



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

LUAN AÉRCIO MELO MACIEL

**ANÁLISE CITOGENÔMICA EM *Hypostomus soniae* Carvalho &
Weber, 2004 (SILURIFORMES - LORICARIIDAE) DO RIO
TAPAJÓS, PARÁ, BRASIL**

**Santarém-PA
2019**

LUAN AÉRCIO MELO MACIEL

ANÁLISE CITOGENÔMICA EM *Hypostomus soniae* Carvalho & Weber, 2004 (SILURIFORMES - LORICARIIDAE) DO RIO TAPAJÓS, PARÁ, BRASIL

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Biociências, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará; Área de concentração Fisiologia Ambiental.

Orientador: Prof^o Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues.

**Santarém-PA
2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFOPA**

- M152a Maciel, Luan Aécio Melo
Análise citogenômica em *Hypostomus soniae* Carvalho&Weber, 2004 (Siluriformes – Loricariidae) do Rio Tapajós, Pará, Brasil / Luan Aécio Melo Maciel. - Santarém, 2019.
51 f. : il., color.
- Orientador: Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-graduação em Biociências.
1. Acari. 2. Fish. 3. DNA repetitivo. 4. Histona. 5. snRNA U2. I. Rodrigues, Luis Reginaldo Ribeiro, *orient.* II. Título.

CDD: 23. ed. 597.49098115

LUAN AÉRCIO MELO MACIEL

**ANÁLISE CITOGENÔMICA EM *Hypostomus soniae* Carvalho
& Weber, 2004 (SILURIFORMES - LORICARIIDAE) DO RIO
TAPAJÓS, PARÁ, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Biociências, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará: Área de concentração Fisiologia Ambiental.
Orientador: Prof^o Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues.

Conceito: Aprovado

Data de Aprovação: 29/03/2019



Prof. Dr. Luís Reginaldo R. Rodrigues –Orientador
UFOPA-ICED



Prof. Dr. Carlos Ivan Aguilar Vildoso –Membro Avaliador
UFOPA-IBEF



Prof. Dr. Frank Raynner V. Ribeiro –Membro Avaliador
UFOPA-ICTA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e meus irmãos, pelo apoio incondicional durante essa longa jornada, eles são a motivação de todo meu esforço.

AGRADECIMENTOS

É com grande satisfação que manifesto meus agradecimentos a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

Primeiramente agradeço à Deus, que está sempre presente em minha vida, obrigado pela saúde, pelo amparo nos momentos de dificuldades e pelas graças concedidas.

Ao meu orientador, professor Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues, por ter aceito o desafio de me orientar, pela paciência, pelos sábios ensinamentos e dedicação durante a rotina de trabalho, pelo elevado nível de exigência e comprometimento com a pesquisa, por ter me apresentado a outros grupos de pesquisa, o que expandiu meus horizontes, muito obrigado professor.

Ao professor Albino Sousa, por ter me inserido na carreira científica e ter descoberto em mim um potencial que nem eu mesmo sabia que tinha, pelo planejamento traçado para este momento chegar, pela confiança, amizade e conversas entusiasmadas de motivação, por ter me apresentado ao Prof. Luís e assim tornar possível a participação no grupo LGBio.

Aos meus pais Lúcia e Anselmo, por acreditarem em mim, desde sempre proverem condições para eu estudar e seguir em frente, me motivando a nunca desistir, e à meus irmãos Lucas e Jamille pela união, exemplo, confiança e palavras de carinho.

À minha avó Delfina Maciel, pelo seu amor, atenção, orações e suas sábias palavras comigo.

À Ivanny Fonseca pela receptividade, paciência e dedicação durante meu treinamento inicial em citogenética, e por ter contribuído para aumentar meu interesse em atuar neste campo de pesquisa.

Ao senhor Leandro da empresa Tapajós Aquariuns e a senhorita Cleide do projeto Arapaima pela parceria com o LGBio e disponibilidade em conceder voluntariamente espécimes para o presente estudo.

Ao Mendelsohn Souza que com seu espírito de equipe contribuiu imensamente na elaboração de mapas, preparações cromossômicas, edição e montagem de cariótipos, pela sua disponibilidade e eficácia em ajudar com os mais variados problemas de informática enfrentados ao longo desses dois anos.

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

Ao Dr. Júlio Pieckzarca e Dra. Renata Noronha ambos da UFPA, pelo apoio e por possibilitarem o estágio no Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade (CEABIO).

Ao Bruno Almeida e Luan pela contribuição na execução da técnica de complexo sinaptonêmico em peixes.

À Manoela Gemaque pela confiança, disponibilidade e paciência em ensinar as técnicas de FISH.

Ao amigo Leoni pela disponibilidade em mostrar a edição de imagens e montagem de cariótipos utilizando o software Karyotype.

À dona Iró, por sua atenção, preocupação, carinho e pela confortável estadia ofertada em sua residência durante o período que estive em Belém.

A todos os demais membros da família LGBio: Karen, Thaís, Heveline, Alcimara, Aline, Dyennef, Cassiano, Wander, Jaína, pelo trabalho em equipe durante as mais variadas atividades, pelo aprendizado adquirido diariamente durante as jornadas de trabalho, pelas trocas de informações nos momentos dos seminários e prévias.

Aos meus tios Aurimar e Socorro Maciel que nunca hesitaram em me ajudar, pelos conselhos e estadia em sua casa sempre que precisei.

A Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, e ao programa de Pós-graduação em Biociências, que possibilitaram a realização de minhas atividades.

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.

E meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desse estudo, muito OBRIGADO!!!

EPÍGRAFE

“ O otimismo é a fé em ação. Nada se pode levar a efeito sem otimismo”.

Helen Keller

RESUMO

O presente estudo aborda a caracterização citogenômica de *Hypostomus soniae* Carvalho & Weber, 2004, esta espécie é endêmica da bacia do rio Tapajós, conhecida como acari violeta, configura-se como um importante recurso natural comercializada no mercado de aquarofilia na região Oeste paraense. Este trabalho tem por objetivo investigar a carioevolução de *Hypostomus soniae* provenientes do rio Tapajós. Foram realizadas análises citogenéticas em dez exemplares, destes 6 eram fêmeas, 3 machos e 1 espécime com sexo não identificado. Foram utilizadas técnicas de coloração convencional por Giemsa, bandeamento C, marcações de Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs), Cromomicina A3 (CMA3) e hibridização in situ fluorescente (FISH) com sondas DNAr 18S e 5S, teloméricas, Histonas H1 e H3 e snRNA U2. Os resultados revelaram cariótipo com $2n=64$, $NF=112$ e $FC=12m+22sm+14st+16a$. O bandeamento C evidenciou heteromorfismos de blocos heterocromáticos nos pares 25 e 26, que podem estar associados com o desenvolvimento de um sistema sexual nascente tipo XX/XY. NORs foram detectadas em regiões teloméricas de um par acrocêntrico, exceto no espécime PMT-36 que mostrou dois pares acrocêntricos, em concordância com sítios CMA3 e rDNA 18S. Três pares mostraram marcados para sondas DNAr 5S e as sondas teloméricas mostraram sinais nas extremidades de todos os cromossomos. O mapeamento físico de genes de Histonas (H1 e H3) em *H. soniae* revelaram clusters em dois pares cromossômicos, indicando um caráter conservado das sequências; DNA repetitivo snRNA U2 foram detectados na região distal da maioria dos pares cromossômicos. Os resultados obtidos confirmam a conservação da macroestrutura cariotípica de *H. soniae* entre populações do rio Tapajós e reforçam a hipótese de ocorrência de sistema sexual cromossômico e polimorfismo intraespecífico.

Palavras-Chave: Acari, FISH, DNA repetitivo, Histona, snRNA U2.

ABSTRACT

The present study addresses the cytogenetic characterization of *Hypostomus soniae* Carvalho & Weber, 2004, this specie is endemic to the Tapajós river basin, know as acari violet, is an importante natural resource marketed in the aquarium market in the West region of Paraense. The present study aims to investigate the karyoevolution of *H. soniae* from Tapajós River. Were analyzed ten specimens, of these six were females, three males and one unidentified specimen. Were used techniques of Giemsa staining, C-banding, Ag-NOR, Cromomycin A3 (CMA3) and fluorescent in situ hybridization (FISH) with rDNA 5S and 18S, telomeric, histone H1 and H3, snRNA U2 probes. The results revealed karyotype with $2n=64$, $NF=112$ e $FC=12m+22sm+14st+16a$. The C-banding evidenced heteromorphism of heterochromatic blocks in the pairs 25 and 26, that may related with development of a nascent XX/XY sex chromosome system. NORs were detected in the telomeric regions of an acrocentric, except to the specimen PMT-36 that showed two labeled pairs, in agreement with CMA3 and rDNA 18S evidences. Three pairs showed marks to rDNA 5S probes and the telomeric probes labeled the extremity of all the chromosomes. We mapped for the first time H1 and H3 histones and snRNA U2 in the karyotype of *H. soniae*, and then H1 and H3 revealed clusters in two chromosomal pairs, pointed to conservative status of these sequences; snRNA U2 probes were detected in the distal portions in the most of the chromosomes. The results confirm the conservatism of *H. soniae* karyotypic macrostructure between Tapajós and Teles Pires Rivers populations and reinforces the hypothesis of occurrence of sex chromosome system and intraspecific polymorphism.

Key-words: Acari, FISH, repetitive DNA, Histone, snRNA U2

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Filogenia demonstrando a monofilia de Loricariidae.....	18
Figura 2-Aspectos da coloração e morfologia externa de <i>Hypostomus soniae</i> . A barra equivale a 1cm.	27
Figura 3-Localização da procedência geográfica dos espécimes de <i>Hypostomus soniae</i> do rio Tapajós (PA) analisados no presente trabalho (círculo vermelho).....	28
Figura 4-Cariótipo convencional de <i>Hypostomus soniae</i> (ARAP-3, fêmea) do rio Tapajós (PA)..	32
Figura 5-Cariótipo convencional de <i>Hypostomus soniae</i> (PMT-36) do rio Tapajós (PA).....	32
Figura 6-Cariótipo de <i>Hypostomus soniae</i> (ARAP-5, macho) com coloração por Giemsa, mostrando marcações heterocromáticas feito pela técnica de bandeamento C, mostrando blocos heterocromáticos no par 26.....	33
Figura 7-Cariótipo de <i>Hypostomus soniae</i> (PMT-140, fêmea) com coloração por Giemsa, mostrando marcações heterocromáticas feito pela técnica de bandeamento C, mostrando blocos heterocromáticos nos pares 25 e 26.....	33
Figura 8-Cariótipo de <i>Hypostomus soniae</i> (PMT-36) com coloração por Giemsa, mostrando marcações heterocromáticas feito pela técnica de bandeamento C.....	33
Figura 9-Cariótipo de <i>Hypostomus soniae</i> (ARAP-4, fêmea) com coloração por nitrato de prata, mostrando as marcações nas Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) na região distal do par 28.....	34
Figura 10- Cariótipo com marcação de sítios DNAr 18S em <i>Hypostomus soniae</i> , (ARAP-4, fêmea) mostrando as marcações de sítios DNAr 18S na região distal do par 28.....	34
Figura 11- Localização das NORs e sítios DNAr 18S de <i>Hypostomus soniae</i> (PMT-36). A dupla marcação por Cromomicina3/DAPI revela os sítios ricos em pares de base GC.....	35
Figura 12- Cariótipo com marcação de sítios DNAr 5S em <i>Hypostomus soniae</i> , (ARAP-5, macho) mostrando as marcações de sítios DNAr 5S nos pares 19, 25 e 26.....	35
Figura 13- Cariótipo com marcação de sondas teloméricas em <i>Hypostomus soniae</i>	35
Figura 14-Metáfases de <i>Hypostomus soniae</i> marcadas por sondas de DNA repetitivo: Histona H1, Histona H3. Os sinais de hibridização fluorescem em verde.....	36
Figura 15-Metáfase de <i>Hypostomus soniae</i> marcada por sonda de DNA repetitivo snRNA U2. Os sinais de hibridização fluorescem em verde.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-- Dados citogenéticos em espécies do gênero <i>Hypostomus</i> . Número diploide (2n), número fundamental (NF), ocorrência de sistemas de cromossomos sexuais, Bandeamento C (BC), Regiões organizadoras de nucléolo (NORs), Cromomicina (CMA3), e genes ribossomais 18S e 5S (FISH).....	24
Tabela 2-Dados referentes ao sexo, comprimento padrão (CP) e peso dos espécimes de <i>Hypostomus soniae</i> analisados no presente estudo. ND (não determinado).	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REFERÊNCIAL TEÓRICO	17
3.1	RELAÇÕES FILOGENÉTICAS, TAXONOMIA E BIOGEOGRAFIA DE SILURIFORMES: LORICARIIDAE	17
3.2	O GÊNERO <i>Hypostomus</i> La Cepède, 1803	19
3.3	REVISÃO DOS DADOS CITOGENÉTICOS DE <i>Hypostomus</i>	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	LOCAIS DE COLETA E AMOSTRAGEM	27
4.2	EUTANÁSIA, SEXAGEM E PRESERVAÇÃO DE ESPÉCIMES TESTEMUNHO	29
4.3	PREPARAÇÕES CITOGENÉTICAS	29
4.4	ANÁLISE DE COLORAÇÃO CONVENCIONAL E BANDEAMENTOS	29
4.5	CARACTERIZAÇÃO DE SÍTIOS DE DNA REPETITIVO POR HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH)	30
4.6	ANÁLISE CARIOTÍPICA	31
5	RESULTADOS	32
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

O presente estudo aborda a caracterização citogenômica de *Hypostomus soniae* Carvalho & Weber, 2004 (Siluriformes: Loricariidae), esta espécie é endêmica da bacia do rio Tapajós, com holótipo proveniente das localidades entre Vila Nova e Uruá, município de Itaituba, região Oeste do Pará, essa espécie é conhecida apenas de sua localidade tipo e pouco se conhece sobre sua real distribuição, peixes desta espécie são conhecidos popularmente como acari violeta (CARVALHO e WEBER, 2004).

