



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARIANA COSTA TERRA

**CONTRIBUIÇÃO AOS ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM  
PEIXES DAS FAMÍLIAS HEPTAPTERIDAE E PIMELODIDAE  
(SILURIFORMES) DO RIO SOLIMÕES, BACIA AMAZÔNICA**

---

Londrina  
2018



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

**MARIANA COSTA TERRA**

**CONTRIBUIÇÃO AOS ESTUDOS CITOGENÉTICOS  
EM PEIXES DAS FAMÍLIAS HEPTAPTERIDAE E  
PIMELODIDAE (SILURIFORMES) DO RIO SOLIMÕES,  
BACIA AMAZÔNICA**

---

Londrina – Paraná  
2018

MARIANA COSTA TERRA

**CONTRIBUIÇÃO AOS ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM  
PEIXES DAS FAMÍLIAS HEPTAPTERIDAE E PIMELODIDAE  
(SILURIFORMES) DO RIO SOLIMÕES, BACIA AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Dias

Co-orientadora: Dra. Joana Neres da Cruz  
Baldissera

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Terra, Mariana Costa.

Contribuição aos estudos citogenéticos em peixes das famílias Heptapteridae e Pimelodidae (Siluriformes) do rio solimões, bacia Amazônica / Mariana Costa Terra. - Londrina, 2018.  
92 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.

Coorientador: Joana Neres da Cruz Baldissera.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Citogenética de Peixes - Tese. 2. Família Heptapteridae e Pimelodidae - Tese. 3. Integração de dados citogenéticos e filogenéticos - Tese. 4. Reconstrução de caráter citogenético ancestral - Tese. I. Dias, Ana Lúcia. II. Neres da Cruz Baldissera, Joana. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

MARIANA COSTA TERRA

**CONTRIBUIÇÃO AOS ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES DAS  
FAMÍLIAS HEPTAPTERIDAE E PIMELODIDAE (SILURIFORMES) DO  
RIO SOLIMÕES, BACIA AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Dias  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Alberto Sergio Fenocchio  
Universidad Nacional de Misiones - UM

---

Profa. Dra. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de julho de 2018.

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, que me apoiaram e me fortaleceram nos momentos difíceis, serei eternamente grata. A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho e para meu aprendizado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar meu caminho até este momento e por toda força concedida para a realização deste sonho.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste curso de mestrado. Agradeço também ao corpo docente do curso por todo o conhecimento transmitido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão do auxílio financeiro.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Dias por me aceitar como aluna e pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Sou muito grata por todos os ensinamentos, pela compreensão e principalmente pela paciência que sempre esteve presente durante esses dois anos no laboratório. Exemplo de profissionalismo e dedicação que vou carregar para o resto da vida. Muito obrigada por todo o carinho e por todos os momentos compartilhados, gratidão resume esta experiência em minha vida.

À minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Joana Neres da Cruz Baldissera que é uma pessoa incrível, sempre disposta a ajudar o próximo. Muito obrigada pela paciência com este trabalho, por todas as sugestões e correções realizadas. A FISH não teria dado certo se não fosse sua ajuda, me socorrendo sempre que necessário.

Às professoras Dr<sup>a</sup> Lucia Giuliano Caetano e Dr<sup>a</sup> Renata da Rosa pelas contribuições para este trabalho, desde a primeira versão entregue ainda na especialização, por todos os ensinamentos e pela disponibilidade sempre presente para esclarecimento de dúvidas.

Agradeço à Dr<sup>a</sup> Eliana Feldberg pelo empréstimo do Laboratório de Genética Animal do INPA, bem como aos pesquisadores Dr. Jansen Alfredo Sampaio Zuanon (INPA), Dr<sup>a</sup> Lúcia Helena Rapp Pydaniel (INPA) e Dr. José Luís Olivan Birindelli (UEL) pelo auxílio na identificação das espécies, que foram indispensáveis à realização da pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, tanto da qualificação quanto da defesa, Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Swarça, Dr<sup>a</sup> Lucia Giuliano Caetano, Dr<sup>a</sup> Renata da Rosa e Dr. Alberto Sergio Fenocchio, pelas críticas e sugestões que irão contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal (LACA), por todos os ensinamentos que até então eu não tinha. Muito obrigada pela disponibilidade de

ajuda que nunca me faltou, pelos momentos de descontração e pelo apoio nas horas de angústia. Agradeço em especial o MSc Fábio Hiroshi Takagui por muitos motivos: pela realização das coletas, por me conceder o material analisado, pelos ensinamentos e principalmente por sanar todas as minhas dúvidas sempre com muita disposição. É mais um exemplo a ser seguido que cruzou o meu caminho durante o mestrado.

Àos meus queridos professores da graduação Dr. Bruno Ambrózio Galindo e Dr. Dhiego Gomes Ferreira, por continuarem me apoiando e motivando mesmo depois da faculdade. Por influência destes dois grandes pesquisadores concretizo mais esta etapa na minha vida.

Aos meus familiares que me apoiam em todos os momentos e torcem pela minha realização profissional. Em especial agradeço aos meus pais e minha irmã, pessoas tão importantes na minha vida. À minha mãe agradeço por todo apoio, dedicação e carinho que, mesmo de longe, se fazem presentes. Com toda certeza é minha maior incentivadora. Ao meu pai agradeço por toda paciência, cuidado e carinho, sempre tão prestativo nesse período me dando forças nos dias difíceis e principalmente me salvando nas edições das imagens, com toda certeza não conseguiria sozinha. Obrigada por acreditarem em mim, mais até que eu mesma. Amo muito vocês!

Agradeço aos amigos que a vida me presenteou e que ainda seguem comigo na pós-graduação, Moema Lima, Jéssica Bernardes, Tiago Alvim, Jhonata Fragozo, Lennara Alvez, Carlos Vieira, Same Costa, compartilhando as emoções deste momento. Também aos amigos Ludierri, Ana Balconi, Renan Pimentel, Jéssica Meschine, Jéssica Porfírio, Elaine Soares, Bárbara Lopes por continuarem presentes na minha vida, mesmo que distantes fisicamente. Agradeço também aos novos amigos que fiz durante o mestrado, de cursos e laboratórios diferentes, que viveram momentos de muita alegria junto comigo.

Muito obrigada a todos que participaram dessa importante etapa.

“É preciso força pra sonhar e perceber  
que a estrada vai além do que se vê”.  
(Los Hermanos)

TERRA, M. C. **Contribuição aos estudos citogenéticos em peixes das famílias Heptapteridae e Pimelodidae (Siluriformes) do rio Solimões, bacia Amazônica.** 2018. 92 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Dentre as famílias pertencentes à ordem Siluriformes, Heptapteridae e Pimelodidae estão entre as mais diversificadas, sendo amplamente distribuídas na região neotropical. Ambas são famílias de grande representatividade considerando o número de espécies, porém, poucas espécies apresentam análises citogenéticas e filogenéticas na região Amazônica, região com grande biodiversidade a ser explorada. Neste estudo foram analisadas citogeneticamente uma espécie de Heptapteridae, *Pimelodella cristata*, e três espécies de Pimelodidae, *Calophysus macropterus*, *Propimelodus eigenmanni* e *Exallodontus aguanae*, coletadas no rio Solimões, bacia Amazônica. *Pimelodella cristata* apresentou  $2n=46$  e  $NF=88$ , com fórmula cariotípica  $22m+18sm+2st+4a$ ; *C. macropterus* apresentou  $2n=50$  e  $NF=90$ , com  $20m+20sm+10a$ . As outras duas espécies possuem  $2n=56$ , mas diferiram quanto à fórmula cariotípica, sendo que *Propimelodus eigenmanni* foi caracterizado por  $28m+20sm+2st+6a$  e  $NF=106$  e *E. aguanae* por  $36m+12sm+2st+6a$  e  $NF=106$ . As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) se mostraram simples para todas as espécies analisadas, correspondentes ao fluorocromo  $CMA_3$  e ao sítio de DNAr 18S porém, variações relacionadas à localização deste marcador foram observadas. As sequências de DNAr 5S foram encontradas em apenas um par cromossômico nas espécies *Propimelodus eigenmanni* e *Exallosontus aguanae*, enquanto *Pimelodella cristata* e *Calophysus macropterus* apresentaram quatro sítios deste gene. Foi possível observar sintenia entre os genes ribossomais 18S e 5S em *E. aguanae* e *C. macropterus*. A heterocromatina mostrou-se distribuída em diferentes regiões, também correspondente às constrições secundárias. Os dados aqui apresentados são os primeiros para este grupo de peixes da bacia Amazônica, exceto para *C. macropterus*. As espécies analisadas apresentaram algumas características citogenéticas particulares, geralmente não encontradas na literatura. Neste estudo foi também realizada uma análise integrada associando dados filogenéticos moleculares com dados cariotípicos, sendo inferidos prováveis caracteres ancestrais ( $2n$  e Ag-RON) dentro da família Pimelodidae e do gênero *Pimelodella*, assim como condições derivadas e seus possíveis processos de mudança ao longo da evolução cariotípica que poderão contribuir para um melhor entendimento da estrutura e da evolução cariotípica nestes grupos de peixes, bem como suas relações filogenéticas.

**Palavras-chave:** Bandamentos cromossômicos. Caráter ancestral. Relações filogenéticas.

TERRA, M. C. **Contribution to cytogenetic studies in fish from the Heptapteridae and Pimelodidae (Siluriformes) families of the Solimões River, Amazon Basin.** 2018. 92 p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Among the families belonging to the order Siluriformes, Heptapteridae and Pimelodidae are among the most diversified, being widely distributed in the neotropical region. Both are highly representative families considering the number of species, but few species present cytogenetic and phylogenetic analyzes in the Amazon region, a region with great biodiversity to be explored. In this study, a species of Heptapteridae, *Pimelodella cristata*, and three species of Pimelodidae, *Calophysus macropterus*, *Propimelodus eigenmanni* and *Exallodontus aguanae*, collected in the Solimões River, in the Amazon Basin, were cytogenetically analyzed. *Pimelodella cristata* presented  $2n = 46$  and  $NF = 88$ , with karyotypic formula  $22m + 18sm + 2st + 4a$ ; *C. macropterus* presented  $2n = 50$  and  $NF = 90$ , with  $20m + 20sm + 10a$ . The other two species have  $2n = 56$ , but differed as to the karyotype formula, being that *Propimelodus eigenmanni* was characterized by  $28m + 20sm + 2st + 6a$  and  $NF = 106$  and *E. aguanae* by  $36m + 12sm + 2st + 6a$  and  $NF = 106$ . The nucleoli organizing regions (RONs) were shown to be simple for all analyzed species, corresponding to the fluorochrome CMA<sub>3</sub> and the 18S rDNA site, however, variations related to the localization of this marker were observed. 5S rDNA sequences were found in only one chromosomal pair in the species *Propimelodus eigenmanni* and *Exallodontus aguanae*, while *Pimelodella cristata* and *Calophysus macropterus* showed four sites of this gene. It was possible to observe syntenia between 18S and 5S ribosomal genes in *E. aguanae* and *C. macropterus*. Heterochromatin was distributed in different regions, also corresponding to the secondary constrictions. The data presented here are the first for this group of fish from the Amazon basin, except for *C. macropterus*. The analyzed species presented some particular cytogenetic characteristics, generally not found in the literature. In this study, an integrated analysis was also performed, associating molecular phylogenetic data with karyotype data, ancestral characters ( $2n$  and Ag-ROn) within the family Pimelodidae and the genus *Pimelodella* were inferred, as well as derived conditions and their possible processes of change along the karyotype evolution that may contribute to a better understanding of the karyotype structure and evolution in these fish groups, as well as their phylogenetic relationships.

**Keywords:** Chromosomal banding. Ancestral character. Phylogenetic relationships.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

- Figura 1 –** Cladograma simplificado da família Heptapteridae, proposto por Bockmann e Miqueralena (2008). Cada letra (A, B, C, D, E) representa um grupo, com base em sinapomorfias compartilhadas entre as espécies.....24
- Figura 2 –** Cladograma mostrando as relações filogenéticas na família Pimelodidae, com base em marcadores moleculares, nucleares e mitocondroais combinados (LUNDBERG et al., 2011). \***LN** = clado *Leiarius-neopimelodines*, **N** = *neopimelodines*, **S** = *sorubimines*, **OCP** = clado *Pimelodus ornatus-Calophysus-Pimelodus*, **CP** = clado *Calophysus-Pimelodus*, **C** = *calophysines*, **P** = *pimelodines*, **EA** = grupo *Exallodontus-Pimelodus altíssimus*, **PI** = grupo *Pimelodus* .....25
- Figura 3 –** Fotos representativas dos exemplares: a) *Pimelodella cristata*, b) *Calophysus macropterus*, c) *Propimelodus eigenmanni* e d) *Exallodontus aguanae* (Foto: FishBase a, Foto: Livro - Peixes do rio Madeira, v. 3, b, c, d).....26
- Figura 4 –** Mapa apresentando os pontos de coleta, rio Solimões – municípios: Iranduba (círculo rosa) e Manaus (círculo vermelho). Foto: MSc. Fábio Hiroshi Takagui .....26
- 
- Capítulo 1**
- Figura 1 –** Cariótipo com coloração convencional de *Calophysus macropterus* (a), *Propimelodus eigenmanni* (b) e *Exallodontus aguanae* (c). Nos boxes, os pares cromossômicos com Ag-RON, fluorocromo CMA<sub>3</sub>, FISH com sonda de DNAr 18S (sinal verde) e 5S (sinal vermelho)52

