of Two Species of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Parana River Basin of Brazil, *Folia biologica* (Kraków), vol. 52,pg. 3-4, 2004.

SOUZA, L., *et al.*,; Analysis of the nucleolus organizer regions in 5 species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae), using AgNO₃, CMA3 and FISH with the 18S rDNA probe; s (Siluriformes, Pimelodidae), using AgNO₃, CMA3 and FISH with the 18S rDNA probe, *Caryologia*, 57:2,2004 144-150, 2004

SOUZA, L.; SWARCA, A.C.; DIAS, A.L; Analysis of the nucleolus organizer regions in 5 species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae), using AgNO₃, CMA 3 and FISH with the 18S rDNA probe, *CARYOLOGIA* Vol. 57, no. 2: pg. 144-150, 2004.

SOUZA-FILHO, H.S, E. SHIBATTA, O. A. Descrição de uma espécie nova de *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) da bacia do alto rio Paraguai, Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 97(4):472-480, 2007.

SUEMITSU, C.; NOVAIS, J. S.; VARGAS, J. T. Notas florísticas sobre o entorno do lago do Juá, margem direita do rio Tapajós, baixo amazonas, Pará. 64º Congresso Nacional de Botânica. Belo Horizonte. 2013.

SUMMER, A. T. A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl Cell Res* 75; 304 – 306, 1972.

SUMNER, A. T. Chromosomes: organization and function. London: Blackwell Publishing company, 2003. Disponível em <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=goSCosFLcvUC&oi=fnd&pg=PR5&dq=+Chromosomes:+organization+and+function.+&ots=TbekBt08eN&sig=t13DGJCVCKEO42SkyQNV7ePsfRw#v=onepage&q=Chromosomes%3A%20organization%20and%20function.&f=false> // Acesso em 08 de setembro de 2015 .

SWARÇA A. C. , CAETAN, L. G., & DIAS. A. L.: Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 23, 3, 589-593, Londrina, PR, Brasil, 2000.

SUARÇA, A. C., *et al.* Analyses of nucleolus regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae); *Genetica* 110; 97-100, 2001.

SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A. F., DIAS, A. L. An update Cytogenetic Review for Species of the Families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a Cytotaxonomical Classification; *CARYOLOGIA* Vol. 60, no. 4: pg. 338-348, 2007.

SWARÇA, A.C; SANCHEZ, S, DIAS, A. L, FENOCCHIO, A. S. Cytogenetics of the Porthole Shovelnose Catfish, *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae), a widespread species in South American rivers, comparative cytogenetics 7(2): pg. 103–110, 2013.

SWARÇA, A. C, DIAS, A.C, FENOCCHIO, A. S. Cytogenetic studies in the redbtail catfish, *Phractocephalus hemiliopterus* (Bloch & Schneider, 1801) (Siluriformes, Pimelodidae) a giant fish from Amazon basin; *Comparative Cytogenetics* 11(1): pg. 119–128, 2017.

TORRES. R. A.; MATOSO, D. A.; ARTONI. R. F.: Genética de Peixes Neotropicais. II. *Biologia Molecular de Peixes Neotropicais*; Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, 10 (2): 27-37, jun. 2004.

THOMAS, J, *et al.*; The limited distribution of Helitrons to vesper bats supports horizontal transfer, *Gene* 474 pg. 52–58, 2011.

Treco, F. R., *et al.*, Uma contribuição a citogenética do gênero *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), trabalho apresentado no 51º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2005.

TRECO, F. R, MALABARBA, L. R, GIULIANO-CAETANO, L, DIAS, A. L. Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil, Neotropical Ichthyology, 6(1):87-92, 2008

VAL, A. L. *et al.*: Livro: Amazônia: Recursos Hídricos E Sustentabilidade: Capítulo 6, 2010; disponível em <><http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-812.pdf> // Acesso em 12 de Agosto de 2015.

Apêndices

Apêndice A. 1. Espécimes de *Pimelodus blochii* colecionados no presente trabalho