Em estudo realizado por Souza et al., (2018) sobre a comercialização de peixes ornamentais do rio Tapajós mostrou que *H. soniae* está entre as 21 espécies de Loricariidae mais comercializadas no mercado de aquarofilia, representando um importante recurso natural e que vem sendo constantemente explorado na região, em virtude de sua utilização neste mercado e o pouco conhecimento acerca da biologia evolutiva disponível para a espécie são necessários estudos para compreensão da biologia destes organismos, visando agregar valor e a conservação deste recurso natural.

O gênero *Hypostomus* La Cepède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) consiste em um clado monofilético, constituído com cerca de 135 espécies válidas, pertencente a subfamília Hypostominae, a qual configura-se como a subfamília mais estudada do ponto de vista citogenético, porém é a mais complexa por apresentar grande diversidade nos padrões de cor e morfologia, dificultando a identificação das espécies (FRICK et al., 2019; LUJAN et al., 2014; BECKER et al., 2014).

Membros do gênero *Hypostomus* encontram-se divididos em dois grupos, o grupo *Hypostomus cochliodon* no qual é um grupo monofilético composto por 22 espécies e o grupo de *Hypostomus plecostomus*. *H. soniae* faz parte do grupo de *H. cochliodon* e difere das demais espécies do grupo por apresentar padrão de cor único ao longo do corpo, sem pintas, as vezes com listras longitudinais mais escuras, nadadeira adiposa longa e levemente curvada, possui um par de cristas entre as narinas e baixo número de placas nas linhas laterais, em torno de 25 a 27 (CARVALHO e WEBER, 2004).

Em *Hypostomus* do grupo *cochliodon* apenas duas espécies possuem informações cromossômicas, que são as espécies *Hypostomus* aff. *cochliodon* Kner, 1854 do Corregó Pitaluga e do Corregó Esparramo, em Rondonópolis-MT e em um estudo não publicado *H. soniae* do rio Teles Pires, MT, mostrando-se necessário mais investigações citogenéticas em espécies do grupo *cochliodon* para maior compreensão da evolução cromossômica em espécies deste grupo (OLIVEIRA, 2013; BECKER et al., 2013).

Hypostomus caracteriza-se por apresentar notáveis diferenças no arranjo cariotípico entre as espécies do gênero, com variação cariotípica observada no grupo de $2n=64$ cromossomos em *H. aff. cochliodon* do córrego Pitaluga, município de Rondonópolis-MT, a $2n=84$ em *Hypostomus* sp. do rio Perdido, Planalto de Bodoquena-MS, evidenciando que a evolução cromossômica no gênero *Hypostomus* levou a variações do número diploide e macroestrutura cromossômica (BECKER et al., 2014; CEREALI et al., 2008).

O emprego de técnicas citogenéticas em hypostomíneos tem contribuído para compreensão da organização genômica nas espécies através do mapeamento de marcadores genéticos como regiões ricas em heterocromatina, regiões organizadoras de nucléolo (NORs), genes ribossomais como mapeado em *Hypostomus tapijara* Oyakawa, Akama e Zanata, 2005 e identificação de sistemas de cromossomos de determinação sexual como evidenciado em *H. soniae* possuindo sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY e *H. cf. plecostomus* sistema ZZ/ZW (BRANDÃO et al. 2018; TRALDI et al., 2013; OLIVEIRA, 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

Neste trabalho foi realizado a análise citogenômica *H. soniae* do rio Tapajós, região Oeste do Pará, realizou-se pela primeira vez o mapeamento físico de DNAr 5S, telômero, localização de genes histonas H1, H3 e snRNA u2 nesta espécie, desta forma contribuindo na compreensão da organização genômica destes elementos repetitivos em uma espécie de *Hypostomus* do grupo *cochliodon*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

✓ Analisar a constituição dos cariótipos de peixes da espécie *H. soniae* provenientes do rio Tapajós, região Oeste do Pará.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Descrever os cariótipos de *H. soniae* através de marcadores de citogenética clássica e molecular.

✓ Realizar o mapeamento físico de sequências de DNA repetitivo em *Hypostomus soniae*.

✓ Investigar a presença de dimorfismos nos sistemas cromossômicos sexuais na espécie analisada.

3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 RELAÇÕES FILOGENÉTICAS, TAXONOMIA E BIOGEOGRAFIA DE SILURIFORMES: LORICARIIDAE

Os Siluriformes são peixes que possuem o corpo sem escamas ou revestido por placas dérmicas, sendo popularmente conhecidos como bagres e cascudos. Possuem variações notáveis em suas formas e tamanhos, hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares e habitam fundo dos ecossistemas aquáticos onde permanecem entre rochas e a vegetação (BAUMGARTNER et al., 2012; FERRARIS, 2007).

A Ordem Siluriformes compreende 39 famílias, 490 gêneros e 6.670 espécies. Esses peixes apresentam ocorrência em todos os continentes, praticamente em todos os tipos de habitats aquáticos, desde os superficiais até subterrâneos. Espécies das famílias, Ariidae e Plotosidae ocorrem estritamente em ambientes marinhos (FRICK et al., 2019; CUNHA, 2008).

Morfologicamente os Siluriformes exibem corpo com ausência de escamas ou cobertos por placas ósseas, na cabeça possuem até quatro pares de barbilhões, um nasal, um maxilar e dois mentonianos, nadadeira dorsal geralmente presente, exibem espinhos na frente da nadadeira dorsal e peitoral, apresentam a nadadeira adiposa e 18 raios ou menos na nadadeira caudal (NELSON et al., 2016).

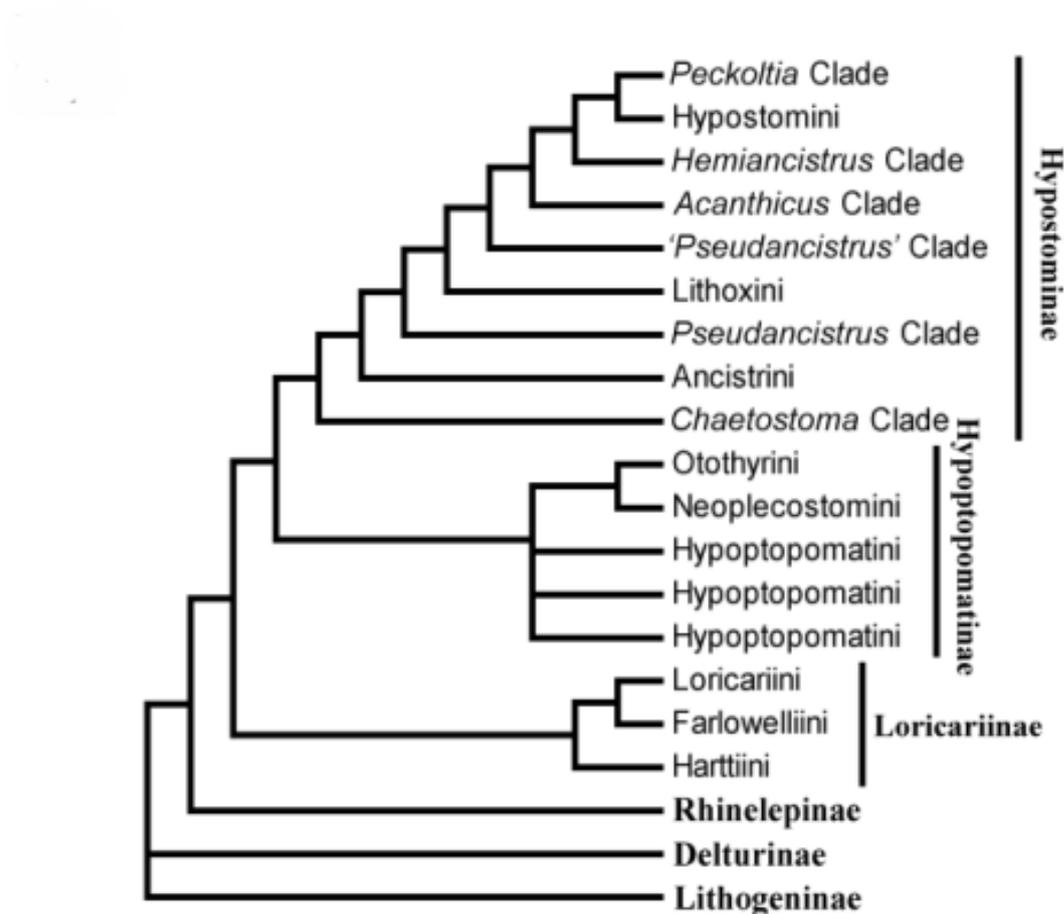
Pertencente a esta ordem, a família Loricariidae é a família mais diversa entre os Siluriformes, com ocorrência nas bacias hidrográficas desde a América Central até o Sul do continente americano. Nesta família existem cerca de 988 espécies válidas distribuídas em 106 gêneros, subdivididos em seis subfamílias, que são: Lithogeneinae, Delturinae, Rhinelepinae, Loricariinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae (ARMBRUSTER, 2004; FRICK et al., 2019).

Loricariidae faz parte da superfamília Loricarioidea, a qual possui monofilia suportada principalmente pela presença de dentes tegumentares (odontoides) do lado de fora do corpo, este é um dos poucos grupos de famílias de bagres para os quais uma filogenia foi bem estabelecida (ARMBRUSTER, 2004).

A monofilia da família Loricariidae foi demonstrada através do uso de marcadores moleculares incluindo genes mitocondriais (16S e Citocromo b) e nucleares (RAG1, RAG2 e MyH6) (LUJAN et al. 2014).

Roxo et al. (2019) ressaltam a filogenia de Loricariidae através de análise filogenética em 140 espécies do grupo, seus resultados mostram através das análises de máxima verossimilhança e Bayesiana a monofilia de Loricariidae, sendo classificados como grupos irmãos as subfamílias Delturinae, seguido de Rhinelepineae, Loricariinae, Hypostominae, Hypoptopomatinae e Lithogeninae (Figura 1).

Figura 1- Filogenia demonstrando a monofilia de Loricariidae.



Fonte: Roxo et al., (2019).

Lujan et al. (2012) em outro estudo, sobre evolução e diversidade trófica de Loricariidae, enfatiza em sua filogenia gêneros com espécies que apresentam similaridades morfológicas e ecológicas, e destaca similar evolução nas subfamílias Hypoptopomatinae, Loricariinae e Hypostominae.

Espécies da família Loricariidae exibem grande variação em relação ao tamanho corporal, desde pequenos cascudos a indivíduos de grande porte, apresentam o corpo coberto por várias séries de placas dérmicas, e possuem boca em posição ventral (BAUMGARTNER et al., 2012).