- Figura 2 –** Cariótipo com bandamento C evidenciando os blocos heterocromáticos de *Calophysus macropterus* (a), *Propimelodus eigenmanni* (b) e *Exallodontus aguanae* (c). Note os pares cromossômicos 21, 26 e 1 em (a), (b) e (c), respectivamente, com bloco heterocromático associado às RONS. Marcações biteloméricas evidentes nos pares 1 e 7 em (b) e (c), respectivamente .....53
- Figura 3 –** Reconstrução do caráter ancestral do número diploide (a) e da localização da Ag-RON (b) na família Pimelodidae. Modelo de reconstrução do estado ancestral utilizado a máxima verossimilhança, sob o modelo de probabilidade MK1 (Markov k-state), no software Mesquite versão 3.0. A reconstrução do caráter ancestral foi estimada a partir da árvore de Máxima Parcimônia de sequências nucleares e mitocondriais, respeitando a regra majoritária de 50% (LUNDBERG et al., 2011). As espécies que não possuem dados citogenéticos são representadas pelos círculos listrados em cinza .....54
- Figura 4 –** Cladograma mostrando as relações filogenéticas na família Pimelodidae, com base em marcadores moleculares (LUNDBERG et al., 2011). Em vermelho os números diploides encontrados na literatura. \*LN = clado *Leiaris-neopimelodines*, N = *neopimelodines*, S = *sorubimines*, OCP = clado *Pimelodus ornatus-Calophysus-Pimelodus*, CP = clado *Calophysus-Pimelodus*, C = *calophysines*, P = *pimelodines*, EA = grupo *Exallodontus-Pimelodus altíssimus*, PI = grupo *Pimelodus*.....55

## Capítulo 2

- Figura 1 –** Cariótipo de *Pimelodella cristata* com coloração convencional (a) e com bandamento C, evidenciando os blocos heterocromáticos (b). No box, o par cromossômico 22 com Ag-RON, fluorocromo CMA<sub>3</sub> e sonda de DNAr 18S (sinal verde), sendo possível observar um heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos, e dois pares cromossômicos com sonda de DNAr 5S (sinal vermelho) .....84
- Figura 2 –** Árvore filogenética consenso com análise prévia das relações entre espécies do gênero *Pimelodella*, considerando o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI). Valores de Máxima Verossimilhança representados em preto e Valores Bayesianos representados em vermelho.....85
- Figura 3 –** Reconstrução do caráter ancestral do número diploide (a) e da localização da Ag-RON (b) no gênero *Pimelodella*. Modelo de reconstrução do estado ancestral utilizado a máxima verossimilhança, sob o modelo de probabilidade Mk1 (Markov k-state), no software Mesquite versão 3.0. A reconstrução do caráter ancestral foi estimada a partir da árvore de Máxima Verossimilhança de sequência mitocondrial (COI), realizada no presente estudo. As espécies que não possuem dados citogenéticos são representadas pelos círculos listrados em cinza.....86

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

- Tabela 1 –** Dados citogenéticos sobre a família Pimelodidae, atualizados a partir de Swarça et al. (2017).....56
- Tabela 2 –** Valores proporcionais das probabilidades em cada nó, estimando qual o provável caráter ancestral na família Pimelodidae (2n e Ag-RON). Reconstrução do estado ancestral utilizando a máxima verossimilhança, sob o modelo de probabilidade Mk1, no software Mesquite versão 3.0.....60

### Capítulo 2

- Tabela 1 –** Dados citogenéticos sobre o gênero *Pimelodella*, atualizados a partir de Gouveia (2016) .....87
- Tabela 2 –** Lista de espécies utilizadas para gerar a árvore consenso do gênero *Pimelodella*, com seus respectivos locais de coletas e código de acesso no banco de dados BOLD Systems .....89
- Tabela 3 –** Valores proporcionais das probabilidades em cada nó, estimando qual o provável caráter ancestral no gênero *Pimelodella* (2n e Ag-RON). Reconstrução do estado ancestral utilizando a máxima verossimilhança, sob o modelo de probabilidade MK1, no software Mesquite versão 3.0.....89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Agência Nacional de Águas
AHIMOR	Administração das Hidrovias da Amazônia Oriental
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
MZUEL	Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina
Ag-RONs	Regiões Organizadoras de Nucléolos coradas com nitrato de prata
RON	Região Organizadora de Nucléolo
CMA <sub>3</sub>	cromomicina A <sub>3</sub>
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
NF	número fundamental
2n	número diploide
m-	metacêntrico
sm	submetacêntrico
st	subtelocêntrico
a	acrocêntrico
p	braço curto
q	braço longo
peric	pericentromérica
subt-	subterminal
crs	cromossomo

## SUMÁRIO

1.	Introdução .....	1
2.	Revisão da Literatura .....	3
2.1	<i>BACIA AMAZÔNICA</i> .....	3
2.2	<i>CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS FAMÍLIAS HEPTAPTERIDAE E PIMELODIDAE</i> .....	4
2.3	<i>CITOGENÉTICA DO GÊNERO PIMELODELLA</i> .....	8
2.4	<i>CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA PIMELODIDAE</i> .....	11
3.	Objetivos .....	16
3.1	<i>OBJETIVOS GERAIS</i> .....	16
3.2	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> .....	16
4.	Espécies estudadas e Locais de coleta .....	17
4.1	<i>ESPÉCIES ESTUDADAS</i> .....	17
4.2	<i>LOCAIS DE COLETA</i> .....	17
5.	Referências Bibliográficas.....	18
	Capítulo 1 .....	27
	<i>RESUMO</i> .....	28
	<i>INTRODUÇÃO</i> .....	29
	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	32
	<i>RESULTADOS</i> .....	35
	<i>DISCUSSÃO</i> .....	38
	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	46
	Capítulo 2 .....	61
	<i>RESUMO</i> .....	62
	<i>INTRODUÇÃO</i> .....	63
	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	65
	<i>RESULTADOS</i> .....	70
	<i>DISCUSSÃO</i> .....	72
	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	80
6.	Considerações Finais.....	90

## 1. Introdução

Considerando a região Neotropical, as ordens Siluriformes e Characiformes representam o maior número de espécies de peixes (NELSON, 2006). Dentre as famílias pertencentes à ordem Siluriformes, Heptapteridae está entre as mais diversificadas, com 218 espécies válidas (ESCHMEYER e FONG, 2018). A primeira revisão citogenética nesta família foi realizada em 2007 por Swarça e colaboradores. Gouveia (2016) fez um novo levantamento citogenético totalizando 40 espécies analisadas e, por fim, Conde-Saldaña et al. (2017) apresentaram em seu trabalho a análise citogenética de mais uma espécie, *Pimelodella* cf. *chagresi* (Steindachner, 1876), coletada na bacia Amazônica (Tabela 1 do Capítulo 2, pág. 87).

A família Pimelodidae é composta por 114 espécies válidas (ESCHMEYER e FONG, 2018) sendo que, atualmente, 38 espécies já foram analisadas citogeneticamente, incluindo as do presente estudo (Tabela 1 do Capítulo 1, pág. 56).

Poucos estudos citogenéticos foram realizados envolvendo espécies de Heptapteridae e Pimelodidae da bacia Amazônica. Até o momento, apenas cinco espécies pertencentes à família Pimelodidae foram coletadas e analisadas citogeneticamente: *Pimelodus blochii* Valenciennes, 1840 (DELLA-ROSA et al., 1980), *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) e *P. tigrinum* (Valenciennes, 1840) (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992), *Calophysus macropterus* (Lichtenstein, 1819) (RAMIREZ-GIL et al., 1998) e *Phractocephalus hemiliopterus* (Bloch & Schneider, 1801) (SWARÇA et al., 2017), enquanto que, para a família Heptapteridae, nenhuma espécie da bacia Amazônica foi analisada.

Considerando a rica biodiversidade da região e a escassez de dados cariotípicos envolvendo heptapterídeos e pimelodídeos da bacia Amazônica, o

1 presente estudo busca caracterizar citogeneticamente, por meio de marcadores  
2 cromossômicos, diferentes espécies destas duas famílias coletadas no rio Solimões  
3 e comparar o padrão cariotípico encontrado com o de outras espécies das  
4 respectivas famílias. Além disto, motivados a uma melhor compreensão das relações  
5 entre as espécies destas famílias, este trabalho busca associar dados filogenéticos  
6 moleculares com dados cromossômicos disponíveis na literatura, sendo esta uma  
7 importante análise integrada que fornece informações para o maior entendimento da  
8 estrutura e evolução de seus cariótipos, bem como as hipóteses evolutivas neste  
9 grupo de peixes.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1 Bacia Amazônica

De acordo com a Agência Nacional de Águas, a Bacia Amazônica é a maior região hidrográfica existente, conhecida mundialmente por sua disponibilidade hídrica. Esta bacia compreende cerca de 6 milhões de km<sup>2</sup>, ocupando a área dos andes peruanos até a foz do rio Amazonas, no oceano atlântico, abrangendo território de sete países da América do Sul: Brasil, Colômbia, Bolívia, Equador, Guiana, Peru e Venezuela (ANA - edição especial da publicação Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil, 2015).

Santos e Santos (2005) destacam que nesta bacia há um grande complexo de drenagens, formado por rios, lagos, igarapés e canais. Os rios Amazonas, Xingu, Solimões, Madeira e Negro estão entre os principais da bacia Amazônica, onde destaca-se o rio Solimões-Amazonas como coletor final deste complexo sistema de drenagens (ANA - edição especial da publicação Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil, 2015).

De acordo com a Administração das Hidrovias da Amazônia Oriental (AHIMOC, 2002), o rio Solimões possui 1.620 quilômetros de extensão, de Tabatinga na fronteira com o Peru, até a região de confluência com o Rio Negro, no município de Manaus, sendo os rios Javari, Japurá e Juruá alguns exemplos de afluentes deste rio.

Nesta bacia, há uma variação periódica do nível das águas que, em média, varia de 8 a 15 metros entre os períodos de seca e cheia. Inicialmente, há um período de enchente entre dezembro e abril, passando pela cheia nos meses de maio e junho, vazante entre julho e setembro e, por fim, a seca, entre outubro e novembro (SANTOS e SANTOS, 2005). Segundo Bittencourt e Amadio (2007), esta

1 variação do nível das águas é um fator determinante para a comunidade de  
2 organismos aquáticos presentes neste habitat.

3 Quando analisada, a comunidade íctica na bacia amazônica se mostra muito  
4 rica e diversa, estimando-se que em seus rios existam três mil espécies diferentes  
5 de peixes (QUEIROZ et al., 2013). Esta grande biodiversidade da região Amazônica  
6 não está relacionada somente à sua grande área de extensão, mas também é  
7 reflexo de eventos históricos que ocorreram há milhares de anos atrás, desde o  
8 surgimento da Cordilheira dos Andes, segundo estudos de Hoorn et al. (2010) que  
9 compararam este evento histórico com evidências geológicas, ecológicas e  
10 filogenéticas encontradas na literatura.

## 11 **2.2 Considerações gerais sobre as famílias Heptapteridae e Pimelodidae**

12 As famílias Heptapteridae e Pimelodidae pertencem à ordem Siluriformes,  
13 composta por 3.891 espécies válidas distribuídas em 39 famílias (ESCHMEYER e  
14 FONG, 2018). De acordo com Nelson (2006), os Siluriformes juntamente com os  
15 Characiformes, possuem o maior número de espécies em toda a região Neotropical,  
16 que é a mais diversificada e rica do mundo.

17 Segundo Baumgartner et al. (2012), as espécies da ordem Siluriformes têm  
18 como característica o corpo nu ou revestido por placas dérmicas, habituadas a viver  
19 próximas ao substrato e amplamente distribuídas nas Américas Central e do Sul  
20 (BOCKMANN e GUAZZELLI, 2003).

21 A família Heptapteridae é considerada uma das maiores em número de  
22 espécies, constituída por 32 gêneros e 218 espécies válidas (ESCHMEYER e  
23 FONG, 2018), sendo restrita à região Neotropical. Essa família é composta por  
24 peixes de pequeno a médio porte, que apresentam três pares de barbilhões e

1 nadadeiras adiposas bem desenvolvidas. Popularmente são conhecidos como  
2 bagres, bagrinhos, bagres-de-pedra, chicotes, jundiás, mandis, mandis-chorões,  
3 entre outros, não sendo espécies de grande interesse comercial (devido ao seu  
4 porte pequeno), mas apreciadas como peixes ornamentais, além de serem  
5 componentes importantes nos ecossistemas aquáticos (BOCKMANN e GUAZZELLI,  
6 2003; QUEIROZ et al., 2013).

7 Ainda de acordo com Bockmann e Guazzelli (2003), os peixes da família  
8 Heptapteridae costumam apresentar hábitos alimentares bem variados, onde  
9 existem casos de espécies onívoras e algumas carnívoras. Outras características da  
10 família, como o não cuidado parental, tendência a uma vida solitária ou em  
11 pequenos grupos, adaptação à vida bentônica e dimorfismo sexual não presente,  
12 podem ser citados. Dentro da família Heptapteridae o gênero mais abundante em  
13 número de espécies é *Pimelodella*, com 82 espécies, seguido pelos gêneros  
14 *Rhamdia* e *Imparfinis*, composto por 31 e 19 espécies descritas, respectivamente  
15 (ESCHMEYER e FONG, 2018).

16 Quanto à família Pimelodidae, este é um grupo extremamente diversificado,  
17 composto por 114 espécies válidas distribuídas em 63 gêneros (ESCHMEYER e  
18 FONG, 2018). Algumas espécies desta família podem ser de grande porte e, no  
19 corpo, pode-se observar uma coloração cinza, com listras, pintas ou manchas  
20 escuras e claras (QUEIROZ et al., 2013). Popularmente são conhecidos como  
21 bagres, mandis ou pintados, possuem também como características três pares de  
22 barbilhões, boca terminal com pequenos dentes e nadadeira dorsal e peitoral bem  
23 desenvolvidas, com o primeiro raio transformado em um espinho pungente (BRITSKI  
24 et al., 1988).

1 De acordo com Queiroz et al. (2013), os pimelodídeos possuem hábitos  
2 principalmente carnívoros, havendo ainda espécies frutíferas e onívoras. Possuem  
3 hábitos sedentários e normalmente habitam os fundos dos rios e riachos, onde há  
4 água corrente e vegetação (BRITSKI et al., 1988). Espécies desta família possuem  
5 importância na pesca comercial e podem atingir tamanhos muito grandes sendo  
6 chamados de “grandes bagres” (QUEIROZ et al., 2013).