Nome comum	Espécie	Localidade	C. padrão (mm)	Peso (g)
1. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Santarém	138	43
2. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Santarém	135	52
3. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Santarém	134	50
4. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Santarém	133	47
5. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Santarém	135	49
6. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Santarém	125	25
7. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Santarém	18	49
8. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Santarém	100	60
9. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Santarém	94	20
10. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Santarém	104	25
11. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	133	32
12. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	135	35
13. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	159	87
14. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	165	60
15. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	149	48
16. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	132	30
17. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	155	54
18. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	130	42
19. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	140	47
20. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	135	42
21. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	145	44
22. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	150	55
23. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	144	56
24. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	143	61
25. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	132	45
26. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	130	42
27. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	145	63
28. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	135	43
29. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	175	67
30. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	140	57
31. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	163	65
32. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	130	32
33. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	139	42
34. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	140	31
35. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	155	56
36. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	142	54
37. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	144	56
38. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	139	41
39. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	130	44
40. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	132	56
41. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Tapajós, Orla da cidade de Itaituba	145	48
42. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	128	47
43. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	140	63
44. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	110	30
45. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	134	51
46. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	110	38
47. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	134	47
48. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	126	44
49. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	105	22
50. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	125	41
51. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	120	36
52. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	127	43
53. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	130	47
54. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	140	51
55. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	138	26
56. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	164	38
57. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	143	49
58. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	125	39

59. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	122	32
60. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	118	33
61. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	107	25
62. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	107	25
63. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	108	33
64. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	120	32
65. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	122	43
66. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	123	38
67. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	-	-
68. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	-	37
69. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	123	42
70. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Trombetas, Orla da cidade de Oriximiná	115	32
71. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	91	9
72. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	92	9
73. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	85	9
74. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	78	7
75. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	88	10
76. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	90	12
77. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	77	6
78. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	80	7
79. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	84	8
80. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	97	11
81. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	72	4
82. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	79	7
83. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	78	7
84. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	86	8
85. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	87	9
86. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	83	7
87. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	70	5
88. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	75	6
89. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	79	7
90. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	78	5
91. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	77	10
92. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	70	5
93. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	76	6
94. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	77	6
95. mandi	<i>P. blochii</i>	Rio Amazonas, Próximo cidade de Almeirim	67	5

Apêndice 2: Protocolo de preparação citogenética de peixes modificado de Bertollo et al (1987)

1. Injetar, na cavidade intraperitoneal, uma solução aquosa de colchicina 0,025% na proporção de 0,01 ml/g do peso do animal;
2. Deixar os peixes em tanque bem aerado por um período de 30 a 40 minutos.
3. Decorrido esse tempo, anestésiar o peixe por imersão em banho de eugenol, sacrificar o animal e retirar o rim;
4. Fazer lâmina com material gônadal para identificação do sexo;
5. Colocar o rim em uma placa de vidro contendo solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075M;
6. Fragmentar bem o tecido (rim) com auxílio de pinças de dissecação, e transferir o material para outra placa de petri. Completado esse processo com seringa desprovida de agulha, aspirando suavemente o material até se obter uma suspensão homogênea;
7. Transferir a suspensão obtida para o tubo falcon de 1,5 ml adicionar 10 ml de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075M e deixar a estufa a 37°C por 20 minutos;
8. Ressuspender cuidadosamente o material com auxílio de uma pipeta de Pasteur, em seguida adicionar 0,5 ml de fixador Carnoy (álcool metílico: ácido acético 3:1) recém preparado e gelado;
9. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm, descartando em seguida o sobrenadante;
10. Adicionar com cuidado 5 ml de fixador Carnoy, deixando escorrer através da parede do tubo; ressuspender cuidadosamente o material com auxílio de uma pipeta de Pasteur;
11. Repetir os itens 7 e 9 por mais duas vezes. Após a última centrifugação, depois de descartar o sobrenadante acrescenta-se cerca de 1 a 2 ml de fixador.
12. Gotejar 10 a 15 ul da suspensão celular sobre uma lâmina limpa e previamente umedecida com ar da boca, e colocar no banho Maria a 50°C para secagem;

Apêndice 3: Protocolo para a técnica de bandeamento C segundo Sumner (1972), com modificações.

1. Lâminas com 5 dias de envelhecimento, descoradas ou virgem
2. Tratar a lâmina preparada com HCl 0,2 N A 42°, por 2 minutos;
3. Lavar em água deionizada, á temperatura ambiente;
4. Incubar a lâmina, por cerca de 1 minuto e 30 segundo, em solução de hidróxido de bário a 5%, filtrada e recém preparada a 42° C;
5. Interromper a ação do hidróxido de bário, imergindo rapidamente a lamina em solução HCl 0,2 N (temperatura ambiente) e lavar em água destilada;
6. Incubar a lâmina em solução 2XSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trisódico 0,003M, pH 6,8) em banho-maria a 60° C, por um período de 25 minutos;
7. Lavar várias vezes em água destilada e secar ao ar.
8. Corar com Giemsa (diluído a 5% em tampão de fosfato 0,06M e pH 6,8), por 25 minutos;
9. Lavar com água destilada e secar ao ar.