É característico entre membros de loricariídeos corpo coberto com placas ósseas, com ou sem barbilhões, papilho labial ventral, nadadeira adiposa quando presente localizada na borda superior da vertebra, intestino longo, e de 23 a 38 vértebras (NELSON et al., 2016).

Na América Central e do Sul os loricariídeos habitam grande diversidade de habitats e podem ser encontrados desde cursos d'água a baixas elevações até rios com corredeira a 3000 metros acima do nível do mar, habitam fundo de rios, cachoeiras e lagos, possuem aumento de atividade no período noturno e tem hábito alimentar detritívoro (SOARES et al., 2008; NELSON et al., 2006).

Apesar desta família apresentar ampla distribuição, muitas espécies caracterizam-se por formarem populações restritas a pequenas áreas, fazendo com que seus membros apresentem uma das maiores diversidades de formas entre todos os peixes do mundo (SILVA, 2009).

3.2 O GÊNERO *Hypostomus* La Cépède, 1803

O gênero *Hypostomus*, incluindo aproximadamente cerca de 135 espécies válidas destaca-se como um dos mais diversos e amplamente distribuídos gêneros de peixes de água doce neotropical (FRICK et al., 2019). Esse gênero é classificado na subfamília Hypostominae, a qual é constituída pelas tribos Hypostomini, Lithoxini, Ancistrini, e pelos clados Peckoltia, Hemiancistrus, Acanthicus, Pseudancistrus e Chaetostoma. *Hypostomus* tem sido relatado como um grupo monofilético e está alocado na tribo Hypostomini (ARMBRUSTER, 2004; ROXO et al., 2019).

Hypostomus apresentam ausência de odontóides eversíveis no interopérculo, no corpo ou na cabeça, opérculo em formato achatado, nadadeira dorsal com 1 espinho e 7 raios, papilas bucais de forma e tamanho irregulares, pouco evidentes, abdome coberto por placas ou completamente nu e dimorfismo sexual não evidente (ARMBRUSTER, 2004; CAMARGO et al., 2012).

Hypostomus apresenta-se distribuído desde a América Central e em todo o território da América do Sul, ocorrendo em uma grande diversidade de habitats, principalmente em ambientes como pequenos riachos com corredeiras, calhas de grandes rios e sistemas lênticos (BURGOS, 2003; QUEIROZ et al., 2013).

Hypostomus são restritos a ambientes de água doce, exceto uma espécie, *Hypostomus watwata* Hancock, 1828, que habita estuários e águas salobras. Espécimes deste gênero vivem

nos fundos arenosos e rochosos de rios, e durante o dia permanecem escondidos embaixo de rochas e vegetação (ARMBRUSTER, 2004).

Membros do gênero *Hypostomus* encontram-se divididos em dois grupos, primeiramente o grupo *Hypostomus cochliodon*, no qual fazem parte 22 espécies, que são: *H. cochliodon* Kner, 1854, *H. hondae* (Regan, 1912), *H. levis* (Pearson, 1924), *H. oculus* (Fowler, 1943), *H. plecostomoides* Eigenmann, 1922, *H. pyrineusi* Miranda-Ribeiro, 1920, *H. taphorni* (Lilyestrom, 1984), *H. ericius* Armbruster, 2003, *H. hemicochliodon* Armbruster, 2003, *H. pagei* Armbruster, 2003 e *H. sculpodon* Armbruster, 2003, *H. waiampi* Carvalho e Weber (2004), *H. ericae* Carvalho e Weber (2004), *H. paucipunctatos* Carvalho e Weber (2004), *H. símios* Carvalho e Weber (2004), *H. soniae* Carvalho e Weber (2004), *H. macushi* Armbruster e Souza (2005), *H. kopeyaka* Carvalho, Lima e Zawadzki (2010), *H. weberi* Carvalho, Lima e Zawadzki (2010), *H. basilisko* Tennecat, Zawadzki e Froehlich (2014), *H. khimaera* Tennecat, Zawadzki e Froehlich (2014), *H. dardanelos* Zawadzki e Carvalho (2014). As demais espécies do grupo que não estão inclusos no grupo *Cochliodon* fazem parte do grupo *Hypostomus plecostomus* (ARMBRUSTER, 2003; CARVALHO e WEBER (2004); ARMBRUSTER et al., (2005); CARVALHO et al., (2010); TENNCAT et al., (2014); ZAWDZKI e CARVALHO, 2015; LUJAN et al., 2012).

A maioria das espécies de *Hypostomus* do grupo *cochliodon* exibem padrão de coloração com pintas ao longo do corpo, enquanto que *H. soniae* difere das demais espécies do grupo por possuir padrão de coloração em tonalidade marron ao longo de todo corpo e sem pintas.

Hypostomus do grupo *cochliodon* apresentam poucos dentes, geralmente menos de 20 por mandíbula e em forma de colher, com ângulo entre os dentários usualmente menor que 80° e pela ausência de uma chanfradura entre o hiomandibular e o metapterigoide, maxila altamente curva e ausência da papila bucal. Já o grupo de *Hypostomus plecostomus* exhibe dentes fusiformes, com ângulo entre os dentários superior a 80°, dentes fusiformes, possuem mais de 20 dentes por ramo da mandíbula, cabeça tão larga quanto à altura, enquanto espécies do grupo *H. cochliodon* tendem a ter a cabeça mais alta que larga (ARMBRUSTER, 2003).

Hypostomus faz parte de um grupo de peixes estritamente neotropical que possui hábito alimentar detritívoro (SILVA et al., 2016). Pessoa et al. (2013) observaram uma dieta baseada em material orgânico em decomposição e micro algas filamentosas, caracterizando-os como organismos herbívoros e detritívoros.

Investigações acerca do período reprodutivo em *Hypostomus pusarum* (Starks, 1913) mostrou que o período de reprodução nesta espécie sofre influência da temperatura ambiental

e da sazonalidade e apresenta quatro estádios de desenvolvimento gonadal, que são imaturo, em maturação, maduro e esvaziado, e em *Hypostomus commersoni* Valenciennes, 1836, a análise do índice gonadossomático, do índice hepatossomático, e o fator de condição gonadal, além da observação macroscópica do estágio de desenvolvimento gonadal mostrou que esta espécie possui reprodução por 5 meses do ano, de setembro a janeiro, atingindo seu pico de reprodução em novembro. (GALARÇA et al., 2014; PESSOA et al., 2013).

Para a bacia do Rio Tapajós são reportadas a ocorrência das espécies *H. soniae*, *H. cochliodon*, *H. cf. plecostomus* e *Hypostomus melanepheles* Zawadzki, 2015 (OHARA et al., 2017; ZAWADZKI et al., 2015).

3.3 REVISÃO DOS DADOS CITOGENÉTICOS DE *Hypostomus*

No gênero *Hypostomus* análises citogenéticas revelam um padrão não conservativo da macroestrutura cariotípica entre as espécies do gênero, sendo reportado variação cromossômica de $2n=64$ cromossomos em *H. aff. cochliodon* até $2n=84$ cromossomos em *Hypostomus* sp. (BECKER et al., 2014; CEREALI et al., 2008).

Hypostomus affinis (Steindachner, 1877) e *H. tapijara* apresentam $2n=66$ cromossomos, diferindo de *H. aff. cochliodon* e *H. soniae* que apresentam $2n=64$ cromossomos (BECKER et al., 2014; BRANDÃO et al., 2018; OLIVEIRA, 2013; TRALDI et al., 2013).

O número diploide $2n=68$ já foi reportado para *H. cf. plecostomus*, *Hypostomus* sp., *H. ancistroides* e *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus, 1758) (ALVES et al., 2012; MARTINEZ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; PERSONATO-ALVES et al., 2013).

Em populações de *H. cf. heraldoi*, *H. regani*, *H. strigaticeps* observou-se $2n=72$ cromossomos, já em *Hypostomus* sp., *Hypostomus aff. agna* (Miranda Ribeiro, 1907), *Hypostomus albopunctatus* Castelnau, 1855, *H. strigaticeps* e *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908) exibiram $2n=74$ cromossomos (BECKER et al., 2014; MARTINEZ et al., 2011; PERSONATO-ALVES et al., 2013; RUBERT et al., 2011).

O arranjo cariotípico com maior quantidade de cromossomos é evidenciado em *Hypostomus nigromaculatus* (Schubart, 1964) e *H. paulinos*, ambas com $2n=76$, e *H. iheringii* e *H. cf. topavae* com $2n=80$ cromossomos (MARTINEZ et al., 2011; PERSONATO-ALVES et al., 2013; RUBERT et al., 2011; TRALDI et al., 2013).

Por meio da técnica convencional e bandeamento C tem-se evidenciado a presença de cromossomos sexuais em *Hypostomus*, sendo que a ocorrência de cromossomos deste tipo já

foi reportada em *H. cf. plecostomus*, o qual possui cromossomos sexuais no formato ZZ/ZW no par acrocêntrico 33, com heterogametia feminina e em *H. soniae* cromossomos sexuais do tipo XX/XY (OLIVEIRA et al., 2015).

Bandeamentos cromossômicos demonstram que regiões heterocromáticas já foram identificados em região telomérica e pericentrômerica de cromossomos acrocêntricos em *H. affinis*, *H. aff. cochliodon* e *H. nigromaculatus*, e em região telomérica de cromossomos submetacêntricos em *H. nigromaculatus*, já em *H. tapijara* blocos heterocromáticos apresentam-se em região pericentromérica de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos (BECKER et al., 2014; BRANDÃO et al., 2018; TRALDI et al., 2013).

Na maioria das espécies de *Hypostomus* estudadas verifica-se a presença de Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) classificadas como múltiplas localizadas em regiões teloméricas de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos, sendo que este padrão difere nas espécies *H. strigaticeps*, *H. nigromaculatus*, *H. cf. heraldoi*, *H. paulinos*, as quais possuem NOR simples (MARTINEZ et al., 2011; PERSONATO-ALVES et al., 2013; RUBERT et al., 2011).

A localização do DNA ribossomal (DNAr) 18S já foi mapeada em posições terminais de três pares de cromossomos submetacêntricos e subtlocêntricos, e em dois pares de cromossomos acrocêntricos, essas marcações foram observadas em *H. ancistroides*, *H. strigaticeps* e *H. nigromaculatus* (PERSONATO-ALVES et al., 2013).

Em *H. affinis* DNAr 18S foi encontrado na região terminal de um par de cromossomos submetacêntrico e em dois pares de cromossomos acrocêntricos, confirmados pela NORs. Já DNAr 5S foi evidenciado em um par de cromossomos metacêntricos (BRANDÃO et al., 2018).

No estudo com a espécie *H. cf. plecostomus* confirmou-se a localização dos genes ribossomais 18S em dois pares cromossômicos, um subtlocêntrico e um acrocêntrico, correspondendo a NOR. DNAr 5S foi identificado em quatro pares cromossômicos, sendo que um par em sintenia com 18S (OLIVEIRA et al., 2015).

Nas espécies *H. regani*, 18S foi encontrado na região distal de dois pares cromossômicos, e *H. paulinos* apresentou essa marcação em um par, em ambas as espécies em cromossomos subtlocêntricos e acrocêntricos correspondentes a NORs (RUBERT et al., 2011).

Traldi et al. (2013) retrata *H. nigromaculatus* possuindo DNAr em um par de cromossomos acrocêntricos e DNAr 5S na região centromérica de um par metacêntrico.

Enquanto que *H. tapijara* apresenta marcação de 18S em três pares cromossômicos, e 5S em quatro pares, sendo dois destes ocorrendo em sintenia com 18S.

Na tabela 1 é apresentado informações citogenéticas já relatadas para espécies de *Hypostomus*, com a localização dos pontos de coleta dos espécimes, número diploide e número fundamental, sistemas de cromossomos sexuais, bandeamento C e regiões organizadoras de nucléolo, assim como regiões de DNA repetitivos já mapeados em *Hypostomus*.

Tabela 1-- Dados citogenéticos em espécies do gênero *Hypostomus*. Número diploide (2n), número fundamental (NF), ocorrência de sistemas de cromossomos sexuais, Bandejamento C (BC), Regiões organizadoras de nucléolo (NORs), Cromomicina (CMA3), e genes ribossomais 18S e 5S (FISH).