7 A classificação sistemática dos peixes pertencentes a estas duas famílias  
8 vem passando por algumas modificações desde que Shibatta (2003a) considerou o  
9 antigo grupo “Pimelodidae” composto por três subfamílias monofiléticas:  
10 Pimelodinae, Heptapterinae e Pseudopimelodinae. Entretanto, Lundberg e Litmann  
11 (2003), Bockmann e Guazzelli (2003) considerando características morfológicas  
12 diferenciadas, propuseram outra classificação e as subfamílias foram elevadas por  
13 esses autores à categoria de famílias, sendo elas: Pimelodidae, Heptapteridae e  
14 Pseudopimelodidae.

15 Baseados em dados moleculares, Sullivan et al. (2006) colocaram estas  
16 famílias na superfamília Pimelodoidea, juntamente com *Conorhynchos*, retirado de  
17 Pimelodidae.

18 Poucas informações taxonômicas sobre a família Heptapteridae são  
19 encontradas na literatura. Bockmann e Miqueralena (2008), com base em dados  
20 morfológicos e análises de Lundberg e McDade (1986) e Lundberg (1991)  
21 diagnosticaram um clado não identificado da família Pimelodidae com base em três  
22 sinapomorfias (Clado A, Figura 1). Esta subfamília foi nomeada previamente  
23 Rhamdiinae mas, hoje é conhecida como família Heptapteridae, caracterizada por  
24 cinco sinapomorfias (LUNDBERG, 1991).

1 Considerando o cladograma simplificado da Figura 1, proposto por Bockmann  
2 e Miqueralena (2008), observa-se que *Pimelodella* acabou se encaixando em um  
3 clado junto com mais dois gêneros: *Brachyrhamdia* e *Goeldiella*, sendo este  
4 considerado o clado mais basal dentro da família Heptapteridae (LUNDBERG,  
5 1991).

6 Dentro da família Pimelodidae, as relações filogenéticas ainda não são  
7 completamente bem resolvidas. Lundberg e Littmann (2003) dividiram esta família  
8 no grupo “*Pimelodus*”, grupo “*Calophysus*” e um ramo basal formado por 3 gêneros:  
9 *Phractocephalus*, *Leiarius* e *Perrunichthys*, com base em dados morfológicos.

10 Mais recentemente, Lundberg et al. (2011) por meio de análises de genes  
11 nucleares e mitocondriais, dividiram os pimelodídeos em duas linhagens principais:  
12 os “Sorubimine” e o clado OCP. Os “Sorubimine” incluem os clados  
13 *Pseudoplatystoma* - *Sorubimichthys* e *Platysilurus* - *Platystomatichthys*, a tribo  
14 *Brachyplatystomatini* e os gêneros *Sorubim*, *Hypophthalmus*, *Zungaro* e  
15 *Hemisorubim* (Figura 2).

16 O clado OCP inclui *Pimelodus ornatus* Kner, 1858 e o clado *Calophysus* –  
17 *Pimelodus*, onde se encontram os “calophysines”, que abrangem espécies de cinco  
18 gêneros: *Calophysus*, *Aguarunichthys*, *Luciopimelodus*, *Pinirampus* e *Pimelodina* e  
19 os “pimelodines” que incluem o grupo *Exallodontus-Pimelodus altissimus* Eigenmann  
20 & Pearson, 1942 (onde está incluso o gênero *Propimelodus*) e o grupo *Pimelodus*  
21 (Figura 2).

22 Rocha (2012), por meio da análise de 145 caracteres morfológicos baseados  
23 na osteologia, morfologia externa e bexiga natatória, apresentou uma árvore  
24 filogenética da família Pimelodidae. Grande parte do agrupamento feito por este  
25 autor corresponde aquele proposto por Lundberg et al. (2011) porém, diferenças

1 existem em relação ao grupo “*Exallodontus*”. Com base nas sinapomorfias  
2 apontadas por Rocha (2012), o grupo “*Exallodontus*” foi considerado grupo irmão do  
3 grupo “*Calophysus*”, ambos compondo um grupo irmão de “*Pimelodus*”. Já Lundberg  
4 et al. (2011) traz somente o grupo “*Exallodontus*” como grupo irmão do grupo  
5 “*Pimelodus*”.

### 6 **2.3 Citogenética do gênero *Pimelodella***

7 O primeiro estudo citogenético no gênero *Pimelodella* foi realizado em 1976a,  
8 quando Toledo e Ferrari analisaram exemplares de *Pimelodella* sp, determinando  
9 número diploide e número fundamental (NF). Desde então, outras análises passaram a  
10 ser desenvolvidas, contribuindo com mais informações sobre estrutura e evolução  
11 cariotípica neste grupo de peixes (Tabela 1 do Capítulo 2, pág. 87).

12 Junto com os gêneros *Rhamdia* e *Imparfinis*, *Pimelodella* está entre os mais  
13 estudados dentro da família Heptapteridae, podendo ser observada uma variação do  
14 número diploide e também das fórmulas cariotípicas entre as espécies analisadas  
15 (GOUVEIA, 2016). O número diploide igual a 46 é bastante comum dentro deste  
16 gênero, porém algumas variações vêm sendo observadas em diferentes espécies  
17 como  $2n=50$  em *Pimelodella* cf. *chagresi*,  $2n=52$  em *Pimelodella* aff. *avanhandavae*  
18 e *P. taenioptera* Miranda Ribeiro, 1914 e, por fim,  $2n=58$  em *P. australis* Eigenmann,  
19 1917, *P. kronei* (Miranda Ribeiro, 1907), *P. lateristriga* (Lichtenstein, 1823) e *P.*  
20 *transitória* Miranda Ribeiro, 1907 (Tabela 1 do Capítulo 2, pág. 87).

21 As espécies pertencentes ao gênero *Pimelodella* têm como característica  
22 cromossomos de tamanho reduzido, em grande parte do tipo metacêntrico,  
23 submetacêntrico e subtelocêntrico, o que acaba resultando em número fundamental  
24 (NF) elevado, variando de 84 a 116 como pode ser observado na Tabela 1 do  
25 Capítulo 2, pág. 87.

1           Entre os heptapterídeos é comum a pouca quantidade de heterocromatina,  
2           geralmente distribuída nas regiões pericentroméricas e terminais (GOUVEIA, 2016).  
3           Esta característica pode ser observada na maioria das espécies do gênero  
4           *Pimelodella* como: *P. meeki* Eigenmann, 1910 (GARCIA e ALMEIDA-TOLEDO,  
5           2010; GOUVEIA et al., 2013), *P. lateristriga* (GARCIA e ALMEIDA-TOLEDO, 2010),  
6           *P. laurenti* Fowler, 1941 e *P. spealeae* (DAZZANI et al., 2012), *P. vittata* (Lütken,  
7           1874) (KANTEK et al., 2015), entre outros. Garcia e Almeida-Toledo (2010), assim  
8           como Fernandes et al. (2013) observaram blocos heterocromáticos intersticiais  
9           analisando populações de *Pimelodella gracilis* (Valenciennes, 1835), característica  
10          não muito relatada neste grupo.

11          No gênero *Pimelodella* existem dois padrões de regiões organizadoras de  
12          nucléolos (RONs): 1) simples terminal e 2) múltiplas. A maioria das espécies  
13          apresenta a RON em um único par de cromossomos, geralmente localizada em  
14          região terminal no braço curto (Tabela 1 do Capítulo 2, pág. 87). Existem apenas  
15          três espécies que apresentam localização das RONs no braço longo: *Pimelodella*  
16          *meeki*, *P. vittata* e *P. avanhandavae* Eigenmann, 1917 (BORBA et al., 2012;  
17          KANTEK et al., 2015; FERNANDES et al., 2013) e, um raro caso de Ag-RONs  
18          múltiplas neste gênero foi evidenciado por Fernandes et al. (2013) em uma  
19          população de *Pimelodella avanhandavae*.

20          Muitas vezes as regiões organizadoras de nucléolos ativas coincidem com  
21          blocos heterocromáticos (RONs heterocromáticas), como observado por Swarça et  
22          al. (2003) analisando *Pimelodella* aff. *avanhandavae*, por Garcia e Almeida-Toledo  
23          (2010) e Dazzani et al. (2012) estudando diferentes espécies de *Pimelodella*,  
24          Gouveia et al. (2013) com *P. meeki* e Conde-Saldaña et al. (2017) em *Pimelodella*  
25          cf. *chagresi*. Normalmente as Ag-RONs tendem a ser CMA<sub>3</sub> positivas, regiões ricas

1 em pares de bases GC (SWARÇA et al., 2003; GARCIA e ALMEIDA-TOLEDO,  
2 2010; DAZZANI et al., 2012; GOUVEIA et al., 2013; BARBOSA et al., 2015; entre  
3 outros).

4 O uso da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) vem sendo  
5 frequente nos estudos com o gênero *Pimelodella*, especialmente com as sondas de  
6 DNAs ribossomais 18S e 5S. Das 37 populações de *Pimelodella* estudadas,  
7 relacionadas na Tabela 1 do Capítulo 2, 24 apresentam resultados de hibridação  
8 utilizando a sonda de DNAr 18S e 14 a sonda de DNAr 5S, confirmando a  
9 conservação do padrão simples das Ag-RONs e a localização terminal destas  
10 regiões (Tabela 1 do Capítulo 2, pág. 87).

11 O número de sítios de DNAr 5S observados nos cromossomos de *Pimelodella*  
12 mostrou-se um pouco mais variável que a quantidade de sítios ribossomais 18S.  
13 Entre as diferentes espécies deste gênero, sítios ribossomais 5S estão localizados  
14 em um ou dois pares de cromossomos, tanto no braço curto quanto longo,  
15 principalmente em região terminal, sendo mais comum a observação dos dois sítios  
16 ribossomais em pares cromossômicos diferentes (Tabela 1 do Capítulo 2, pág. 87).  
17 Entretanto, alguns autores conseguiram confirmar a sintenia entre DNAr 18S e 5S  
18 no braço longo do cromossomo sexual Y de *Pimelodella*. cf. *chagresi* (CONDE-  
19 SALDAÑA et al., 2017) e no par 18 submetacêntrico de *P. gracilis* (GARCIA e  
20 ALMEIDA-TOLEDO, 2010).

21 Neste grupo de peixes também foi relatada a presença de cromossomos  
22 sexuais, do tipo XX/XY, como em *Pimelodella* sp analisada por Dias e Foresti  
23 (1993), *Pimelodella boschmai* Van der Stigchel, 1964 analisada por Garcia e  
24 Almeida-Toledo (2010) e, mais recentemente, *Pimelodella* cf. *chagresi* estudada por  
25 Conde-Saldaña et al. (2017).

1 Cromossomos supranumerários ou Bs, foram observados em apenas uma  
2 população de *Pimelodella* sp analisada por Garcia e Almeida-Toledo (2010), os  
3 quais mostraram-se CMA<sub>3</sub> positivos e portadores de sítios de DNAr 18S.

#### 4 **2.4 Citogenética da família Pimelodidae**

5 Os primeiros estudos citogenéticos realizados em espécies da família  
6 Pimelodidae, pertencentes à região Neotropical, ocorreram em 1976b com Toledo e  
7 Ferrari analisando espécies do gênero *Pimelodus*. A partir de então, outros gêneros  
8 e espécies de pimelodídeos passaram a ser estudados e, de acordo com revisão de  
9 Swarça et al. (2007), 27 espécies possuíam dados cariotípicos, sendo elas  
10 pertencentes aos gêneros *Bergiaria*, *Calophysus*, *Hemisorubim*, *Iheringichthys*,  
11 *Luciopimelodus*, *Megalonema*, *Parapimelodus*, *Pimelodus*, *Pinirampus*,  
12 *Pseudoplatystoma*, *Zungaro* e *Steindachneridion*.

13 Atualmente, 38 espécies da família Pimelodidae possuem análises  
14 citogenéticas relatadas, incluindo as espécies do presente estudo (Tabela 1 do  
15 Capítulo 1, pág. 56). No geral, as espécies desta família possuem 2n=56, com  
16 poucas exceções como *Calophysus macropterus* (RAMIREZ-GIL et al., 1998),  
17 *Pinirampus pirinampu* (Spix & Agassiz, 1829) (VASCONCELOS e MARTINS-  
18 SANTOS, 2000; SWARÇA et al., 1999, 2001a; SANCHEZ et al., 2010) e  
19 *Luciopimelodus pati* (Valenciennes, 1835) (SANCHEZ et al., 2010) que apresentam  
20 2n=50, *Pimelodus fur* (Lütken, 1874) (GARCIA e MOREIRA-FILHO, 2005, 2008) e  
21 *Megalonema platanum* (Günther, 1880) (CARVALHO et al., 2011) que apresentam  
22 2n=54 e, por fim, uma população de *Pimelodus blochii* (DELLA-ROSA et al., 1980)  
23 com 2n=58.

1 Assim como na família Heptapteridae, as espécies da família Pimelodidae  
2 também apresentam um grande número de cromossomos do tipo metacêntrico,  
3 submetacêntrico e subtelocêntrico, conseqüentemente apresentam um NF  
4 geralmente maior que 80 (Tabela 1 do Capítulo 1, pág. 56).

5 Em relação às regiões heterocromáticas, em Pimelodidae são bastante  
6 comuns relatos de pouca heterocromatina, localizada predominantemente nas  
7 regiões pericentroméricas e/ou terminais como em: *Pinirampus pirinampu* (SWARÇA  
8 et al., 2001a), espécies do gênero *Pimelodus* (BORIN e MARTINS-SANTOS, 2002;  
9 SOUZA et al., 2004a; TRECO et al., 2008), *Pseudoplatystoma reticulatum*  
10 Eigenmann & Eigenmann, 1889, *Sorubim lima* (Bloch & Schneider, 1801) e  
11 *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (MORAES-NETO et al., 2011),  
12 entre outros. Também há relatos de blocos de heterocromatina localizados em  
13 regiões intersticiais como observado em *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821)  
14 (SWARÇA et al., 2001b), *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803 e *Pimelodus*  
15 *absconditus* Azpelicueta, 1995 (BORIN e MARTINS-SANTOS, 2002) e  
16 *Brachyplatystoma filamentosum* (GONÇALVES et al., 2014).