Apêndice 4: Protocolo para a técnica de marcação da NOR por nitrato de Prata (Howell & Black, 1980)

1. Lâmina com no mínimo 72 horas de envelhecimento, descorada ou virgem;
2. Colocar a lâmina com material em HCl 0,2N, 37°C por 10 minutos;
3. Lavar e secar;
4. Pingar sobre a lâmina uma gota de uma solução coloidal de gelatina;
5. Adicionar sobre a gota de gelatina, duas gotas de solução aquosa de AgNO₃ (nitrato de prata) a 50% ;
6. Cobrir com lamínula e colocar em uma câmara úmida, em banho-maria a 60°C por um período de 5 minutos;
7. Após decorrido o tempo, quando a lâmina atingir uma coloração marrom dourada, lavar em água destilada permitindo que lamínula seja retirada pela água;

8. Deixar secar ao ar;
9. Corar com Giemsa na proporção 14:0,5 por 1 minuto e meio

Apêndice 5: Protocolo de hibridização in situ fluorescente (FISH) para hibridizar duas sondas simultâneas (Double-FISH).

Tratamento de RNase (Se for sonda telomérica é dispensável; se for sonda DNAr é indispensável)

1. As lâminas foram lavadas em tampão PBS 1x durante 5min. Em temperatura ambiente. (shaker);
2. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min. Cada (secar);
3. As lâminas foram incubadas em 90 μ de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida com água mili-Q;
4. Lavar 3x por 5 minutos em 2xSSC;
5. Lavar durante 5 min em PBS 1x

Fixação

6. Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente;
7. Lavar em PBS 1x por 5 minutos (shaker);
8. Desidratar as lâminas em séries alcoólicas (70, 85 e 100%), por 5 minutos cada;

Pré – hibridação

9. Simultaneamente a desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de hibridização a 99 °C (água aquecida em bécker) por um período de 10 minutos e passa-la imediatamente ao gelo;
10. Desnatura o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 5 minutos (Só aquecer a formamida na hora do uso). A água do banho maria tem que estar a altura do frasco com a formamida que após o uso pode ser reutilizada.
11. Desidratar o material em série alcoólica 70, 85, 100% durante 5 minutos cada. PS. O álcool a 70% deverá está a -20 °C;

Hibridação

Coloca 40µl de solução de hibridação sobre cada lamínula e inverter a lamina sobre a lamínula. Manter as laminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37 °C *overnight*;

Lavagem segundo dia

12. Lavar 2 vezes com formamida 15% a 42 °C durante 42 minutos cada (shaker);
13. Lavar as lâminas durante 5 minutos em solução Tween 0,5%, temperatura ambiente (shaker);

Detecção do sinal

14. Incubar as lâminas em tampão FNDM por 15 minutos (não balançar);
15. Lavar 2 vezes com Tween 5% temperatura ambiente por 5 minutos (shaker);
16. Para FISH dupla: mix contendo;
 - a) Prepara (8 lâminas); (2µL de estreptavidina + 998 µL de NFDN);
 - b) Para cada lâmina;
 - 20µL anti digoxigenina-rodamina (1:200)
 - 100µL da solução preparada no passo a (estreptavidina + NFDN);
17. Colocar sobre a lamínula 100 µl do mix (antidigoxigenina + estreptavidina/NFDN). Inverter a lâmina sobre a lamínula. Incubar a lâmina por 40 minutos em úmida a 37°C
18. Lavar 3 vezes com Tween 0,5% temperatura ambiente por 5 minutos (shaker);
19. Desidratar o material em séries alcoólica 70, 80 e 100% durante 5 minutos cada. Ao final esperar secar

Montagem:

20. Montar a lâmina com 20 µl de antifade + 1 µl de DAPI (para cada lâmina) e cobrir com lamínula. Colocar sobre cada lamínula 21µl do meio de montagem.

Apêndice 5: Protocolo para a técnica de marcação por Cromomicina A3 e DAPI (Schweizer, 1976).

1. Laminas envelhecidas
2. Colocar sobre a lamínula 200 μ l de CMA₃ por 40 minutos; lavar com tampão McILvaine, pH 5,6; secar a temperatura ambiente
3. Incubar no Verdi metil por 40 minutos; lavar com tampão McILvaine, pH 5,6; secar a temperatura ambiente
4. Colocar 200 μ l de DAPI e cobrir com lamínula por 40 minutos; lavar com tampão McILvaine, pH 5,6; secar a temperatura ambiente
5. Montas lâmina-lamínula com antifade Vectashield, retirar o excesso em bloquinho de papel filtro;
6. Selar com esmalte e guardar na geladeira em uma caixa escura para impedir a penetração de luz pelo período de 2 a 4 dias.