Espécie	Localidade	Número Diplóide	Número Fundamental	Sistema de cromossomos sexuais	Bandeamento C	NOR	CMA3	FISH	Referência
<i>H. soniae</i>	Rio Teles Pires, Alta Floresta, MT.	64	112	XX/XY	14 pares	5 pares		18S	Oliveira (2013)
<i>H. aff. cochliodon</i>	Corrêgo Pitaluga, Rondonópolis, MT.	64	102		2 pares	2 pares			Becker et al. (2014)
<i>H. aff. cochliodon</i>	Corrêgo Esparramo, Rondonópolis, MT.	64	102		2 pares	2 pares			Becker et al. (2014)
<i>H. tapijara</i>	Rio Ribeira de Iguape, Registro, SP.	66	118		2 pares	2 pares	2 pares	18S e 5S	Traldi et al.(2013)
<i>H. affinis</i>	Riacho Jacuí, Cunha, SP.	66	104		2 pares	2 pares		18S e 5S	Brandão et al. (2018)
<i>H. affinis</i>	Rio Paraíba do Sul, Itaocara, RJ.	66	104		2 pares	3 pares		18S e 5S	Brandão et al. (2018)
<i>H. ancistroides</i>	Rio Paranapanema, SP.	68	104		1 par	4 pares	1 par	18S	Rubert et al. (2011)
<i>H. ancistroides</i>	Rio Corumbataí, SP.	68				2 pares			Alves et al. (2012)
<i>H. ancistroides</i>	Corrêgo Hortelã, Botucatu, SP.	68			3 pares	3 pares	4 pares	18S e 5S	Alves et al. (2013)

<i>H. plecostomus</i>	Rio Orinoco, Bolivar, Venezuela	68				1 par			Alves et al. (2012)
<i>H. cf. plecostomus</i>	Rio Teles Pires, Alta Floresta,MT.	68	120 e 121	<i>ZZ/ZW</i>	1 par	2 pares	2 pares	18S e 5S	Oliveira et al. (2015)
<i>Hypostomus</i> sp.	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga,SP.	68				2 pares			Martinez et al. (2011)
<i>H. commersoni</i>	Rio Iguaçu, União da Vitória, PR,	68	106		5 pares	2 pares		18S e 5S	Lorscheider et al. (2018)
<i>H. derbyi</i>	Rio Iguaçu, União da Vitória, PR,	68	102		2 pares	1 par		18S e 5S	Lorscheider et al. (2018)
<i>H. cf. heraldoi</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga,SP.	72				1 par			Martinez et al. (2011)
<i>H. regani</i>	Rio Paranapanema,SP.	72	100		4 pares	2 pares		18S	Rubert et al. (2011)
<i>H. regani</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga,SP.	72				2 pares			Martinez et al. (2011)
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Paranapanema,SP.	72	98		2 pares	2 pares	2 pares	18S	Rubert et al. (2011)
<i>H. strigaticeps</i>	Corrêgo Hortelã,Botucatu, SP.	72			3 pares	1 par 4 pares	8 pares	18S e 5S	Alves et al. (2013)
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Corumbataí, SP.	74							Alves et al. (2012)

<i>H. albopunctatus</i>	Rio Corumbataí, SP.	74			1 par			Alves et al. (2012)
<i>H. aff. cochliodon</i>	Corrêgo Esparramo, Rondonópolis, MT.	74	106	2 pares	2 pares			Becker et al. (2014)
<i>H. aff. agna</i>	Corrêgo Cavalo, Jaraguá do Sul, SC.	74			2 pares			Martinez et al. (2011)
<i>H. myersi</i>	Rio Iguaçu, União da Vitória, PR.	74	114	13 pares	1 par		18S e 5S	Lorscheider et al. (2018)
<i>H. paulinos</i>	Rio Paranapanema, SP.	76	98	6 pares	1 par	4 pares	18S	Rubert et al. (2011)
<i>H. paulinus</i>	Rio Corumbataí, SP.	76			1 par			Alves et al. (2012)
<i>H. nigromaculatus</i>	Corrêgo Hortelã, Botucatu, SP.	76		4 pares	1 par	3 pares	18S e 5S	Alves et al. (2013)
<i>H. iheringi</i>	Corrêgo da Lapa, SP	80	132	3 pares	3 pares		18S e 5S	Traldi et al. (2012)
<i>H. cf. topavae</i>	Corrêgo Carrapato, Penápolis, SP.	80			2 pares			Martinez et al. (2011)

Fonte: Alves et al. (2012); Becker et al. (2014); Brandão et al. (2018); Martinez et al. (2011); Oliveira (2013); Oliveira et al. (2015); Rubert et al. (2011); Traldi et al. (2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DE COLETA E AMOSTRAGEM

Foram analisados 10 exemplares de *Hypostomus soniae* (Figura 2), provenientes do rio Tapajós, Vila Pimental, município de Trairão, PA, 4° 34' 05.9" S/ 56° 15' 44.4" W (Figura 3). Os espécimes foram etiquetados com número de campo, codificados com as siglas PMT e ARAP, pesados, fotografados, o comprimento padrão foi medido desde o focinho até o pedúnculo caudal e registrado em mm, os dados biológicos dos espécimes são mostrados na Tabela 2.

Os peixes foram adquiridos por doação de empresas exportadoras de peixes ornamentais: Amazon Fish e Tapajós Aquariuns, sediadas em Santarém-PA e Arapaima Brazil, sediada em Belém-PA.

Em Santarém, os peixes foram transportados vivos para o Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), e os espécimes obtidos em Belém foram levados ao Laboratório de Citogenética do Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade (CEABIO) localizado no Parque de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal do Pará (UFPA). Os peixes foram mantidos em aquários aerados até o momento da preparação cromossômica.

Figura 2-Aspectos da coloração e morfologia externa de *Hypostomus soniae*. A barra equivale a 1cm.



Fonte: Maciel et al. (2019).

Figura 3-Localização da procedência geográfica dos espécimes de *Hypostomus soniae* do rio Tapajós (PA) analisados no presente trabalho (círculo vermelho).

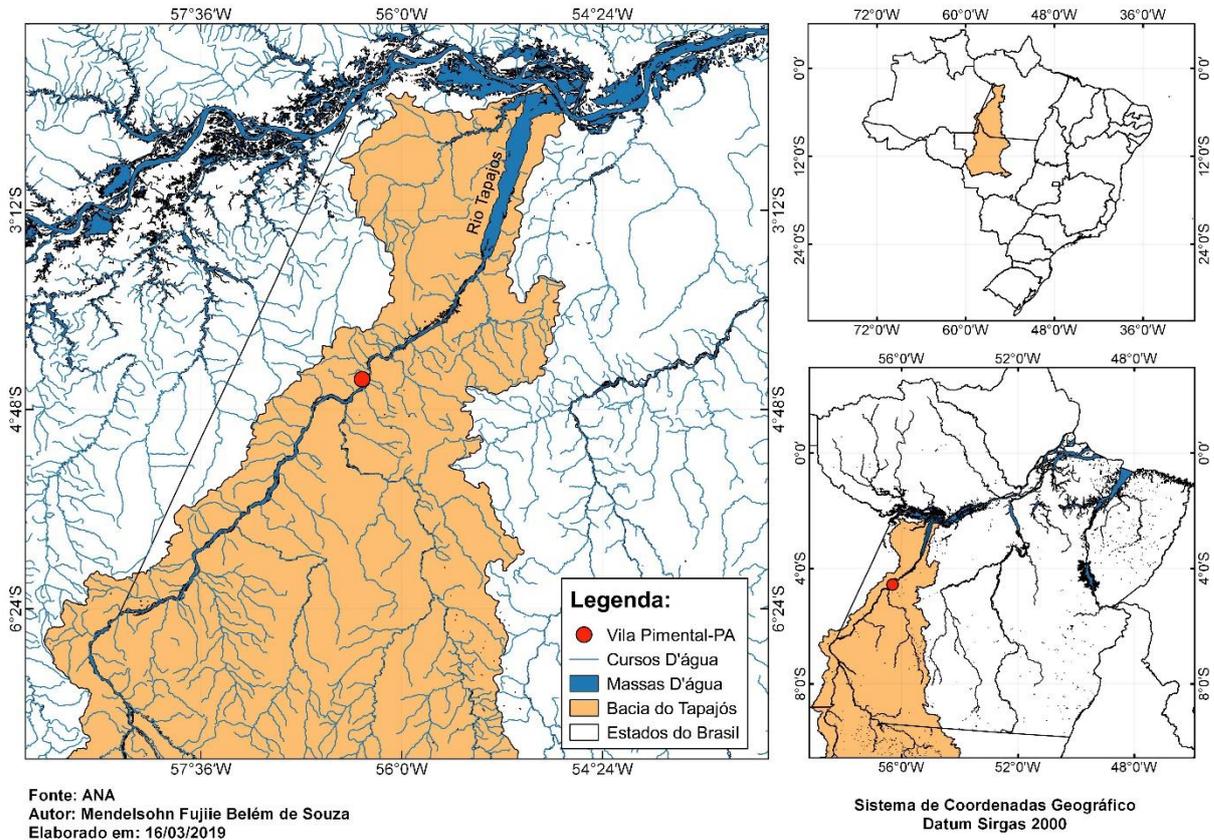


Tabela 2-Dados referentes ao sexo, comprimento padrão (CP) e peso dos espécimes de *Hypostomus soniae* analisados no presente estudo. ND (não determinado).

Código de campo	Sexo	CP (mm)	Peso (g)
PMT-138	Fêmea	170	180
PMT-139	Fêmea	140	80
PMT-140	Fêmea	110	42
PMT-141	Macho	160	115
PMT-142	Macho	150	89
PMT-143	Fêmea	135	79
ARAP-3	Fêmea	130	48
ARAP-4	Fêmea	130	59
ARAP-5	Macho	130	56
PMT-36	ND	92	ND

Fonte: Maciel et al. (2019).

4.2 EUTANÁSIA, SEXAGEM E PRESERVAÇÃO DE ESPÉCIMES TESTEMUNHO

Todos os exemplares foram anestesiados com Cloridrato de Lidocaína 2% gotejado sobre as brânquias e mortos por secção medular. Coletou-se músculo branco para depósito no banco de tecidos de peixes do LGBio. A sexagem dos espécimes ocorreu através de extração e análise de ovócitos e espermátócitos presente nas gônadas. Após isso, os espécimes testemunhos foram fixados por injeção e imersão em formol a 10% por 48h em temperatura ambiente, e depois lavados em água corrente abundante e armazenados em recipientes com etanol a 70%. Ao final deste estudo os espécimes serão depositados na Coleção Ictiológica do Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, UFOPA.

4.3 PREPARAÇÕES CITOGENÉTICAS

Cromossomos mitóticos em metáfases foram obtidos a partir de células renais (rim cefálico) mediante indução mitogênica por injeção subcutânea de suspensão de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Florax 100 milhões/mL - Hebron), o bloqueio mitótico feito com 4 gotas de colchicina a 0.0125% por 20 minutos (GOLD et al., 1990) (Apêndice B). O material cromossômico fixado foi estocado em freezer -20°C até o momento da preparação de lâminas. Gotejou-se entre 15 a 20µl da suspensão celular sobre uma lâmina previamente umedecida com o vapor de água soprado da boca. A lâmina foi posta para secar sobre uma plataforma metálica dentro de um banho maria a 60°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 bandeamentos e estocadas em geladeira para uso das técnicas de marcação por fluorocromos ou hibridização *in situ* (FISH).