17 As regiões organizadoras de nucléolo geralmente são encontradas em  
18 apenas um par cromossômico (Ag-RONs simples), predominantemente nas regiões  
19 terminais, como observado em *Bergiaria westermanni* (Lütken, 1874),  
20 *Parapimelodus nigribarbis* (Boulenger, 1889), *Pimelodus maculatus*,  
21 *Brachyplatystoma filamentosum*, *Phratocephalus hemioliopterus*, entre outros  
22 (Tabela 1 do Capítulo 1, pág. 56).

23 Em alguns casos, as Ag-RONs podem apresentar polimorfismo envolvendo o  
24 comprimento dessas regiões, como observado por Matoso et al. (2011) analisando  
25 espécimes de *Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005. Moraes-Neto et

1 al. (2011) evidenciaram um caso de Ag-RONs múltiplas na espécie *Pimelodus*  
2 *britskii* Garavello & Shibatta, 2007, padrão diferente do comumente encontrado na  
3 família Pimelodidae.

4 De acordo com Swarça et al. (2006) *Steindachneridion melanodermatum*  
5 apresenta um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, onde X é um  
6 cromossomo do tipo submetacêntrico pequeno e o Y um metacêntrico grande, sendo  
7 este o primeiro relato de sistema cromossômico sexual na família Pimelodidae.  
8 Posteriormente, Matoso et al. (2011) encontraram dois polimorfismos  
9 cromossômicos ao analisar esta mesma espécie, um relacionado às regiões  
10 organizadoras nucleolares, e o outro envolvendo dois cromossomos  
11 submetacêntricos previamente identificados como cromossomos sexuais. Segundo  
12 esses autores o polimorfismo foi confirmado pela homogeneidade dos cariótipos de  
13 fêmea e macho.

14 Tem sido relatada a presença de cromossomos supranumerários ou Bs, em  
15 algumas espécies da família Pimelodidae como: *Bergiaria westermanni* (DIAS e  
16 FORESTI, 1993), *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (VISSOTO et al., 1999b;  
17 CARVALHO et al., 2004), *Pimelodus* sp e *Pimelodus ortmanni* Haseman, 1911  
18 (BORIN e MARTINS-SANTOS, 2004) e *Megalonema platanum* (CARVALHO et al.,  
19 2011).

20 A utilização de fluorocromos bases-específicos também vem sendo frequente  
21 em espécies da família Pimelodidae. O tratamento com CMA<sub>3</sub> e DAPI associados  
22 aos bandamentos cromossômicos acabam identificando sítios ricos em pares de  
23 bases GC ou AT, respectivamente. Muitos trabalhos relatam correspondência dos  
24 sítios CMA<sub>3</sub> com sítios da Ag-RON, comprovando se tratar de uma região rica em  
25 pares de bases GC (TRECO et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; CARVALHO et

1 al., 2011; SWARÇA et al., 2013, entre outros). Blocos de heterocromatina também  
2 podem ser CMA<sub>3</sub>, como observado por Souza et al. (2003) e Martinez et al. (2004)  
3 analisando espécies do gênero *Pimelodus*.

4 Treco et al. (2008) encontraram em *Pimelodus paranaenses* Britski &  
5 Langeani, 1988 e *Pimelodus heraldoi* Steindachner, 1877 além de sítios CMA<sub>3</sub>, sítios  
6 DAPI positivos, relacionados às regiões heterocromáticas, mostrando que estas  
7 regiões também eram ricas em pares de bases AT.

8 A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) vem sendo amplamente  
9 utilizada nos estudos citogenéticos desta família, principalmente a partir do uso de  
10 sondas de DNAs ribossomais. Das 38 espécies analisadas de Pimelodidae, 28  
11 espécies possuem análises de DNAr 18S e 25 de DNAr 5S (Tabela 1 do Capítulo 1,  
12 pág. 56).

13 Os sítios de DNAr 18S confirmam o padrão simples das Ag-RONs e são  
14 encontrados nas regiões terminais de braços curtos ou longos (Tabela 1 do Capítulo  
15 1, pág. 56). Já os sítios de DNAr 5S apresentam-se um pouco mais variáveis tanto  
16 em relação ao número quanto à posição e tipo cromossômico, entretanto, é mais  
17 comum a ocorrência em apenas um par de cromossomos (Tabela 1 do Capítulo 1,  
18 pág. 56). Poucas são as espécies que apresentaram mais de dois sítios desse gene  
19 ribossomal, todas pertencentes ao gênero *Pimelodus*: *Pimelodus* sp, *P. fur*, *P.*  
20 *maculatus*, *P. britskii*, *P. misteriosus* e *P. paranaensis* (GARCIA e MOREIRA FILHO,  
21 2005, 2008; MORAES-NETO et al., 2011; GIRARDI et al., 2018).

22 Moraes-Neto et al. (2011) e Girardi et al. (2018) analisando as espécies  
23 *Pimelodus britskii* e *Pimelodus maculatus* relataram os únicos casos de sintonia  
24 entre os genes ribossomais 18S e 5S, até o momento, na família Pimelodidae.

1           O presente estudo apresenta novas e inéditas informações cariotípicas em  
2 espécies de heptapterídeos e pimelodídeos da bacia Amazônica, utilizando  
3 citogenética convencional e molecular, além de uma análise filogenética prévia do  
4 gênero *Pimelodella* e uma associação de dados filogenéticos moleculares à dados  
5 citogenéticos, visando uma maior compreensão sobre a estrutura cariotípica e as  
6 relações entre as espécies deste grupo de peixes, bem como os prováveis  
7 caracteres citogenéticos ancestrais e as condições derivadas que surgiram ao longo  
8 da evolução cariotípica.

### 1 **3. Objetivos**

#### 2 **3.1 Objetivos Gerais**

3           Analisar por meio de marcadores cromossômicos espécies de peixes das  
4 famílias Heptapteridae e Pimelodidae coletadas no rio Solimões, e relacionar os  
5 dados obtidos à filogenia molecular, visando um maior entendimento da estrutura e  
6 evolução de seus cariótipos a partir de uma análise integrada.

#### 7 **3.2 Objetivos Específicos**

- 8 - Estabelecer o número diplóide e a macroestrutura cariotípica das diferentes
- 9 espécies das famílias Heptapteridae e Pimelodidae;
  
- 10 - Determinar a localização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) e o
- 11 padrão de distribuição de heterocromatina;
  
- 12 - Identificar as regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC e AT;
  
- 13 - Localizar e determinar o número de sítios de DNAr 18S e 5S;
  
- 14 - Analisar se as características citogenéticas comumente encontrado nas famílias
- 15 Heptapteridae e Pimelodidae se mantêm nas espécies do presente estudo;
  
- 16 - Relacionar os caracteres citogenéticos com os dados filogenéticos moleculares
- 17 encontrados na literatura, para fazer uma análise integrada e estimar prováveis
- 18 caracteres citogenéticos ancestrais, avaliando suas tendências evolutivas e
- 19 interpretando os processos de mudanças.

## 1 **4. Espécies estudadas e Locais de coletas**

### 2 **4.1 Espécies estudadas**

3 No presente estudo foram analisadas uma espécie de Heptapteridae,  
4 *Pimelodella cristata* (Müller & Troschel, 1849) (5 espécimes de sexo não identificado)  
5 e três espécies de Pimelodidae: *Calophysus macropterus* (Lichtenstein, 1819) (7  
6 fêmeas + 4 espécimes de sexo não identificado), *Propimelodus eigenmanni* (Van der  
7 Stigchel, 1946) (5 fêmeas + 2 machos) e *Exallodontus aguanae* (Lundberg, Mago-  
8 Leccia & Nass, 1991 (1 fêmea), apresentas na Figura 3.

### 9 **4.2 Locais de coletas**

10 As espécies de Heptapteridae e Pimelodidae foram coletadas em dois  
11 pontos no rio Solimões, pertencente à bacia Amazônica. Os espécimes de  
12 *Pimelodella cristata* foram coletados no município de Iranduba/AM - S 3 17' 30.40" O  
13 60 11' 22.69". Os pimelodídeos foram coletados na área de confluência entre os rios  
14 Negro e Solimões, em Manaus/AM - S 3 08' 16.32" O 59 54' 13.45" (Figura 4).

## 5. Referências bibliográficas

- Administração das hidrovias da Amazônia Ocidental (AHIMOC). Rios da Amazônia ocidental. Rio Solimões. [2002]. Disponível em: <<http://www.ahimoc.gov.br/rios/index/ver/id/4>>. Acesso em: 01 jun 2017.
- Agência Nacional de Águas (Brasil). Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: regiões hidrográficas brasileiras – Edição Especial. -- Brasília: ANA, 2015. Disponível em: <<http://www.snirh.gov.br/portal/snirh/centrais-de-conteudos/conjuntura-dos-recursos-hidricos/regioeshidrograficas2014.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2018.
- Barbosa, L. M., Ferreira, G. E. B., Prizon, A. C., Portela-Castro, A. L. B., & Martins-Santos, I. C. (2015). Cytogenetic characterization of species of the family Heptapteridae (Teleostei: Siluriformes) from the Cuiabá and Ivaí River Basins, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 8640-8649.
- Baumgartner, G., Pavanelli, C. S., Baumgartner, D., Bifi, A. G., Debona, T., & Frana, V. A. (2012). *Peixes do baixo rio Iguaçu*. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM.
- Bittencourt, M. M., & Amadio, S. A. (2007). Proposta para identificação rápida dos períodos hidrológicos em áreas de várzea do rio Solimões-Amazonas nas proximidades de Manaus. *Acta Amazonica*, 37(2), 303-308.
- Bockmann, F. A., Guazzelli, G. M. Family Heptapteridae. In: REIS, R. E., KULLANDER, S. O., FERRARIS, C. J. JR. Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipurcs, Porto Alegre, p. 406-431, 2003.
- Bockmann, F. A., & Miquelarena, A. M. (2008). Anatomy and phylogenetic relationships of a new catfish species from northeastern Argentina with comments on the phylogenetic relationships of the genus *Rhamdella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes, Heptapteridae). *Zootaxa*, 1780, 1-54.
- Borba, R. S., Da Silva, E. L., Pacheco, A. C. S., Parise-Maltempi, P. P., & Alves, A. L. (2012). Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22(2), 509-518.
- Borin, L. A., & Martins-Santos, I. C. (2002). Cytogenetic aspects in species of the genus *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the river Paraná Basin. *Cytologia*, 67(2), 199-204.
- Borin, L. A., & Martins-Santos, I. C. (2004). Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the river Iguaçu. *Hereditas*, 140(3), 201-209.
- Britski, H. A.; Sato, Y.; Rosa, A. B. S. 1988. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3 Ed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação. CODEV ASF 115p.

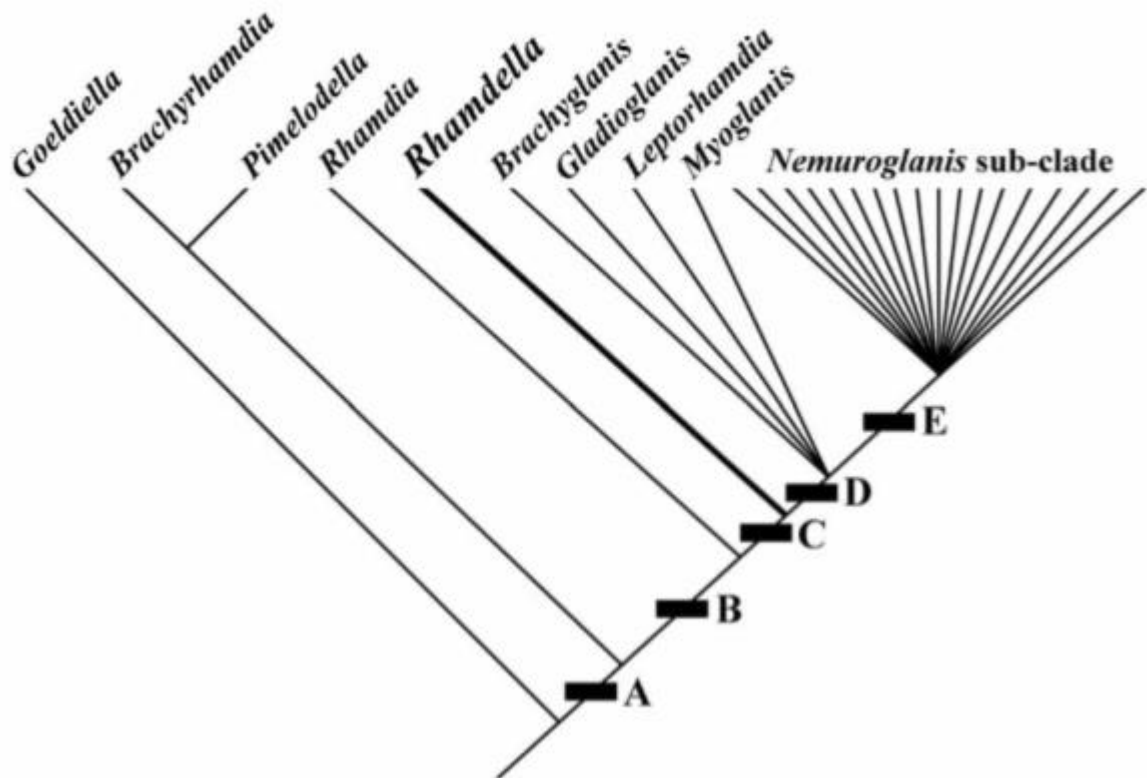
- 1 Carvalho, R. A., Giuliano-Caetano, L., & Dias, A. L. (2004). Cytogenetic analysis of  
2 A-and B-chromosomes of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the  
3 Tibagi River, Paraná, Brazil. *Cytologia*, 69(4), 381-385.
- 4 Carvalho, R. A., Laudicina, A., Giuliano-Caetano, L., Martins-Santos, I. C., & Dias, A.  
5 L. (2010). Cytogenetic analysis of the 18S, 5S rDNA and B chromosome of  
6 *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes, Pimelodidae). *Brazilian Journal*  
7 *of Biology*, 70(3), 631-636.
- 8 Carvalho, R. A. D., Sanchez, S., Swarça, A. C., Fenocchio, A. S., Martins-Santos, I.  
9 C., & Dias, A. L. (2011). Chromosomal analyses in *Megalonema platanum*  
10 (Siluriformes: Pimelodidae), an endangered species from South American rivers.  
11 *Neotropical Ichthyology*, 9(1), 177-182.
- 12 Conde-Saldaña, C. C., Barreto, C. A. V., Villa-Navarro, F. A., & Dergam, J. A. (2017).  
13 An Unusual Accumulation of Ribosomal Multigene Families and Microsatellite DNAs  
14 in the XX/XY Sex Chromosome System in the Trans-Andean Catfish *Pimelodella* cf.  
15 *chagresi* (Siluriformes: Heptapteridae). *Zebrafish*, 15(1), 55-62.
- 16 Dazzani, B., Garcia, C., Peixoto, M., Trajano, E., & Almeida-Toledo, L. F. D. (2012).  
17 Cytogenetic and molecular analyses in troglobitic and epigeic species of *Pimelodella*  
18 (Siluriformes: Heptapteridae) from Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 10(3), 623-632.
- 19 Della-Rosa VA, Bertollo LAC, Ferrari I, Takahashi CS, Moreira-Filho O, Foresti F  
20 (1980) Estudos citogenéticos de peixes da Amazônia. II. Ordem siluriformes. Ci and  
21 Cult 32:735.
- 22 Dias, A. L., & Foresti, F. (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family  
23 Pimelodidae (Siluroidei). *Revista Brasileira de Genética*, 585-600.
- 24 Eschmeyer, W. N. & Fong J. D., ESPÉCIES JD POR FAMÍLIA / SUBFAMÍLIA.  
25 ([Http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp)).  
26 Versão eletrônica acessada 01 jun 2018.
- 27 Fenocchio, A. S., & Bertollo, L. A. (1992). Karyotype similarities among Pimelodidae  
28 (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian amazon region. *Cytobios*, 69(276), 41-46.
- 29 Fernandes, C. A., Damásio, J. F., da Rosa Guterres, Z., & Abelha, M. C. F. (2013).  
30 Cytogenetic Studies in Two Species of Genus *Pimelodella* (Teleostei, Siluriformes,  
31 Heptapteridae) from Iguatemi River Basin, Brazil. *Cytologia*, 78(1), 91-95.
- 32 Garcia, C., & Moreira Filho, O. (2005). Cytogenetical analyses in three fish species of  
33 the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco:  
34 considerations about the karyotypical evolution in the genus. *Neotropical Ichthyology*,  
35 3(2), 285-290.
- 36 Garcia, C., & Moreira Filho, O. (2008). Localization of ribosomal genes in three  
37 *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes  
38 as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. *Genetics and Molecular*  
39 *Biology*, 31(1), 261-264.