4.4 ANÁLISE DE COLORAÇÃO CONVENCIONAL E BANDEAMENTOS

A coloração convencional por Giemsa diluído a 5% em tampão fosfato pH 6.8 foi usada para análise de número diplóide e macroestrutura cariotípica. Análises da posição e distribuição da heterocromatina constitutiva foram tratadas por bandeamento C com hidróxido de bário e solução salina de 2XSSC, seguindo-se o protocolo de Sumner (1972) com pequenas modificações (Apêndice C). As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram primariamente evidenciadas pela impregnação de nitrato de prata seguindo-se o protocolo proposto por Howell & Black (1980), com pequenas modificações (Apêndice D). A

composição sítio-específica de regiões heterocromáticas e NORs foram investigadas por meio da coloração com fluorocromos DAPI, que marca preferencialmente sítios ricos em pares de bases A-T, e Cromomicina A3 que marca preferencialmente sítios ricos em G-C. Foi adotado o protocolo proposto por Schweizer (1976), com pequenas modificações (Apêndice E).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DE SÍTIOS DE DNA REPETITIVO POR HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Foram analisados sítios de DNA ribossomal 18S e 5S, telômeros, histonas H1 e H3, snRNA U2. As sondas foram produzidas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os pares de *primers* como listados no quadro 1. 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 tiveram 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); **c) H1, H3 e snRNA U2**: DNA genômico = 80 ng, primer direto = 0,2 µM, primer reverso = 0,2 µM, dNTPs = 0,16 mM, Polimerase Taq do DNA (Invitrogen) = 1 U, MgCl₂ = 1,5 mM, tampão de reação 1 × (200 Tris mM, pH 8,4, KCL 500 mM). O programa de amplificação configurado: 4 min - 95 ° C / (1 min - 95 ° C / 1 min - 60 ° C / 2 min - 74 ° C) 30 ciclos / 5 min - 74 ° C. (***) sendo 55 ° C para o U2). As reações foram processadas no termociclador PxE 0.2 (ThermoScientific). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com Gel Red (Biotium-Uniscience) e nas reações positivas, os amplicons foram marcados com biotina-14-dATP por *nick translation* usando-se o kit Bionick Labeling System (Invitrogen) ou digoxigenina com o kit DigNick (Roche) seguindo-se as instruções do fabricante.

As reações de FISH foram realizadas de acordo com Pinkel et al. (1986) (Apêndice F). Os sinais de hibridização foram detectados usando os anticorpos-fluoróforos conjugados Avidina-FITC para sondas marcadas com biotina, e antidigoxigenina-Rodamina para sondas marcadas com digoxigenina. As metáfases foram contracoradas com DAPI/Vectashield H100. Foram fotografadas pelo menos cinco metáfases de cada experimento, utilizando-se microscópio de epifluorescência Nikon EclipseCsI acoplado a câmera CCD monocromática.

A captura e ajustes de brilho/contraste das imagens foram mediadas pelo programa Nikon NIS-Elements. A montagem/edição dos cariótipos foi efetuada com auxílio do programa Adobe Photoshop CS6.

Quadro 1- Sequência de primers utilizados na produção de sondas no presente estudo.

Sonda	Primer	Referencia
DNAr 5S	A 5'TACGCCCCGATCTCGTCCGATC3' B 5'CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC3'	Komia e Takemura, (1979)
DNAr 18S	IpF 5'CCGCTTTGGTGACTCTTGAT3' IpR 5'CCGAGGACCTCACTAAACCA3'	Martins e Vicari (2012)
Telômero	F (5'TTAGGG3') ₅ R (5'CCCTAA3') ₅	Ljdo et al., (1991)
Histona H1	Sca H1F 5'GCNATHAARAARTAYAT3' Sca H1R 5'GGYTTNGGNGCYTTNGG3'	Cabral -de-Melo et al., (2010)
Histona H3	Sca H3F 5'GGCNMGNAACNAARCARAC3' Sca H3R 5'TGDATRRCYTTN GGCATDAT3'	Cabral -de-Melo et al., (2010)
snRNA U2	F5'TCTCGGCCT(AT)(AT)TGGCTAA3' R5'G(AC)GGTA(GC)TGCAATACCGG3'	Colgan et al., (1998)

4.6 ANÁLISE CARIOTÍPICA

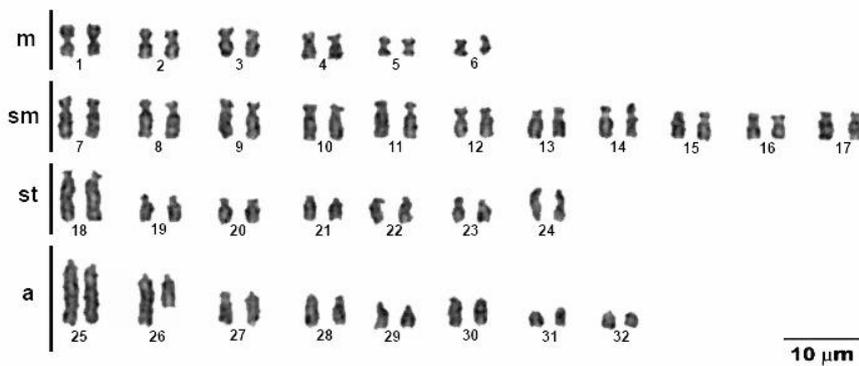
Para a determinação do número diploide modal e estabelecer a fórmula cariotípica analisou-se a estrutura dos cromossomos contando-se pelo menos 30 metáfases por espécime. O número fundamental (NF) foi estabelecido com base na contagem e razão de braços longos e curtos dos cromossomos. As metáfases com melhor distensão cromossômica foram capturadas em campo claro com câmera digital modelo MOTICAM 10MP acoplada ao microscópio Zeiss Axioskop 40. As imagens foram editadas com auxílio do programa Adobe Photoshop CS6. Na organização do cariótipo, pareou-se os cromossomos visualmente de acordo com a classificação em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), como proposto por Levan et al. (1964).

5 RESULTADOS

Hypostomus soniae apresentou número diploide $2n=64$ cromossomos, Número Fundamental $NF=112$ e Fórmula Cariotípica $FC=12m+22sm+14st+16a$ (Figura 4,5). Não houve diferenças no arranjo cariotípico entre machos e fêmeas. Foi observado heteromorfismo de tamanho no par 26.

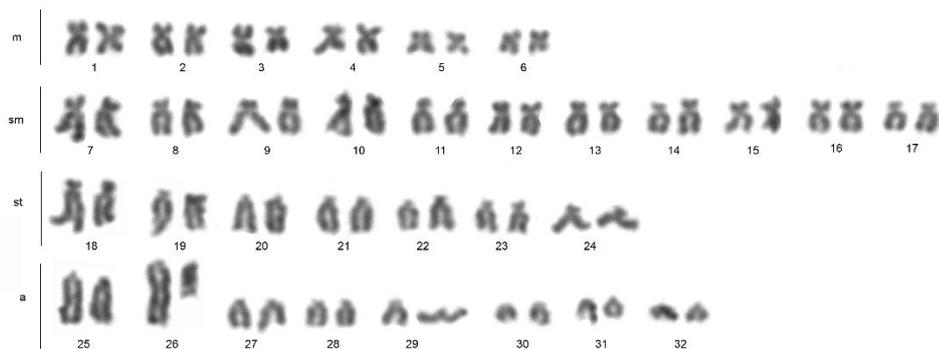
O bandeamento C revelou blocos heterocromáticos nos pares 25-26 (Figura 6,7), os demais cromossomos não evidenciaram a presença de bandas C, exceto no exemplar PMT-36 que possui bandas C centroméricas nos pares 2, 4, 18, 19, 20 e 31, além disso bandas distais foram evidenciadas nos pares 14 e 30 (Figura 8).

Figura 4-Cariótipo convencional de *Hypostomus soniae* (ARAP-3, fêmea) do rio Tapajós (PA).



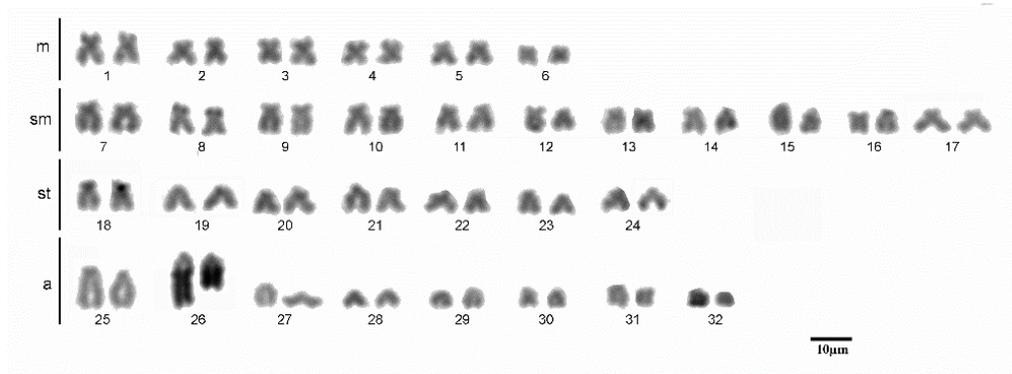
Fonte: Maciel et al. (2019).

Figura 5-Cariótipo convencional de *Hypostomus soniae* (PMT-36) do rio Tapajós (PA).



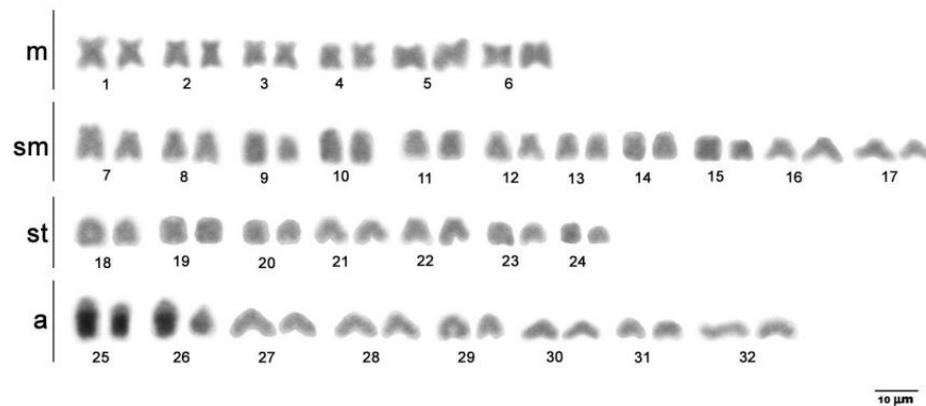
Fonte: Maciel et al. (2019).

Figura 6-Cariótipo de *Hypostomus soniae* (ARAP-5, macho) com coloração por Giemsa, mostrando marcações heterocromáticas feito pela técnica de bandeamento C, mostrando blocos heterocromáticos no par 26.



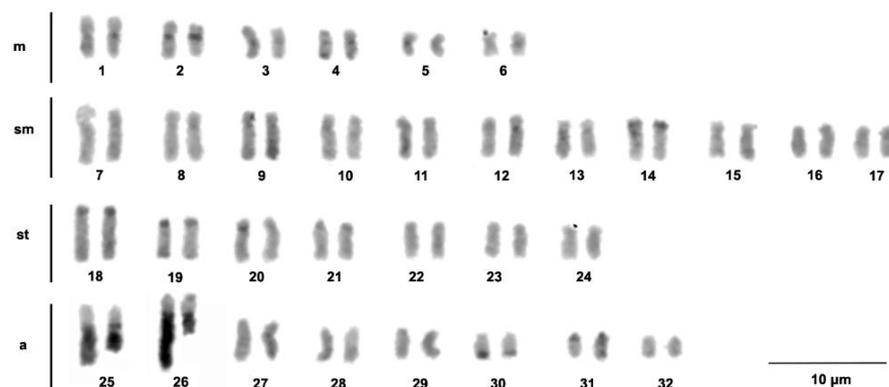
Fonte: Maciel et al. (2019).

Figura 7-Cariótipo de *Hypostomus soniae* (PMT-140, fêmea) com coloração por Giemsa, mostrando marcações heterocromáticas feito pela técnica de bandeamento C, mostrando blocos heterocromáticos nos pares 25 e 26.



Fonte: Maciel et al. (2019).

Figura 8-Cariótipo de *Hypostomus soniae* (PMT-36) com coloração por Giemsa, mostrando marcações heterocromáticas feito pela técnica de bandeamento C.

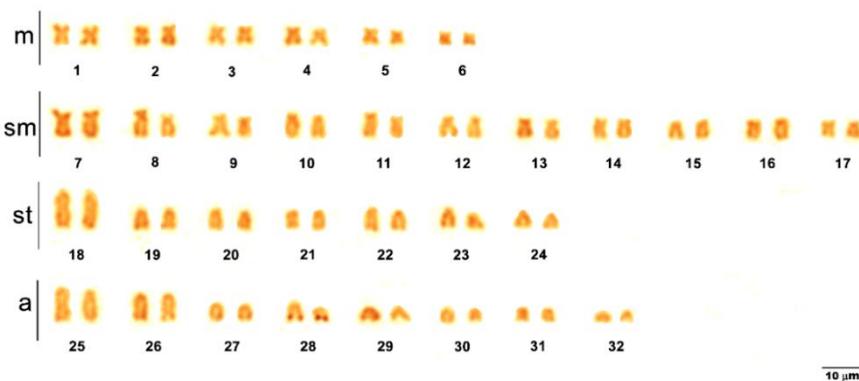


Fonte: Maciel et al. (2019).