- 1 Garcia C, & Almeida-Toledo LF. (2010). Comparative chromosomal analyses in  
2 species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of  
3 structural and numerical polymorphisms. *Caryologia*: 63: 32-40.
- 4 Gonçalves, Á. L. M., Prado, F. D. D., Ferreira, D. C., Voltolin, T. A., Senhorini, J. A.,  
5 Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2014). First cytogenetic characterization of the giant  
6 Amazonian catfish *Brachyplatystoma filamentosum* (Siluriformes, Pimelodidae).  
7 *Caryologia*, 67(2), 101-105.
- 8 Girardi, S. C., Pavanelli, C. S., Margarido, V. P. (2018). Contributions to the  
9 systematic of Pimelodidae (Osteichthyes, Siluriformes): basic and molecular  
10 cytogenetics on seven species of *Pimelodus* from three Brazilian hydrographic  
11 systems. *Neotropical Ichthyology*, 16(2): e170148.
- 12 Gouveia, J. G., de Moraes, V. P. O., Sampaio, T. R., da Rosa, R., & Dias, A. L.  
13 (2013). Considerations on karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann  
14 and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes:  
15 Heptapteridae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23(2), 215-227.
- 16 Gouveia, Juceli Gonzales. Citogenética de peixes das famílias Heptapteridae e  
17 Pseudopimelodidae (Siluriformes): Contribuições para estudos com DNAs  
18 repetitivos. 2016. 85. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina,  
19 Londrina/PR. 2016.
- 20 Hoorn, C., Wesselingh, F. P., Ter Steege, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J.,  
21 & Jaramillo, C. (2010). Amazonia through time: Andean uplift, climate change,  
22 landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330(6006), 927-931.
- 23 Kantek, D. L. Z., Peres, W. A. M., & Moreira-Filho, O. (2015). Cytogenetic study of  
24 heptapterids (Teleostei, Siluriformes) with particular respect to the Nemuroglanis  
25 subclade. *Comparative cytogenetics*, 9(1), 17.
- 26 Lundberg, J. G. and L. A. Mc Dade. 1986. On the South American catfish  
27 *Brachyrhamdia imitador* Myers (Siluriformes, Pimelodidae), with phylogenetic  
28 evidence for a larger intrafamilial lineage. *Not. Nat. (Philadelphia)*, (463): 1-24.  
29
- 30 Lundberg, J. G. (1991). *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of  
31 Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) from deep river channels of South America and  
32 delimitation of the subfamily Pimelodinae. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 104, 840-869.
- 33 Lundberg, J. G., & Littmann, M. W. (2003). Family Pimelodidae (Long-whiskered  
34 catfishes). 432-446. *CLOFFSCA-Check list of the freshwater fishes of South and  
35 Central America*. Edipucrs, Porto Alegre.
- 36 Lundberg, J. G., Sullivan, J. P., & Hardman, M. (2011). Phylogenetics of the South  
37 American catfish family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) using nuclear and  
38 mitochondrial gene sequences. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of  
39 Philadelphia*, 161(1), 153-189.

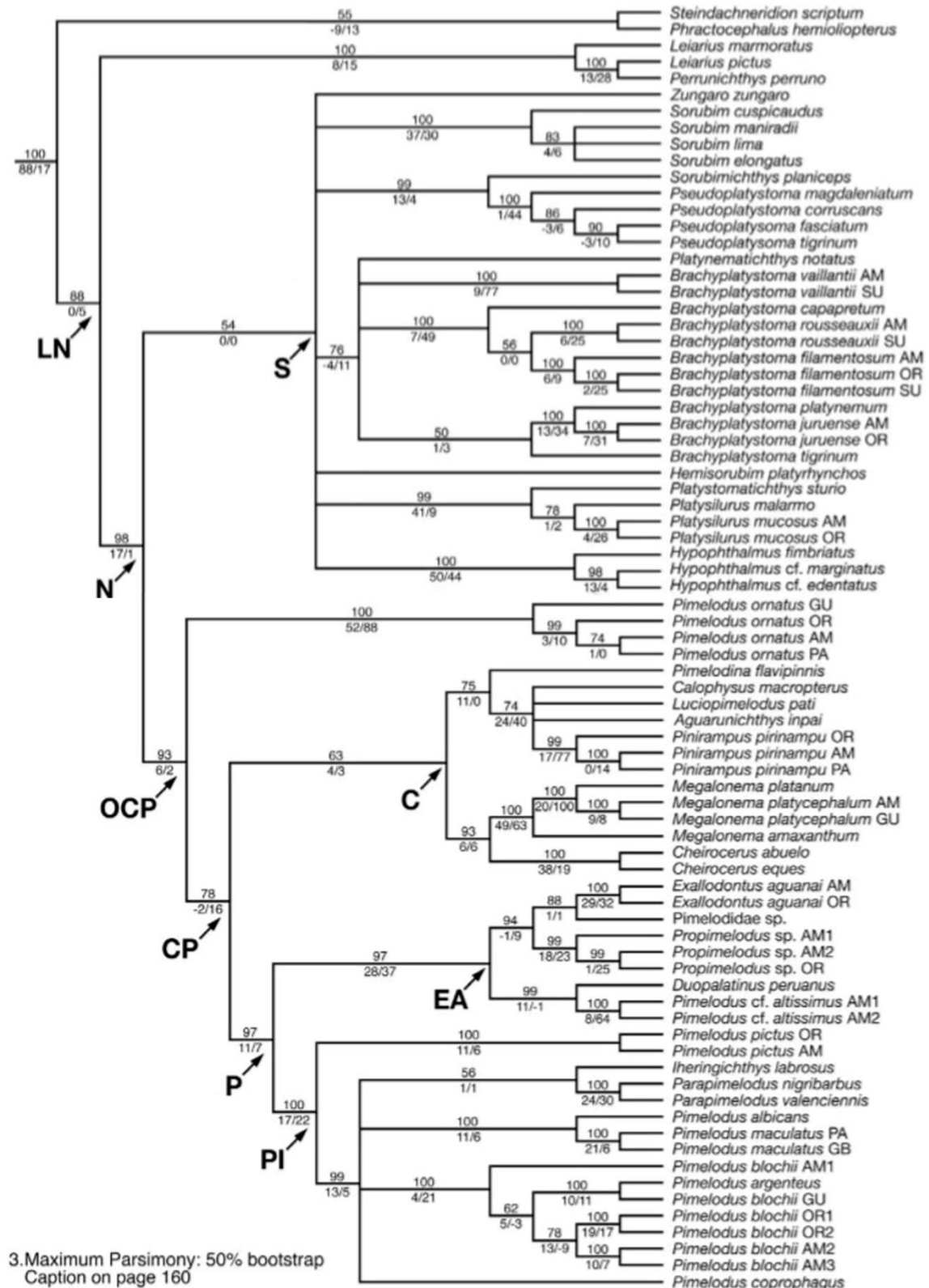
- 1 Martinez, E. R. M., Oliveira, C., & Foresti, F. (2004). Cytogenetic Analyses of  
2 *Pseudopimelodus mangurus* (Teleostei: Siluriformes: Pseudopimelodidae).  
3 *Cytologia*, 69(4), 419-424.
- 4 Matoso, D. A., de Almeida Val, V. M. F., da Silva, M., Moraes-Neto, A., Almeida, M.  
5 C., Vicari, M. R., & Artoni, R. F. (2011). Chromosomal polymorphism in  
6 *Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodidae): a  
7 reappraisal the existence of sex chromosome system in the species. *Reviews in Fish*  
8 *Biology and Fisheries*, 21(3), 497-508.
- 9 Moraes-Neto, A., Silva, M. D., Matoso, D. A., Vicari, M. R., Almeida, M. C. D.,  
10 Collares-Pereira, M. J., & Artoni, R. F. (2011). Karyotype variability in neotropical  
11 catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes). *Neotropical*  
12 *Ichthyology*, 9(1), 97-105.
- 13 Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the World*. 3. ed. New York: John Wiley & Sons. 601 p.  
14 Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-  
15 sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938.
- 16 Queiroz, L. J., Torrente-Vilara, G., Ohara, W. M., Pires, T. H. S., Zuanon, J., & Doria.  
17 Peixes do Rio Madeira. Vol. 3. São Paulo: Santo Antônio Energia, 2013.
- 18 Ramirez-Gil, H., Feldberg, E., Almeida-Val, V. M. F., & Val, A. L. (1998).  
19 Karyological, biochemical, and physiological aspects of *Calophysus macropterus*  
20 (Siluriformes, Pimelodidae) from the Solimões and Negro rivers (Central Amazon).  
21 *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(11), 1449-1458.
- 22 Rocha MS (2012) Sistemática da família Pimelodidae Swainson, 1838 (Teleostei:  
23 Siluriformes). Tese (Doutorado), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia,  
24 Manaus, pp 306
- 25 Sanchez, S., Swarca, A. C., & Fenocchio, A. S. (2010). Cytogenetic Studies and  
26 Evolutive Considerations in Species of the *Calophysus* Group (Siluriformes,  
27 Pimelodinae). *Cytologia*, 75(3), 223-227.
- 28 Santos, G. M. D., & Santos, A. C. M. D. (2005). Sustentabilidade da pesca na  
29 Amazônia. *Estudos avançados*, 19(54), 165-182.
- 30 Shibatta, O. A. Phylogeny and Classification of 'Pimelodidae'. In: ARRATI, G.,  
31 KAPOOR, B. G., CHARDON, M., DIOGO, R. *Catfishes*. Science Publishes,  
32 Enfield/USA, p. 386-399, 2003a.
- 33 Souza, L., Giuliano-Caetano, L., & Dias, A. L. (2003). Karyotypic study of three  
34 species of *Pimelodus* (Pisces, Pimelodidae) from the Paraguai River basin.  
35 *Cytologia*, 68(4), 345-350.
- 36 Souza, L., Swarca, A. C., & Dias, A. L. (2004a). Analysis of the nucleolus organizer  
37 regions in 5 species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae), using  
38 AgNO<sub>3</sub>, CMA3 and FISH with the 18S rDNA probe. *Caryologia*, 57(2), 144-150.