A NOR foi localizada em um par de cromossomos acrocêntricos marcado na região telomérica do par 28, na mesma posição dos sítios ribossomais 18S (Figura 9, 10), evidenciando assim um padrão de NOR simples para os espécimes estudados, com exceção do espécime PMT-36 que apresentou NORs em dois pares cromossômicos (pares 25 e 26) (Figura 11). Os sítios DNAr 5S foram detectados em três pares cromossômicos, localizados na região telomérica de um par de cromossomos subtelocêntrico, par 19, e em dois pares acrocêntricos, destes, no par 25 o sítio DNAr 5S encontra-se na região centromérica e no par 26 na região telomérica (Figura 12).

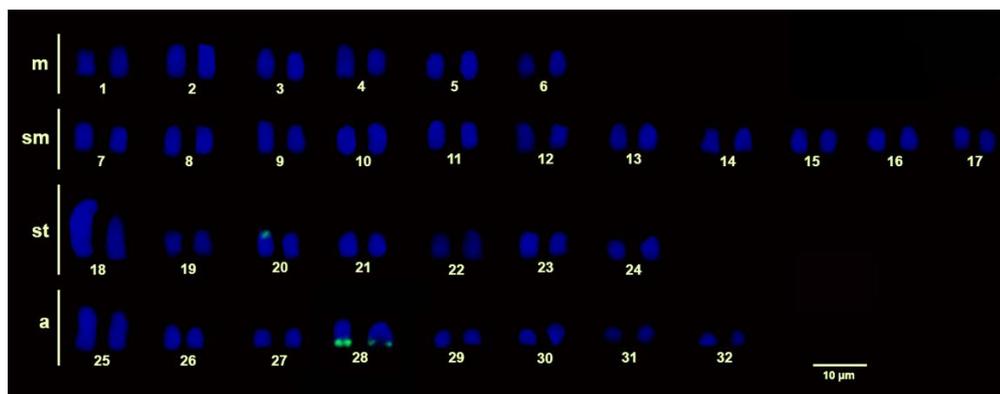
A hibridização com sondas teloméricas revelou sinal de hibridização na região terminal dos cromossomos, sendo que para a espécie não foi identificado sítios de telômero intersticial (Figura 13).

Figura 9-Cariótipo de *Hypostomus soniae* (ARAP-4, fêmea) com coloração por nitrato de prata, mostrando as marcações nas Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) na região distal do par 28.



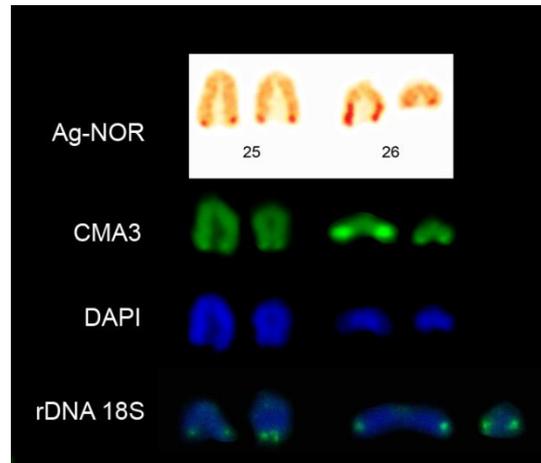
Fonte: Maciel et al. (2019).

Figura 10- Cariótipo com marcação de sítios DNAr 18S em *Hypostomus soniae*, (ARAP-4, fêmea) mostrando as marcações de sítios DNAr 18S na região distal do par 28.



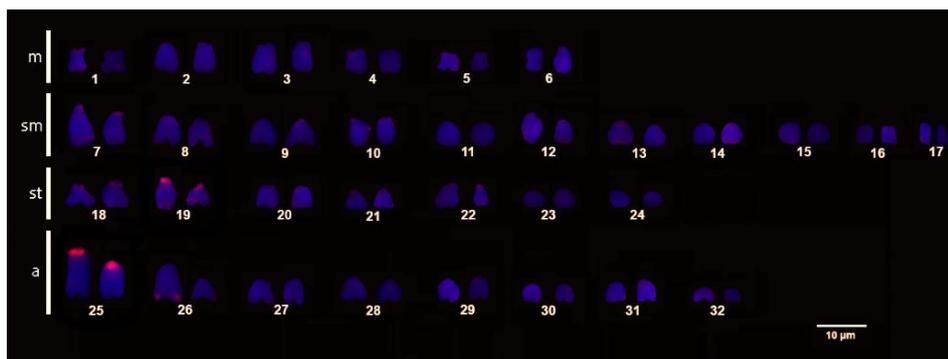
Fonte: Maciel et al. (2019).

Figura 11- Localização das NORs e sítios DNAr 18S de *Hypostomus soniae* (PMT-36). A dupla marcação por Cromomicina3/DAPI revela os sítios ricos em pares de base GC.



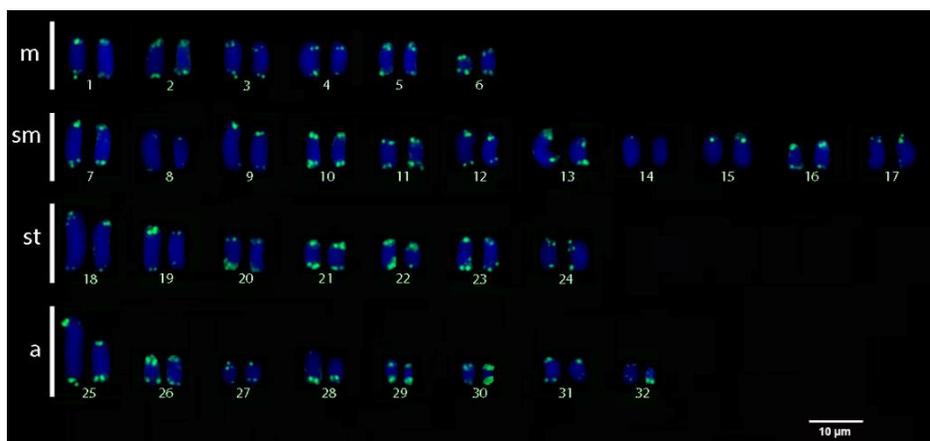
Fonte: Maciel et al. (2019).

Figura 12- Cariótipo com marcação de sítios DNAr 5S em *Hypostomus soniae*, (ARAP-5, macho) mostrando as marcações de sítios DNAr 5S nos pares 19, 25 e 26.



Fonte: Maciel et al. (2019).

Figura 13- Cariótipo com marcação de sondas teloméricas em *Hypostomus soniae*.

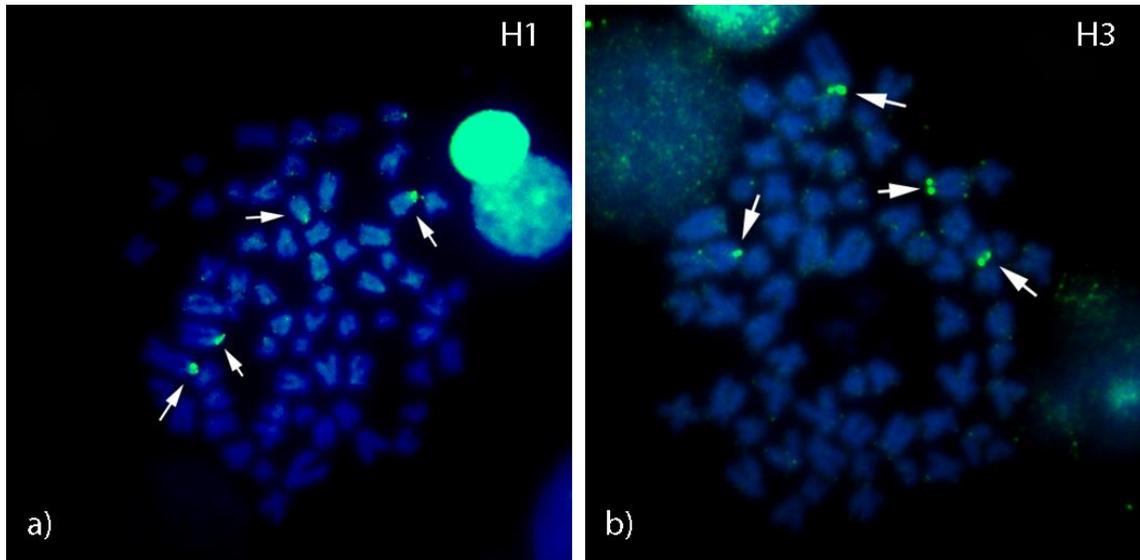


Fonte: Maciel et al. (2019).

Foi mapeado pela primeira vez genes de Histonas (H1 e H3) e snRNA U2 em *Hypostomus soniae*, sendo que H1 e H3 revelaram clusters em dois pares cromossômicos,

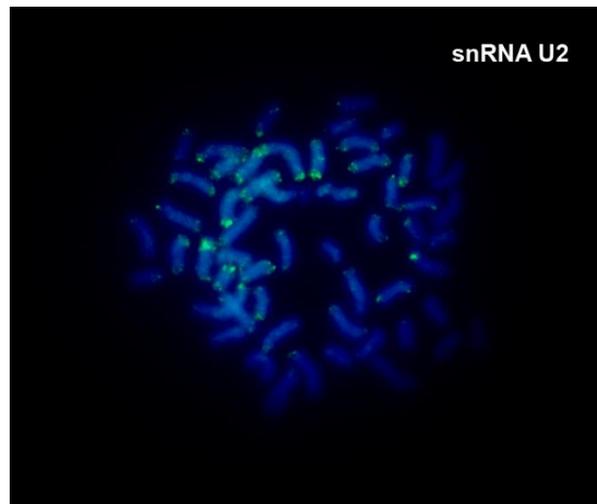
indicando um caráter conservado das sequências (Figura 14, a e b); snRNA U2 foram detectados na região distal da maioria dos pares cromossômicos (Figura 15).

Figura 14-Metáfases de *Hypostomus soniae* marcadas por sondas de DNA repetitivo: Histona H1, Histona H3. Os sinais de hibridização fluorescem em verde.



Fonte: Maciel et al. (2019).

Figura 15-Metáfase de *Hypostomus soniae* marcada por sonda de DNA repetitivo snRNA U2. Os sinais de hibridização fluorescem em verde.



Fonte: Maciel et al. (2019).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo investigou-se pela primeira vez o arranjo cariotípico em topotipos de *H. soniae* provenientes de sua localidade tipo, os resultados apontam que nesta espécie a fórmula cariotípica e o número fundamental tem se mostrado conservado, bem como o número diploide $2n=64$ cromossomos tem sido relatado o mais frequente no arranjo cariotípico de espécies de *Hypostomus* pertencentes ao grupo *cochliodon* já investigadas.

Em investigações citogenéticas prévias realizadas em *Hypostomus* do grupo *cochliodon* mostrou em *H. soniae* do rio Teles Pires, Alta Floresta-MT, e em duas populações de *H. aff. cochliodon* do Corrêgo Pitaluga e do Corrêgo Esparramo, em Rondonópolis-MT, a ocorrência de $2n=64$ cromossomos, assim como encontrado para *H. soniae* do rio Tapajós no presente estudo (OLIVEIRA, 2013; BECKER et al., 2014).

H. soniae do rio Tapajós apresentou variação intraespecífica na localização de blocos heterocromáticos e na localização da região organizadora de nucléolo (NOR), sendo que o bandeamento C mostrou a distribuição de regiões heterocromáticas com três arranjos distintos, em machos blocos conspícuos de heterocromatina constitutiva estenderam-se pela maior parte do braço longo do par 26, já em fêmeas blocos conspícuos localizaram-se em dois pares de cromossomos acrocêntricos, pares 25 e 26, semelhante ao encontrado em *H. soniae* do rio Teles Pires (OLIVEIRA, 2013). Com base neste resultado apoiamos a hipótese proposta por Oliveira (2013) da existência de um sistema sexual nascente do tipo XX/XY na espécie *H. soniae*.

Filho (2017) pondera que a origem dos cromossomos sexuais do tipo XX/XY encontra-se associada a rearranjos cromossômicos seguidos por um acúmulo de heterocromatina, principalmente no cromossomo sexo específico. Através do bandeamento C a heterocromatinização identificada no par heteromórfico do par 26 em *H. soniae* sugere a formação inicial de um sistema sexual simples nesta espécie.

Seguimentos de heterocromatina estendendo-se por quase a totalidade dos braços longos de cromossomos acrocêntricos pode ser uma característica genética de espécies de *Hypostomus* do grupo *cochliodon*, pois embora poucas espécies do grupo tenham sido estudadas acerca da localização desses blocos, todas espécies do grupo já investigadas exibem esse padrão, como encontrado em *H. soniae* e *Hypostomus aff. cochliodon* (BECKER et al., 2014).

H. soniae apresentou variação intraespecífica na localização de sítios NORs, com um espécime possuído NORs múltiplos localizados em região telômerica de dois pares de

cromossomos acrocêntricos, em consonância com a maioria das espécies de *Hypostomus* já investigadas, porém, na maioria de exemplares de *H. soniae* do presente estudo prevaleceu sistema de NOR simples localizados em um par de cromossomos acrocêntricos, estas variações também foram reportadas para *H. soniae* do rio Teles Pires (OLIVEIRA, 2013).

A variação intraespecífica na posição de sítios NOR pode está ocorrendo no genoma da espécie investigada devido a eventos como a rearranjos cromossômicos, transferências de sítios ribossomais entre cromossomos por ações de mecanismos de elementos transponíveis.

Diferentes arranjos na localização de sítios NORs tem sido relatados para espécies de *Hypostomus*, como em *H. strigaticeps* que possui NOR simples, *H. aff. cochliodon* com NOR múltiplo em dois pares de cromossomos acrocêntricos e *H. nigromaculatus* do rio Tibagi, Paraná e Cachoeira de Emas, rio Mogi-Guaçu, São Paulo, com variação intraespecífica nos sítios NORs localizados na região terminal de dois pares de cromossomos acrocêntricos em alguns espécimes, e em sítios situado na região telomérica do braço curto em outros indivíduos desta espécie. O padrão de marcação da NOR localizadas em regiões teloméricas é o mais comum encontrado em *Hypostomus* (PANSONATO-ALVES et al., 2013; RUBERT et al., 2008; ALVES et al., 2012).

Regiões impregnadas pelo nitrato de prata podem ser livres de genes ribossômicos, por isso técnicas de Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) com sondas DNAr 18S devem ser realizadas para a confirmação dos sítios de DNAr (REIS et. al., 2013). No presente estudo as NORs ocorreram co-localizadas com a região DNAr evidenciada por hibridização com sonda 18S em *H. soniae*.

O mapeamento de regiões DNAr 5S não foi identificado para espécimes de *H. soniae* do rio Teles Pires (OLIVEIRA, 2013). Os espécimes investigados no presente estudo apresentaram sítios DNAr 5S em três pares cromossômicos.

No presente estudo realizou-se pela primeira vez o mapeamento físico de DNAr 5S, telômero, localização de genes histonas H1, H3 e snRNA u2 em *H. soniae*, desta forma contribuindo na compreensão da organização genômica destes elementos repetitivos em uma espécie de *Hypostomus* do grupo cochliodon.

Em *Hypostomus* a localização dos sítios 5S apresentam-se dispersos no genoma das espécies do grupo, evidenciando um padrão não conservado desta sequência de DNA repetitivo, como identificado em duas populações de *H. afinis* do córrego Jacuí, Cunha-SP, e em *H. nigromaculatus*, nestas espécies esses sítios foram localizados em apenas um par de cromossomos, em *H. ancistroides* apresentou três pares de cromossomos possuindo sítios 5S,

em *H. tapijara* e em *Hypostomus cf. plecostomus* do rio Tapajós foram identificados quatro pares de cromossomos com sítios DNAr 5S, (BRANDAO et al., 2018; TRALDI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

O mapeamento físico de genes histonas H1 e H3 em *H. soniae* mostrou-se conservado nesta espécie, com cluster localizado na região centrômerica de dois pares de cromossomos, semelhante a localização de gene histona H3 mapeadas em *H. strigaticeps* e em *H. nigromaculatus* (PANSONATO-ALVES et al., 2013).

7 CONCLUSÃO

H. soniae do rio Tapajós apresenta cariótipo com $2n=64$ cromossomos, com heteromorfismo de tamanho no par de cromossomos acrocêntricos 26, com variação intraespecífica na localização de regiões heterocromáticas nos citótipos de machos e fêmeas, que podem evidenciar a fase nascente de um sistema cromossômico sexual XX/XY, além disso, variações da localização de regiões organizadoras de nucléolo e genes ribossomais evidencia o polimorfismo populacional nesta espécie. O mapeamento físico de genes histona H1 e H3 realizados pela primeira vez nesta espécie mostrou caráter conservado destas seqüências de DNA repetitivo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A.L.; BORBA, R.S.; OLIVEIRA, C; NIRCHIO, M; GRANADO, A.; FORESTI, F. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 6, n. 4, p.443–452, 2012.
- ARMBRUSTER, J.W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, n. 141, p.1–80, 2004.
- ARMBRUSTER, J.W. The species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae). **Zootaxa**, n. 249, p.2-60, 2003. ISSN 1175-5334.
- ARMBRUSTER, J.; SOUZA, L.S.D. *Hypostomus macushi*, a new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from Guyana. **Zootaxa**. v.920, p.1–12, 2005.
- BAUMGARTNER, Q.; PAVANELLI, C.S.; BAUMGARTNER, D.; BIFI, A.G.; DEBONA, T.; FRANA, V.A. **Siluriformes**. 1ed. Maringá: Eduem, 2012.
- BECKER, Q.M.C.; CASTRO, R.J.; SILVA, A.M.; VIZZOTTO, P.C.; Cytogenetic characterization of two species of *Hypostomus* (Siluriformes:Loricariidae) from tributaries of the vermelho river, upper paraguay river basin. **Biodiversidade**, v. 13, n. 1, p.2-13, 2014.
- BRANDÃO, K.O.; REIS, D.A.R.; GARCIA, C.; PAZZA, R.; TOLEDO, L.F.A.; KAVALCO, K.F. Studies in two allopatric populations of *Hypostomus affinis* (Steindachner, 1877): the role of mapping the ribosomal genes to understand the chromosome evolution of the group. **Comparative Cytogenetics**, v. 12, n. 1, p.1–12, 2018.
- BURGOS, J.I.M. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, p.1855–1867, 2003.
- CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, p.393–400, 2010.
- CAMARGO, M.; JUNIOR, H.G.; PY-DANIEL, L.R. **Acaris ornamentais do médio Rio Xingu**. 1ed. Belém, 2012. ISBN 978-85-909319-1-1.
- CARVALHO, H.P.; WEBER, C. Five new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the middle and lower Amazon System. *Revue Suisse de Zoologie*, v. 111, n.4, p.953-978, 2004.
- CEREALI, S.S.; POMINI, E.; ROSA, R; ZAWADZKI, C.H.; FROEHLICH, O.; GIULIANO-CAETANO, L. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brasil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p.538-591, 2008.

COLGAN, D.J.; MCLAUCHLAN, A.; WILSON, G.D.F.; LIVINGSTON, S.P.; EDGEcombe, G.D.; MACARANAS, J.; CASSIS, G.; GRAY, M.R. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of Zoology**, v. 46, n. 5, p.419-437, 1998.

CUNHA, J.M.F.L. **Biodiversidade e sistemática molecular de Phreatobiidae (Ostariophysi, Siluriformes)- Com uma proposta sobre sua posição filogenética em Siluriformes e uma discussão sobre a evolução do hábito subterrâneo.** 2008, 33f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Ciências, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

FILHO, M.O. A origem dos cromossomos sexuais em peixes e a instabilidade dos sistemas múltiplos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 38, n.1 - Supl 1, p. 42,2017.

FRICK, R.; ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. Catalogo f fishes: Genera, species references. California Academy of Sciences. Abril, 2016. Acesso em 11 de abril de 2019.

GALARÇA, R.C.G.; MULLER, I.T.G.; FILHO, H.S.; SOARES, R.E.; CUNHA, P.; GRALHA, T.S.; PESSANO, E.F.C.; QUEROL, M.V.M. Período reprodutivo de fêmeas de *Hypostomus commersoni* Valenciennes, 1836, em uma barragem na bacia do rio Uruguai. **Biotemas**, v. 27, p.87-96, 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**, v. 37, p.563-575, 1990.

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

KOMYIA, H.; TAKEMURA, S. Nucleotide sequence 5S ribosomal from RNA rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) Liver. **Journal of Biochemistry**. v.86, p.1067-1080, 1979.

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

LIMA, F.C.T.; CARVALHO, P.H.; CLÁUDIO H. ZAWADZKI, C.H. Two new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Negro basin in Brazil. **Neotropical Ichthyology**. v. 8, n.1, p. 39-48, 2010.

LJDO, J.W.; WELLS, R.A.; BALDINI, A.; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_N generated by PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 19, n. 17, 1991.

LORSCHIEDER, C.A.; OLIVEIRA, J.I.N.; DULZ, T.A.; NOGAROTO, V., MARTINS-SANTOS, I.C.; VICARI, M.R. Comparative cytogenetics among three sympatric *Hypostomus*

species (Siluriformes: Loricariidae): na evolutionary analysis in a high endemic region. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 61, n.18180417, 2018. ISSN 1678-4324.

LUJAN, N.K.; WINEMILLER, K.O.; ARMBRUSTER, J.W. Trophic diversity in the evolution and community assembly of loricariid catfishes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, p.2-12, 2012.

LUJAN, N.K.; ARMBRUSTER, J.W.; LOVEJOY, N.R.; LOPÉZ-FERNÁNDEZ, H. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, p.1-20, 2014.

MARTINEZ, E.R.M.; ZAWADZKI, C.H.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 4, p.562-568, 2011.

MARTINS, C.; VICARI, M.R. **Hibridação in situ em cromossomos de peixes**. In: Marcelo Guerra. (Org.). **Citogenética Molecular: Protocolos Comentados**. 1ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, v. 1, p.59-88, 2012.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 4ed. John Wiley & Sons: New Jersey. p.1-622, 2006.

NELSON, J.S.; GRANDE, T.C.; WILSON M.V.H. **Fishes of the world**. 5ed. New Jersey: Wiley, 2016.

OHARA, W.M.; LIMA, F.C.T.; SALVADOR, G.N.; ANDRADE, M.C. **Peixes do Rio Teles Pires: Diversidade e Guia de Identificação**. 1ed. Goiânia: Gráfica e editora Amazonas, 2017. ISBN 978859367600-0.

OLIVEIRA, L.C.; RIBEIRO, M.O.; DUTRA, E.S.; ZAWADZKI, C.H.; PORTELA-CASTRO, A.L.B.; MARTINS-SANTOS, I.C. Karyotype structure of *Hypostomus* cf. *plecostomus* (Linnaeus, 1758) from Tapajós River basin, Southern Amazon: occurrence of sex chromosomes (ZZ/ZW) and their evolutionary implications. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p.6625-6634, 2015.

OLIVEIRA, L.C. **Caracterização citogenética de espécies de peixes da Amazônia Meridional: uma contribuição à estimativa da biodiversidade da região de Alta Floresta – MT**, 2013, 68f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

PANSONATO-ALVES, J.C.; SERRANO, E.A.; UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. **Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p.477-489, 2013.

PESSOA, E.K.R., SILVA, N.B.; CHELLAPA, N.T.; SOUZA, A.A.; CHELLAPA, A. Anatomy and histology of the digestive tract and feeding habits of the neotropical fish *Hypostomus puarum* (starks, 1913) (Osteichthyes: Loricariidae). **Animal Biology Journal**, New York, v. 4, n. 1, p.39-51, 2013.

PINKEL, D.S.; TRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **National Academy of Sciences**, v. 83, p.2934-2938, 1986.

QUEIROZ, L.J.; VILARA, G.T.; OHARA, W.M.; PIRES, T.H.S.; ZUANON, J.; DORIA, C.R.C. **Peixes do rio madeira**. São Paulo, v.2, p.354, 2013.

REIS, R.E.; PEREIRA, E.H.L.; ARMBRUSTER, J.W. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zoological Journal**, n. 147, p.277-299, 2006.