- 1 Sullivan, J. P., Lundberg, J. G., & Hardman, M. (2006). A phylogenetic analysis of the  
2 major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene  
3 sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 41(3), 636-662.
- 4 Swarça, A. C., Caetano, L. G., & Dias, A. L. (1999). Cytogenetic characterization  
5 through chromosomic banding of *Pinirampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) from  
6 the Tibagi river basin PR/Brazil. *Caryologia*, 52(1-2), 31-35.
- 7 Swarça, A. C., Giuliano-Caetano, L., Vanzela, A. L. L., & Dias, A. L. (2001a).  
8 Heteromorphism of rDNA size in *Pinirampus pirinampu* (Pisces: Pimelodidae)  
9 detected by in situ hybridization. *Cytologia*, 66(3), 275-278.
- 10 Swarça, A. C., Vidotto, A. P., & Dias, A. L. (2003). Cytogenetic characterization of  
11 *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná  
12 State, Brazil). *Caryologia*, 56(4), 421-425.
- 13 Swarça, A. C., Fenocchio, A. S., Cestari, M. M., Bertolo L. A. C. & Dias, A. L. (2006).  
14 Heteromorphic sex chromosome system with an exceptionally large Y chromosome  
15 in a catfish *Steindachteridion* sp (Pimelodidae). *Cytogenetic Genome Research*, 112:  
16 325-328.
- 17 Swarça, A. C., Fenocchio, A. S., & Dias, A. L. (2007). An update cytogenetic review  
18 for species of the families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae  
19 (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a cytotaxonomical classification. *Caryologia*,  
20 60(4), 338-348.
- 21 Swarça, A. C., Sanchez, S., Dias, A. L., & Fenocchio, A. S. (2013). Cytogenetics of  
22 the Porthole Shovelnose Catfish, *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840)  
23 (Siluriformes, Pimelodidae), a widespread species in South American rivers.  
24 *Comparative cytogenetics*, 7(2), 103-110.
- 25 Swarça, A. C., Dias, A. L., & Fenocchio, A. S. (2017). Cytogenetic studies in the  
26 redbellied catfish, *Phractocephalus hemiliopterus* (Bloch & Schneider, 1801)  
27 (Siluriformes, Pimelodidae) a giant fish from Amazon basin. *Comparative*  
28 *Cytogenetics*, 11, 119-128.
- 29 Toledo V. and Ferrari I., 1976a. Estudo citogenético de *Pimelodella* sp. e *Rhamdia*  
30 *hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): Cromossomo marcador. *Científica*, 4: 120-  
31 123.
- 32 Toledo V. and Ferrari I., 1976b. Estudo citogenético de três espécies do gênero  
33 *Pimelodus* (Pimelodidae, Pisces). *Científica*, 4 (2): 101-106.
- 34 Treco, F. R., Malabarba, L. R., Giuliano-Caetano, L., & Dias, A. L. (2008).  
35 Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in  
36 lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6(1), 87-92.
- 37 Vasconcelos, C. D., & Martins-Santos, I. C. (2000). Chromosome polymorphism in  
38 species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas*, 132(2), 103-109.

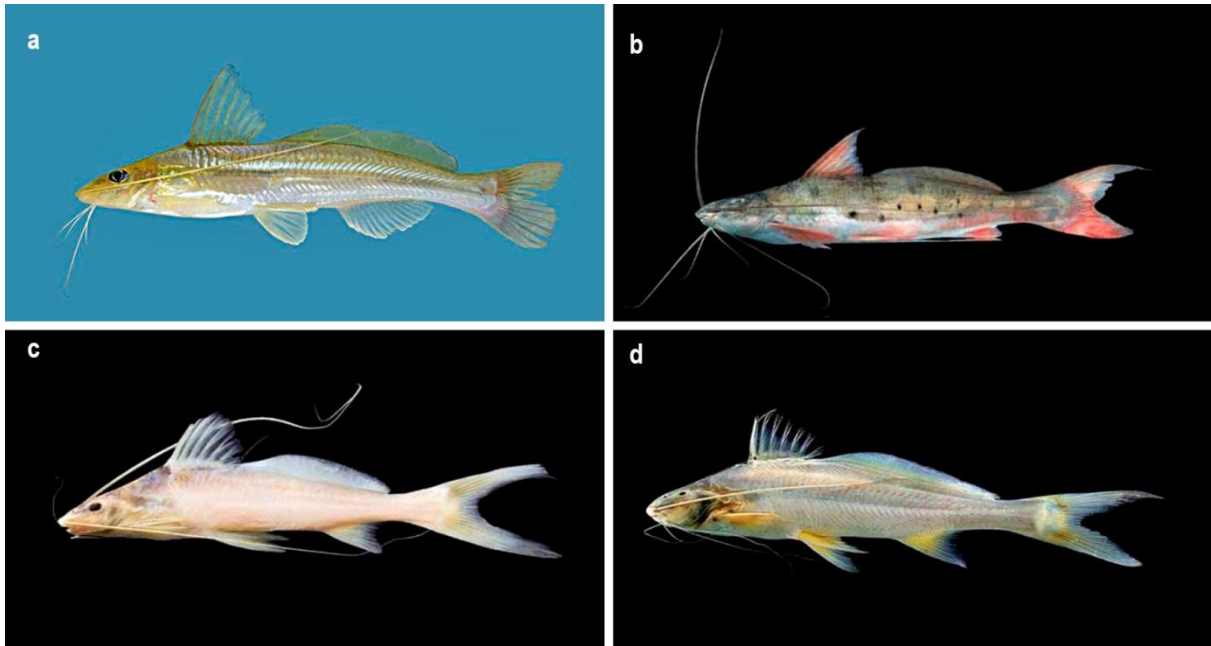
- 1 Vissotto, P. C., Foresti, F., & Oliveira, C. (1999b). Supernumerary chromosomes in
- 2 two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome*
- 3 *science*, 3(1), 9-13.



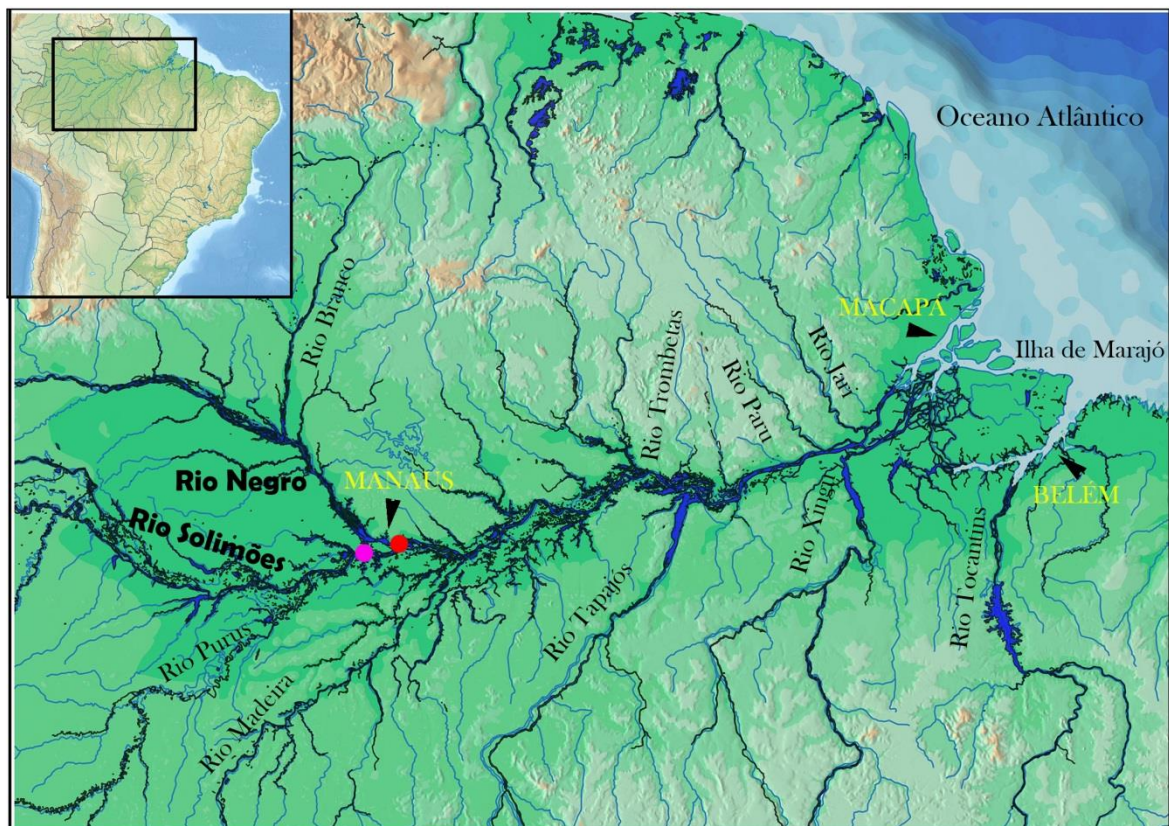
**Figura 1** – Cladograma simplificado da família Heptapteridae, proposto por Bockmann e Miqueralena (2008). Cada letra (A, B, C, D, E) representa um grupo, com base em sinapomorfias compartilhadas entre as espécies.



**Figura 2** – Cladograma mostrando as relações filogenéticas na família Pimelodidae, com base em marcadores moleculares, nucleares e mitocondriais combinados (LUNDBERG et al., 2011). \*LN = clado *Leiarius-neopimelodines*, N = *neopimelodines*, S = *sorubimines*, OCP = clado *Pimelodus ornatus-Calophysus-Pimelodus*, CP = clado *Calophysus-Pimelodus*, C = *calophysines*, P = *pimelodines*, EA = grupo *Exallodontus-Pimelodus altissimus*, PI = grupo *Pimelodus*.



**Figura 3** – Fotos representativas dos exemplares: a) *Pimelodella cristata*, b) *Calophysus macropterus*, c) *Propimelodus eigenmanni* e d) *Exallodontus aguanae* (Foto: FishBase a, Foto: Livro - Peixes do rio Madeira, v. 3, b, c, d).



**Figura 4** - Mapa apresentando os pontos de coleta, rio Solimões – municípios: Iranduba (círculo rosa) e Manaus (círculo vermelho). Foto: MSc. Fábio Hiroshi Takagui.

## **Capítulo 1**

### **Marcadores citogenéticos na caracterização de três espécies de Pimelodidae do rio Solimões, bacia Amazônica: uma abordagem cariotípica integrada à análise filogenética na família**

\* Este artigo será submetido à publicação na revista *Reviews in Fish Biology and Fisheries*

---

1 **Marcadores citogenéticos na caracterização de três espécies de Pimelodidae**  
2 **do rio Solimões, bacia Amazônica: uma abordagem cariotípica integrada à**  
3 **análise filogenética na família**

4 **Mariana Costa Terra, Fábio Hiroshi Takagui, Joana Neres da Cruz Baldissera,**  
5 **Eliana Feldberg, Ana Lúcia Dias**

6 **Resumo**

7 Dentre as famílias pertencentes à ordem Siluriformes, Pimelodidae está entre as  
8 mais diversificadas, sendo amplamente distribuída na região neotropical, porém, das  
9 114 espécies válidas existentes apenas cinco possuem análises citogenéticas,  
10 sendo notável a escassez destes dados na região Amazônica. Neste estudo foram  
11 analisadas três espécies de Pimelodidae, *Calophysus macropterus*, *Propimelodus*  
12 *eigenmanni* e *Exallodontus aguanae*, coletadas no rio Solimões, bacia Amazônica.  
13 *Calophysus macropterus* apresentou  $2n=50$ , com fórmula cariotípica  
14  $20m+20sm+10a$  e  $NF=90$ , e as outras duas espécies mostraram  $2n=56$ , mas  
15 diferiram quanto à fórmula cariotípica, sendo que *Propimelodus eigenmanni* foi  
16 caracterizada por  $28m+20sm+2st+6a$  e  $NF=106$  e *E. aguanae* por  
17  $36m+12sm+2st+6a$  e  $NF=106$ . A região organizadora de nucléolo (RON) se mostrou  
18 localizada em um par cromossômico nas três espécies, com variações na  
19 localização e no tipo cromossômico portador deste marcador. A heterocromatina  
20 mostrou-se distribuída em algumas regiões terminais e pericentroméricas, além de  
21 serem observados blocos heterocromáticos fortemente corados correspondentes às  
22 constrições secundárias. A hibridização fluorescente *in situ* com a sonda de DNAr  
23 18S confirmou as RONS ativas e as sequências de DNAr 5S foram encontradas em  
24 apenas um par cromossômico, com exceção de *C. macropterus* que apresentou  
25 quatro sítios deste gene. Foi possível observar sintenia entre estes genes  
26 ribossomais em *C. macropterus* e *E. aguanae*. Os dados aqui apresentados são os  
27 primeiros para as espécies *P. eigenmanni* e *E. aguanae*, e complementares para *C.*  
28 *macropterus*, caracterizado anteriormente. As espécies analisadas apresentaram  
29 algumas características citogenéticas particulares, geralmente não encontradas na  
30 literatura. Neste estudo foi realizada associação de dados filogenéticos moleculares  
31 com dados cariotípicos, sendo inferidos caracteres ancestrais dentro da família  
32 Pimelodidae, assim como condições derivadas e seus processos de mudança ao  
33 longo da evolução cariotípica.

34 **Palavras-chave:** bandamento cromossômico, DNAs ribossomais, evolução  
35 cariotípica, relações filogenéticas

## 1 **Introdução**

2 A grande biodiversidade encontrada nos rios da bacia Amazônica não está  
3 relacionada apenas à sua grande área territorial, também está intimamente  
4 associada aos grandes eventos históricos que ocorreram há milhões de anos,  
5 envolvendo o soerguimento da Cordilheira dos Andes (Hoorn et al. 2010). Segundo  
6 Queiroz et al. (2013), estima-se que vivam 3 mil espécies de peixes nos rios da  
7 bacia Amazônica, sendo notável a escassez de dados citogenéticos na família  
8 Pimelodidae nesta região pois, até o momento, apenas cinco espécies deste grupo  
9 de peixes foram analisadas citogeneticamente: *Pimelodus blochii* (Della-Rosa et al.  
10 1980), *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) e *P. tigrinum* (Valenciennes,  
11 1840) (Fenocchio e Bertollo 1992), *Calophysus macropterus* (Ramirez-Gil et al.  
12 1998) e *Phractocephalus hemiliopterus* (Bloch & Schneider, 1801) (Swarça et al.  
13 2017).

14 Os Siluriformes representam uma das maiores ordens da região Neotropical,  
15 composta por 3.891 espécies válidas distribuídas em 39 famílias (Eschmeyer e Fong  
16 2018). Dentre elas, a família Pimelodidae é um grupo monofilético composto por 114  
17 espécies válidas (Eschmeyer e Fong 2018), entretanto, menos da metade dessas  
18 espécies foram estudadas citogeneticamente (Tabela 1).

19 O número diploide de  $2n=56$  vem sendo uma característica comum na família  
20 Pimelodidae porém, algumas exceções foram observadas em *Calophysus*  
21 *macropterus* (Lichtenstein, 1819), *Pinirampus pirinampu* (Spix & Agassiz, 1829) e  
22 *Luciopimelodus pati* (Valenciennes, 1835) que apresentaram  $2n=50$ , *Pimelodus fur*  
23 (Lütken, 1874) e *Megalonema platanum* (Günther, 1880) com  $2n=54$  e, por fim, uma  
24 população de *Pimelodus blochii* Valenciennes, 1840 com  $2n=58$  (Tabela 1).

25 Apesar do número diploide conservado, é possível observar uma

1 variabilidade na fórmula cariotípica neste grupo de peixes (Tabela 1) que pode ser  
2 resultado de rearranjos cromossômicos estruturais que foram ocorrendo ao longo  
3 dos anos, tais como inversões pericêntricas ou translocações. Desta forma, novas  
4 morfologias do cariótipo surgem sem que o número diploide seja alterado (Garcia e  
5 Moreira-Filho 2005; Ribeiro et al. 2008; Carvalho et al. 2010; Sanchez et al. 2014).

6 Marcadores cromossômicos como DNAs ribossomais vem sendo utilizados  
7 nos estudos de caracterização de pimelodídeos. Nesta família, o DNAr 18S  
8 geralmente coincide com as Ag-RONs, e os sítios do gene 5S aparecem dispersos  
9 (Tabela 1). A sintenia destes dois genes ribossomais ocorre, mas não é comum,  
10 sendo observada apenas em *Pimelodus britskii* Garavello & Shibatta (Moraes-Neto  
11 et al. 2011) e em *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803 (Girardi et al. 2018).

12 As relações filogenéticas dentro da família Pimelodidae ainda não são bem  
13 definidas. Alguns autores vêm analisando essas relações filogenéticas e, mais  
14 recentemente, Lundberg et al. (2011) por meio de marcadores moleculares,  
15 dividiram esta família em duas linhagens principais: os “Sorubimine”, onde se  
16 encontram as espécies de grande porte e o “clado OCP” que inclui *Pimelodus*  
17 *ornatus* Kner, 1858 e o grupo *Calophysus* – *Pimelodus*, onde se encontram os  
18 “calophysines”, que abrangem espécies de cinco gêneros: *Calophysus*,  
19 *Aguarunichthys*, *Luciopimelodus*, *Pinirampus* e *Pimelodina* e os “pimelodines” que  
20 incluem o grupo *Exallodontus-Pimelodus altissimus* Eigenmann & Pearson, 1942  
21 (onde está incluso o gênero *Propimelodus*) e o grupo *Pimelodus*.

22 Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar citogeneticamente  
23 espécies de peixes da família Pimelodidae coletadas no rio Solimões, bacia  
24 Amazônica e comparar o padrão cariotípico destas espécies com os já descritos na  
25 literatura. Este estudo traz as primeiras análises citogenéticas de *Propimelodus*

1 eigenmanni (Van der Stigchel, 1946) e *Exallodontus aguanae* (Lundberg, Mago-  
2 Leccia & Nass, 1991) e informações complementares para *Calophysus macropterus*  
3 (Lichtenstein, 1819), além de realizar uma integração de dados citogenéticos com  
4 filogenias moleculares de Pimelodidae, previamente conhecidas, e inferir hipóteses  
5 sobre evolução cariotípica do grupo, a partir de caracteres ancestrais e derivados,  
6 bem como esclarecer dúvidas sobre as relações filogenéticas entre as espécies.

## 1 **Material e métodos**

### 2 **Material e local de coleta**

3 Foram analisadas três espécies de Pimelodidae: *Calophysus macropterus* (7  
4 fêmeas + 4 espécimes de sexo não identificado), *Propimelodus eigenmanni* (5  
5 fêmeas + 2 machos) e *Exallodontus aguanae* (1 fêmea), capturadas no rio Solimões,  
6 próximo à área de confluência – Manaus/AM: S 3 08' 16.32" O 59 54' 13.45".

7 As coletas foram realizadas utilizando tarrafa e rede de arrasto. O material  
8 foi processado e fixado no Laboratório de Genética Animal do Instituto Nacional de  
9 Pesquisas da Amazônia (INPA) e as análises citogenéticas foram realizadas no  
10 laboratório de Citogenética Animal da Universidade Estadual de Londrina. Os  
11 exemplares foram identificados e depositados no Museu de Zoologia da  
12 Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), com os seguintes números de  
13 vouchers: *Calophysus macropterus* (MZUEL-Peixes 17805), *Exallodontus aguanae*  
14 (MZUEL-Peixes 17806) e *Propimelodus eigenmanni* (MZUEL-Peixes 17812).

### 15 **Preparação de cromossomos e coloração convencional**

16 Foi realizada uma indução mitótica 48 horas antes da eutanásia dos peixes,  
17 por meio de um lisado bacteriano injetado na região intraperitoneal (2 ml), de acordo  
18 com Molina et al. (2010). A obtenção dos cromossomos mitóticos foi realizada a  
19 partir da técnica de preparação direta proposta por Bertollo et al. (1978) e para a  
20 análise deste material as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5% por 8  
21 minutos.

22 A montagem do cariótipo foi realizada com o auxílio do programa Adobe  
23 Photoshop CS6, a partir da classificação cromossômica proposta por Levan et al.  
24 (1964), com algumas modificações, considerando cromossomos metacêntricos (m),

1 submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) com dois braços e cromossomos  
2 acrocêntricos (a) com um braço para cálculo do número fundamental (NF).

### 3 **Bandamentos cromossômicos e Hibridação Fluorescente *in situ***

4 Para a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo ativas (Ag-RONs)  
5 foi aplicada a técnica de impregnação por nitrato de prata, proposta por Howell e  
6 Black (1980). Para a determinação do padrão de distribuição da heterocromatina foi  
7 realizada a técnica de bandamento C, de acordo com Sumner (1972), com  
8 modificação na etapa de coloração, ocorrendo substituição da solução de Giemsa  
9 pelo fluorocromo Iodeto de Propídeo, proposto por Lui et al. (2012). As regiões ricas  
10 em pares de bases GC e AT foram identificadas utilizando os fluorocromos  
11 cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4'-6-diamidino-2 fenilindol (DAPI), respectivamente, a  
12 partir da técnica de Schweizer (1980).

13 A técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada de acordo  
14 com Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000) com modificações, utilizando as  
15 sondas de DNAr 18S isolada de *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829  
16 (Hatanaka e Galetti 2004) e de DNAr 5S isolada de *Pimelodella cristata* (Müller &  
17 Troschel, 1849), utilizando o par de oligonucleotídeos específicos: A – 5'  
18 TACGCCCGATCGTCCGATC 3' e B – 5' CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC 3'  
19 (Martins e Galetti 1999). Para isso foi realizada a extração de DNA de *Pimelodella*  
20 *cristata* seguindo o protocolo proposto por Sambrook et al. (1989) com modificações  
21 e a reação de PCR contendo 36,5 µl de água ultra pura; 5 µl de buffer 10x; 2 µl de  
22 MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 1 µl de dNTP mix 10mM; 2 µl de iniciador A (10 µM) e 2 µl do iniciador  
23 B (10 µM); 1 µl de DNA molde (100ng) e 0,5 µl de Taq polimerase (5U/ µl).

1 O perfil das reações de PCR para a geração dos fragmentos do DNAr 5S foi  
2 composto por uma etapa de desnaturação inicial de 2 min a 94°C seguido por 35  
3 ciclos de 94°C por 45 seg, anelamento a 60°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30  
4 seg, seguido por uma etapa final de extensão de 5 minutos a 72°C.

5 A sonda de DNAr 18S (1800 pb) foi marcada com biotina-14-dATP por nick  
6 translation e detectada com avidina-FITC, enquanto a sonda de DNAr 5S (200 pb)  
7 foi marcada com Cy3-AP3-dUTP (marcação direta). Os cromossomos foram  
8 contracolorados com DAPI.

9 Para a análise das lâminas foi utilizado um microscópio de epifluorescência  
10 (Leica DM2000) acoplado a uma câmera digital (MoticamPro 282B) e, por meio do  
11 software Motic Images Advanced, versão 3.2, as imagens foram capturadas.

## 12 **Reconstrução de caráter citogenético ancestral**

13 A reconstrução do caráter citogenético ancestral na família Pimelodidae foi  
14 baseada na classificação molecular de Máxima Parcimônia (MP) proposta por  
15 Lundberg et al. (2011), a partir de sequências nucleares e mitocondriais combinadas.  
16 Foi construída uma matriz composta por 22 taxons, incluindo o grupo externo  
17 selecionado pelos autores, *Pseudopimelodus mangurus* (Valenciennes, 1835).

18 O caráter ancestral tanto do número diploide ( $2n$ ) quanto da localização da  
19 Ag-RON foi estimado seguindo o modelo de reconstrução de máxima  
20 verossimilhança, sob o modelo de probabilidade Mk1 (Markov k-state) no software  
21 Mesquite, versão 3.0 (Maddison e Maddison 2014). Para cada nó foi estimado o  
22 provável caráter ancestral, observado na Tabela 3, considerando os caracteres  
23 número diploide e localização da Ag-RON.

## 1 Resultados

### 2 Giemsa e bandamentos cromossômicos

3 As espécies analisadas no presente estudo apresentaram algumas  
4 características cariotípicas semelhantes, geralmente compartilhadas dentro do grupo  
5 que estão inseridas, assim como também mostraram algumas particularidades.

6 *Calophysus macropterus* apresentou  $2n=50$  com fórmula cariotípica de  
7  $20m+20sm+10a$  e  $NF=90$  (Figura 1a). A Ag-RON foi evidenciada na região terminal  
8 do braço curto de um par de cromossomos acrocêntricos, par 21 (Figura 1a, box).

9 A heterocromatina mostrou-se localizada nas regiões terminais e  
10 pericentroméricas de alguns cromossomos. Um grande bloco de heterocromatina foi  
11 localizado no par 21 acrocêntrico (Figura 2a), correspondente à constrição  
12 secundária e Ag-RON, sendo  $CMA_3$  positiva (Figura 1a, box).

13 As espécies *Propimelodus eigenmanni* e *Exallodontus aguanae*  
14 apresentaram  $2n=56$  e  $NF=106$ , com diferentes fórmulas cariotípicas: *P. eigenmanni*  
15 mostrou  $28m+20sm+2st+6a$  (Figura 1b) e *E. aguanae*  $36m+12sm+2st+6a$  (Figura  
16 1c). Em ambas as espécies foi observada uma constrição secundária, coincidente  
17 com Ag-RON e  $CMA_3$  positiva (Figura 1b-c, box). Em *P. eigenmanni* esta constrição  
18 foi evidenciada na região terminal do braço curto do par 26 acrocêntrico e em *E.*  
19 *aguanae* no braço longo do primeiro par metacêntrico na região intersticial,  
20 apresentando um heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos,  
21 claramente visível com Giemsa, mas não com Ag-RON e  $CMA_3$  (Figura 1b-c, box).

22 A heterocromatina em *P. eigenmanni* mostrou-se distribuída nas regiões  
23 terminais dos pares cromossômicos 1, 2, 5, 20 e 21 em ambas as extremidades.  
24 Além disso, a heterocromatina apareceu associada à Ag-RON, mostrando uma forte  
25 marcação no par 26 (Figura 2b). Em *E. aguanae* a heterocromatina revelou uma  
26 marcação bem evidente correspondente à constrição secundária intersticial no par 1,

1 além de marcações terminais em alguns cromossomos (Figura 2c).

2 Todas as espécies revelaram apenas um par cromossômico portador do  
3 gene ribossomal 18S confirmando as RONS ativas (Figura 1a, b, c, boxes) e um  
4 heteromorfismo de tamanho entre cromossomos homólogos em *Propimelodus*  
5 *eigenmanni* (Figura 1b, box) e *Exallodontus aguanae* (Figura 1c, box).

6 Em relação ao gene ribossomal 5S, em *C. macropterus* foram encontrados  
7 quatro sítios deste gene, dois localizados na região terminal do braço curto do par  
8 cromossômico 19, submetacêntrico, e os outros dois sítios sintênicos ao sítio de  
9 DNAr 18S, localizados no par cromossômico 21, acrocêntrico (Figura 1a, box). Em  
10 *E. aguanae* o sítio de DNAr 5S aparece sintênico ao sítio de DNAr 18S, localizado  
11 na região intersticial do braço longo do primeiro par metacêntrico (Figura 1c, box).

12 A espécie *P. eigenmanni* possui dois sítios do DNAr 5S, localizados na  
13 posição terminal do braço curto do par cromossômico 17, submetacêntrico (Figura  
14 1b, box), não apresentando sintenia entre os genes ribossomais 18S e 5S.

### 15 **Estimativa do caráter citogenético ancestral na família Pimelodidae**

16 O primeiro caráter a ser analisado foi o número diploide ancestral dentro da  
17 família Pimelodidae. Os resultados sugerem que  $2n=56$  é o provável caráter  
18 ancestral dentro deste grupo, presente com grande valor probabilístico na maioria  
19 dos nós (acima de 96%), incluindo o nó ancestral do grupo (nó 2). Em contrapartida,  
20 os números diploides 54 e 50 surgem a partir do nó 13, como condições derivadas  
21 observadas no grupo "*Calophysus*" (Figura 3a).

22 Outro caráter analisado foi à localização da Ag-RON, onde o estado  
23 ancestral mais provável é na porção terminal do braço curto. Este caráter ancestral é  
24 suportado por um alto valor probabilístico (99%), encontrado na grande maioria dos  
25 nós. Os caracteres derivados foram observados no grupo "*Pimelodus*", a partir do nó

- 1 16, apresentando Ag-RONs no braço longo, em regiões terminais e intersticiais
- 2 (Figura 3b).