REIS, D.A.R.; BRANDÃO, K.O.; TOLEDO L.F.A.; PAZZA, R.; KAVALCO, K.F. Cytogenetic analysis of three *Hypostomus* species (loricariidae: hypostominae) from paraná river basin. **Evoluo e conservao da biodiversidade**, v. 4, n. 2, p50-58,2013.

ROXO, F.F.; OCHOA, L.O.; SABAJ, M.H.; LUJAN, N.K.; COVAIN, R.; SILVA, G.S.C., BRUNO F. MELO, B.F.; ALBERT, J.S; CHANG, J.; FORESTI, F.; ALFARO, M.A.; OLIVEIRA, C. Phylogenomic reappraisal of the Neotropical catfish Family Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) using ultraconserved elements. **Molecular Phylogenetics and Evolution** (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.017>.

RUBERT, M.; ROSA, R.; ZAWADZKI, C.H.; MARIOTTO, S.; MOREIRA-FILHO, O.; GIULIANO-CAETANO, L. Chromosome Mapping of 18S Ribosomal RNA Genes in Eleven *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae): Diversity Analysis of the Sites. **Zebrafish**, v.13, n. 4, 2016.

RUBERT, M.; ROSA, R.; JEREP, F.C.; BERTOLLO, L.A.C.; CAETANO, L.G. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity *Hypostomus*. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 5, p.397–410, 2011.

RUBERT, M.; ZAWADZKI, C.H.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v.6, n.1, p.93-100, 2008.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, v.58, p.307-324, 1976.

SILVA, G.J.C. **Análise filogenética entre gneros da subfamília Loricariinae (Siluriformes:Loricariidae) com ênfase no gênero *Harttia*, baseada em caracteres moleculares**. 2009, 73f. Dissertao (Mestrado) Programa de Pós-Graduao em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

SILVA, G.S.C.; ROXO, F.F.; LUJAN, N.K.; TAGLIACOLO, V.A.; ZAWADSKI, C.A.; OLIVEIRA,C. Transcontinental dispersal, ecological opportunity and origins of an adaptive radiation in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes:Loricariidae). **Molecular ecology**, v.25, p.1511-1529, 2016.

- SOARES, M.G.M.; COSTA, E.L.; SIQUEIRA SOUZA, F.K.; ANJOS, H.D.B.; YAMAMOTO, K.C.; FREITAS, C.E.C. Peixes de lagos do Médio Rio Solimões. 2ed. **Revista Instituto Piatam**: Manaus, p.1-176, 2008.
- SOUZA, A.L.P.; MACIEL, L.A.M; RODRIGUES, L.R.R. Estudo da comercialização de peixes ornamentais da família Loricariidae (Siluriformes) em Santarém/PA. **PUBVET, Medicina veterinária e zootecnia**. v.12, n.9, a176, p.1-7, 2018.
- SUMNER, A.T. A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p.304–306, 1972.
- TRALDI, J.B.; VICARI, M.R. BLANCO, D.R.; MARTINEZ, J.F.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, n. 2, p.115–125, 2012.
- TRALDI, J.B.; BLANCO, D.R.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; BARROS, A.V.; ARTONI, R.F.; FILHO, O.M. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p.463-471, 2013.
- TENCATT, L.F.C.; ZAWADZKI, C.H.; FROEHLICH, O. Two new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paraguay basin, with a redescription of *Hypostomus cochliodon* Kner, 1854. **Neotropical Ichthyology**. v. 12, n. 3, p.585-602, 2014.
- ZAWADZKI, C.H.; CARVALHO, H.P. A new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Aripuanã basin in Brazil. **Neotropical Ichthyology**. v. 12, n.1, p.43-51, 2014.
- ZAWADZKI, C.H.; OLIVEIRA, A.S.; OLIVEIRA, R.R.; PY-DANIEL, L.H.R. *Hypostomus melanepheles*, a new armored catfish species from the rio Tapajós basin, Brazil (Teleostei: Loricariidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. v. 26, n. 1, p.49-58, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A- ESPÉCIMES COLECIONADOS NO PRESENTE TRABALHO

Número de campo	Espécie	Local	Peso (g)	CP (mm)	Sexo
PMT-137	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	12	630	Não
PMT-138	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	180	170	Fêmea
PMT-139	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	80	140	Fêmea
PMT-140	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	42	110	Fêmea
PMT-141	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	115	160	Macho
PMT-142	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	89	150	Macho
PMT-143	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	79	135	Fêmea
ARAP-1	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	68	140	Macho
ARAP-2	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	78	145	Fêmea
ARAP-3	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	48	130	Fêmea
ARAP-4	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	59	130	Fêmea
ARAP-5	<i>H. soniae</i>	Rio Tapajós, Vila Pimental, Itaituba	56	130	Macho

APÊNDICE B- PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO CITOGENÉTICA DE PEIXES ADAPTADO PARA LORICARIIDAE, CONFORME PROPOSTO POR GOLD ET AL. (1990)

- 1- Realizar a indução mitogênica por injeção subcutânea de suspensão de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Florax 100 milhões/mL - Hebron) por 48 horas.
- 2- Anestesiá-lo com Cloridrato de Lidocaína 2% gotejado sobre as brânquias e eutanásia-lo por secção medular.
- 3- Retirar o rim e colocá-lo em uma cuba de vidro contendo 5 ml de solução modificada de Hanks (ou meio rpmi1640 ou TC199, com ou sem soro fetal bovino).
- 4- Dissociar o material, com o auxílio de uma pinça de dissecação e de um macerador de vidro.
- 5- Adicionar três gotas de colchicina a 0,0125%.
- 6- Incubar em estufa a 37°C por 20 minutos.
- 7- Ressuspender o material, utilizando uma pipeta Pasteur, e centrifugá-lo, por 10 minutos, a 900 rpm.
- 8- Remover o sobrenadante, com uma pipeta Pasteur, e acrescentar 10 ml de solução hipotônica de KCL a 0,075M.
- 9- Ressuspender o material e incubá-lo por 12 minutos, em estufa a 37°C.
- 10- Ao final deste tempo acrescenta-se 5 gotas de fixador Carnoy (álcool metílico + ácido acético, na proporção 4:1 v/v), recém preparado e gelado.
- 11- Ressuspender o material com uma pipeta Pasteur e centrifuga-se por 7 minutos a 900 rpm.
- 12- Remover o sobrenadante com uma pipeta Pasteur, e acrescentar 5ml de fixador Carnoy, e manter durante a primeira fixação o tubo em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 13- Centrifugar a preparação por 7 minutos a 900 rpm, retirar o sobrenadante e adicionar 5 ml de fixador Carnoy (3x).

APÊNDICE C- PROTOCOLO PARA A TÉCNICA DE BANDEAMENTO C SEGUNDO SUMNER (1972), COM MODIFICAÇÕES

- 1- Envelhecer as preparações em lâminas por 5 dias em estufa a 60°C.
- 2- Tratar a lâmina preparada com HCl 0,2 N A 42°, por 10 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 20 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 30 minutos;
- 9- Lavar com água destilada e secar ao ar.

APÊNDICE D- PROTOCOLO PARA A TÉCNICA DE MARCAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLO (NORs) POR NITRATO DE PRATA (HOWELL & BLACK, 1980)

- 1- Envelhecer a lâmina em estufa a 60°C por no mínimo 1 hora.
- 2- Hidrolisar a lâmina em HCl 0,2N, a 37°C por 10 minutos.
- 3- Lavar com água destilada e seca em temperatura ambiente.
- 4- Por a lâmina em um suporte para ficar acima do plano da bancada e então goteja-se sobre a preparação cromossômica, uma gota de gelatina incolor a 2% + 100 µl de ácido fórmico.
- 5- Adicionar sobre a gota de gelatina, duas gotas de solução aquosa de AgNO₃ (nitrate de prata) a 50%.
- 6- Cobrir com lamínula e colocar em uma câmara úmida, em banho-maria a 60°C por um período de 7 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 a 5% por 30 segundos.

APÊNDICE E- TÉCNICA DE MARCAÇÃO COM FLUOROCROMOS CROMOMICINA A3-VERDE METIL-DAPI, CONFORME PROPOSTO POR SCHWEIZER (1976)

- 1- Usar laminas novas com 1 a 2 dias de preparada.
- 2- Incubar com CMA3 em câmara úmida escura por 40 minutos, lavar com tampão pH5.6, e secar ao ar.
- 3- Incubar em Verde Metil (Sol. Uso) por 40 minutos, lavar com tampão pH5.6, secar ao ar.
- 4- Incubar em DAPI (Sol. Uso) por 40 minutos, lavar com tampão pH5.6, secar ao ar.
- 5- Montar a lamina lamínula com antifade Vectashild, retirar o excesso em bloquinho de papel filtro.
- 6- Selar com esmalte e guardar em caixa escura na geladeira por 4 dias.

APÊNDICE F- PROTOCOLO DE FISH COM 1 SONDA DE DNA REPETITIVO (SINGLE FISH) (PINKEL ET AL., 1986)

Tratamento com RNase

- 1- Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 minutos em temperatura ambiente (Shaker).
- 2- Desidratar as lâminas em série alcoólica 70,85 e 100%, 4 minutos cada (secar).
- 3- Incubar as laminas em 40 µl de RNase (0,4% RNase-2xSSC a 37⁰C por 40 minutos em câmara úmida com agua mili-Q).
- 4- Lavar 3x por 4 minutos em 2xSSC.
- 5- Lavar durante 5 minutos em PBS 1x.

Tratamento com Pepsina

- 6- Incubar as lâminas por 15 minutos em solução de pepsina 0,005% (em 10Mm HCL) a 37⁰C.
- 7- Lavar em PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente (Shaker).

Fixação

- 8- Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 9- Lavar durante 5 minutos em PBS 1x (Shaker).
- 10- Desidratar as lâminas em série alcoólica (70,85, 100%) por 5 minutos cada.

Desnaturação e Montagem de Hibridização

- 11- Desnaturar o DNA cromossômico com formamida a 70% em 2Xssc a 70⁰C por 40 segundos.
- 12- Transferir imediatamente para álcool 70% gelado por 4 minutos para interromper a ação da formamida.
- 13- Bateria de álcool: álcool 70% por 2 minutos (1x) 90% por 2 minutos (2x), 100% por 10 minutos (2x), todos em temperatura ambiente.
- 14- Desnaturar a sonda em água fervente no micro-ondas por 10 minutos e passar imediatamente ao gelo.

15- Colocar 30 µl do mix de hibridização sobre a lamínula (24x32) e inverter a lâmina sobre a lamínula. Manter as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37⁰C overnight.

Lavagens pós hibridização (Banho de estringência)

- 16- Remover a lamínula e lavar em 2 xSSC a 40⁰C por 1 minuto.
- 17- Lavar em 4xSSC/Tween20 a 40⁰C por 1 minuto.
- 18- Incubar em tampão NFDm por 5 minutos a temperatura ambiente.

Deteccção

- 19- Para cada lâmina, aplicar 100µl de solução de deteccção: 1) **Sondas com Biotina** (0,3 µl de Avidina Cy3+ 100 µl de 4xSSC/Tween20) ou (1 µl de Avidina FITC 1mg/ml + 99 µl de 4xSSC/Tween20); **Sondas com Digoxigenina** (1 µl de Anti-digoxigenina (200µg) + 99 µl de 4xSSC/Tween20).
- 20- Inverter a lâmina sobre a lamínula e incubar por 30 minutos em câmara úmida a 37⁰C.

Amplificação do sinal

- 21- Remover a lamínula e lavar em 4xSSC/Tween20 por 5 minutos (1x), a temperatura ambiente (Shaker).
- 22- Aplicar 20µl de Anti-avidina sobre uma lamínula e inverter a lamina sobre a lamínula. Incubar 10 minutos em câmara úmida a 37⁰C.
- 23- Remover a lamínula e lavar em 4xSSC/Tween20 por 3 minutos (2x), a temperatura ambiente.
- 24- Repetir a etapa de deteccção; repetir o passo 23.

Montagem com Antifading

- 25- Aplicar na lâmina 20µl de antifading Vectashield+DAPI 0.01mg/ml (1:1:v/v).
- 26- Cobrir com lamínula (24x32) e prensar em bloquinho de papel filtro. Guardar a 4⁰C para estabilização.