## 1 **Discussão**

### 2 **Dados cariotípicos**

3 Os resultados deste estudo trazem as primeiras informações citogenéticas de  
4 *Propimelodus eigenmanni*, *Exallodontus aguanae* e informações complementares de  
5 *Calophysus macropterus*. As duas primeiras seguiram o padrão conservado da  
6 família com  $2n=56$  e *C. macropterus* apresentou  $2n=50$ , assim como no estudo de  
7 Ramirez-Gil et al. (1998). Embora o número diploide da grande maioria das espécies  
8 permaneça conservado, variações nas fórmulas cariotípicas podem ser observadas  
9 na Tabela 1, resultado de rearranjos cromossômicos, provavelmente inversões  
10 pericêntricas que permitem o surgimento de novas fórmulas cariotípicas sem afetar o  
11 número diploide das espécies (Garcia e Moreira-Filho 2005; Sanchez et al. 2010,  
12 2014).

13 Lundberg et al. (2011), por meio de análises moleculares, trazem uma  
14 hipótese filogenética relacionando os pimelodídeos da América do Sul. Os autores  
15 dividem a família Pimelodidae em duas linhagens principais, os “Sorubimine” e o  
16 clado OCP (*Pimelodus ornatus* – grupo “*Calophysus*” – grupo “*Pimelodus*”).  
17 Relacionando a árvore filogenética proposta por Lundberg et al. (2011) com os  
18 dados citogenéticos existentes, nota-se uma grande correspondência dentro destas  
19 duas linhagens. No grupo “Sorubimine”, que seriam as espécies de grande porte,  
20 todas apresentam  $2n=56$  (Figura 4).

21 As espécies *Calophysus macropterus*, *Luciopimelodus pati* e *Pinirampus*  
22 *pirinampu* do grupo “*Calophysus*”, possuem todas  $2n=50$  sendo grupos próximos  
23 dentro da evolução filogenética dos pimelodídeos (Figura 4). Além do  $2n=50$ , a  
24 espécie *Calophysus macropterus* exibiu outra característica compartilhada com *L.*  
25 *pati* e *P. pirinampu*: o primeiro par cromossômico maior do que o restante do

1 cariótipo, característica que pode ter sido resultante de fusões em tandem durante a  
2 evolução cariotípica, considerado um marcador citogenético para o grupo  
3 “*Calophysus*”, como proposto por Sanchez et al. (2010).

4 De acordo com Lundberg et al. (2011) as espécies dos gêneros *Exallodontus*  
5 e *Propimelodus* pertencem ao grupo “*Pimelodines*”, agrupadas em um mesmo clado  
6 (*Exallodontus* – *Pimelodus altíssimus*, EA) e ambas apresentaram o  $2n=56$   
7 conservado no grupo “*Pimelodus*” (Figura 4). Além disso, foi observado no cariótipo  
8 de *E. aguanae* (36m+12sm+2st+6a) a predominância de cromossomos do tipo  
9 metacêntrico, sendo esta uma característica encontrada também em algumas  
10 populações do grupo “*Pimelodus*”, como *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874),  
11 *Pimelodus fur*, *P. maculatus*, *P. microstoma* Steindachner, 1877 e *Pimelodus* sp  
12 (Tabela 1).

13 Sendo assim, os dados citogenéticos presentes na literatura parecem  
14 corroborar com as análises moleculares de Lundberg et al. (2011), mostrando uma  
15 maior relação da espécie *C. macropterus* com *L. pati*, seguido de *P. pirinampu*,  
16 assim como *E. aguanae* aparece como grupo próximo do gênero *Propimelodus*,  
17 espécies relacionadas ao grupo “*Pimelodus*” (Figura 4).

18 Dentro da família Pimelodidae as Ag-RONs, na maioria dos casos, são  
19 encontradas na posição terminal do braço curto de um par de cromossomos do tipo  
20 subtelocêntrico (Tabela 1). *Calophysus macropterus* e *Propimelodus eigenmanni*  
21 seguiram este padrão porém, a Ag-RON mostrou-se localizada em um par  
22 cromossômico do tipo acrocêntrico, assim como observado por Ramirez-Gil et al.  
23 (1988) analisando outra população de *C. macropterus*, Swarça et al. (2005a) em  
24 *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829), Sanchez et al. (2010) em  
25 *Luciopimelodus pati*, Swarça et al. (2017) em *Phractocephalus hemioliopus*, entre  
26 outros. Já *Exallodontus aguanae* apresentou a Ag-RON em posição intersticial,

1 sendo este o primeiro relato dentro do grupo (Tabela 1), constituindo um importante  
2 marcador citogenético espécie-específico.

3 A FISH com sonda de DNAr 18S já foi aplicada em muitas das espécies da  
4 família Pimelodidae confirmando o número e localização da Ag-RON (Tabela 1),  
5 bem como nas espécies analisadas neste estudo, confirmando também o  
6 heteromorfismo de tamanho desta região, observado em *Propimelodus eigenmanni*  
7 e *Exallodontus aguanae*. A modificação estrutural das RONS é resultado da variação  
8 no número de cópias dos genes ribossomais, causada por eventos de crossing-over  
9 desigual ou outros rearranjos como deleções, duplicações ou transposições que  
10 envolvem segmentos dos cromossomos homólogos (Galleti-Jr et al. 1995; Castro et  
11 al. 1998). Esse heteromorfismo já foi evidenciado em outras espécies de  
12 Pimelodídeos como *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821) (Swarça et al. 2001b),  
13 *Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005 e *S. scriptum* (Miranda Ribeiro,  
14 1918) (Swarça et al. 2005b, 2008) e *Brachyplatystoma filamentosum* (Lichtenstein,  
15 1819) (Gonçalves et al. 2014).

16 Em relação ao DNAr 5S, grande parte das espécies de pimelodídeos  
17 apresentam apenas um par portador deste gene ribossomal (Tabela 1), como  
18 observado em *Exallodontus aguanae* e *Propimelodus eigenmanni*. Entretanto, estes  
19 sítios foram localizados em mais de um par cromossômico em *Calophysus*  
20 *macropterus* que apresentou quatro sítios do gene ribossomal 5S, primeiro relato  
21 dentro do grupo “*Calophysus*”. Por falta de análises com este marcador nas outras  
22 espécies, ainda não se pode afirmar se esta é uma característica compartilhada pelo  
23 grupo “*Calophysus*”, ou se é particular da espécie *C. macropterus*. Mais de dois  
24 sítios do gene ribossomal 5S, também tem sido encontrados em algumas espécies  
25 do gênero *Pimelodus*, *Pseudoplatystoma corruscans* e *Sorubim lima* (Bloch &  
26 Schneider, 1801) (Tabela 1).

1 Há uma grande variação em relação à posição dos sítios de DNAr 5S,  
2 podendo ocorrer em regiões terminais, intersticiais, pericentroméricas e  
3 subterminais, de braços curtos e longos (Tabela 1). Martins e Galleti-Jr (1999)  
4 descrevem a localização do DNAr 5S na região intersticial em várias espécies  
5 neotropicais e propuseram que, por meio de uma inversão paracêntrica, os sítios  
6 desse DNAr poderiam ser rearranjados e encontrados também nas porções  
7 terminais dos cromossomos, sendo este um caráter provavelmente derivado.  
8 Seguindo esta hipótese, *C. macropterus* e *P. eigenmanni* poderiam ter sofrido um  
9 rearranjo cromossômico resultando neste caráter, enquanto *Exallodontus aguanae*  
10 manteve a localização do gene ribossomal na posição intersticial.

11 Das espécies analisadas, foi observada sintenia dos dois clusters de genes  
12 ribossomais em *C. macropterus* e *E. aguanae*. A condição não sintênica desses  
13 genes é o padrão mais frequentemente descrito (Swarça et al. 2008, 2009; Carvalho  
14 et al. 2010). Apenas em *Pimelodus britskii* (Moraes-Neto et al. 2011) e, mais  
15 recentemente, em *P. maculatus* (Girardi et al. 2018) foi descrita a condição sintênica  
16 neste grupo de peixes, sendo esta uma característica exclusiva do grupo OCP.

17 As espécies pertencentes à família Pimelodidae apresentam, geralmente,  
18 pouca heterocromatina localizada, principalmente, nas regiões pericentroméricas e  
19 terminais dos cromossomos (Borin e Martins-Santos 2004; Carvalho et al. 2004;  
20 Sanchez et al. 2010; Gonçalves et al. 2014) entre outros. As três espécies aqui  
21 analisadas apresentaram um padrão de bandas composto por uma quantidade  
22 maior de heterocromatina, diferente do padrão frequentemente encontrado.

23 Além disso, *Propimelodus eigenmanni* apresentou cromossomos com blocos  
24 heterocromáticos biteloméricos, característica esta compartilhada com outras  
25 espécies da família como: *Pimelodus maculatus* e *Pimelodus* sp (Borin e Martins-  
26 Santos 2002), *Iheringichthys labrosus* (Carvalho et al. 2004; Ribeiro et al. 2008;

1 Sanchez et al. 2014), *Pseudoplatystoma reticulatum*, *Pimelodus britskii*, *Sorubim*  
2 *lima* e *Steidachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Moraes-Neto et al. 2011),  
3 *Megalonema platanum* (Carvalho et al. 2011) e *Phractocephalus hemiliopterus*  
4 (Swarça et al. 2017). As três espécies aqui estudadas também exibiram fortes  
5 marcações heterocromáticas associadas às RONS, característica geralmente  
6 encontrada no grupo.

### 7 **Reconstrução de caráter ancestral**

8 Considerando caracteres como número diploide e localização da Ag-RON,  
9 pode ser feita uma representação hipotética das relações ancestral/derivado dentro  
10 da família Pimelodidae.

11 Muitos estudos citogenéticos ressaltam a proposta de Oliveira e Gosztanyi  
12 (2000) de que  $2n=56$  seria o número diploide ancestral na ordem Siluriformes,  
13 baseada apenas na frequência deste caráter (Souza et al. 2004; Garcia e Moreira-  
14 Filho 2005; Mazzucheli et al. 2007). Seguindo este raciocínio, Treco et al. (2008) e  
15 Moraes-Neto et al. (2011) afirmam que o  $2n=56$  é a provável condição basal da  
16 família Pimelodidae.

17 No presente estudo, considerando o grupo externo *Pseudopimelodus*  
18 *mangurus*, observa-se que não é possível afirmar qual o provável número diploide  
19 ancestral, já que  $2n=54$  e  $2n=56$  apresentaram valores probabilísticos próximos no  
20 nó 1 (50% e 47% respectivamente), como observado na Tabela 2. Porém, se  
21 analisarmos o clado monofilético da família Pimelodidae, pode-se de fato confirmar  
22 que o  $2n=56$  é o provável caráter ancestral para esse grupo (Figura 3a, nó 2), que  
23 está sendo suportado por um alto valor probabilístico, 96% (Tabela 2). Estes dados  
24 confirmam o número diploide considerado basal por Treco et al. (2008) e Moraes-  
25 Neto et al. (2011), porém baseados numa análise estatística e não apenas na

1 frequência desta característica na família Pimelodidae.

2 Em relação às Ag-RONs, a localização na porção terminal do braço curto  
3 provavelmente seria o caráter ancestral (Figura 3b, nó 1), hipótese que conta com  
4 99% no valor de suporte, se mantendo na maioria dos táxons e sofrendo uma  
5 diminuição apenas no grupo "*Pimelodus*", a partir do nó 16. Mesmo assim, o clado  
6 portador dos caracteres derivados ainda mostra como condição ancestral a  
7 localização da Ag-RON na posição terminal do braço curto (91%), como observado  
8 na Tabela 2.

9 A filogenia molecular de Lundberg et al. (2011) mostrou que os pimelodídeos  
10 são divididos em duas linhagens principais: o clado formado pelos "Sorubimines" e o  
11 clado OCP (*Pimelodus ornatus* – grupo "*Calophysus*" – grupo "*Pimelodus*"), também  
12 conhecido como "calophysines" e "pimelodines". Quando são associados os dados  
13 filogenéticos moleculares de Lundberg et al. (2011) com os dados citogenéticos  
14 existentes na literatura, pode-se fazer uma análise integrada para compreender as  
15 possíveis tendências evolutivas que ocorreram neste grupo de peixes.

16 Ao observar o grupo "Sorubimine" nota-se que todas as espécies  
17 apresentam as características ancestrais analisadas ( $2n=56$  e Ag-RON=p terminal),  
18 confirmando a conservação cariotípica que se manteve ao longo da evolução deste  
19 grupo (Figura 3a, b), como já proposto por Martins-Santos et al. (1996) e Swarça et  
20 al. (2013). Sendo peixes de grande porte, espécies deste grupo são capazes de  
21 fazer longas migrações em cardumes e, possivelmente por este motivo, mantiveram  
22 um cariótipo mais estável.

23 É possível que uma divergência evolutiva tenha ocorrido entre os  
24 "sorubimines" e o clado OCP, já que o primeiro grupo se mostra conservado  
25 enquanto o segundo é portador das condições derivadas (Figura 3a, b,  
26 respectivamente).

1 Em relação ao número diploide, observa-se uma variação no grupo  
2 “*Calophysus*”, onde há uma diminuição do  $2n$  ancestral para  $2n=54$  em *Megalonema*  
3 *platanum* e  $2n=50$  em *Calophysus macropterus*, *Luciopimelodus pati* e *Pinirampus*  
4 *pirinampu*. Esta redução do número diploide ocorre por meio de duas fusões  
5 cêntricas, sendo esta uma característica restrita, até então, ao grupo “*Calophysus*”  
6 (Figura 3a). No cariótipo das espécies deste clado o primeiro par cromossômico  
7 maior pode ser resultado de tais fusões, sendo considerado por Sanchez et al.  
8 (2010) um marcador citogenético para o grupo “*Calophysus*”.

9 A tendência evolutiva do sítio Ag-RON não parece estar relacionada com a  
10 variação do número diploide, pois esta variação vem sendo encontrada em outro  
11 grupo do clado OCP, o grupo “*Pimelodus*”. Neste caso os rearranjos cromossômicos  
12 possivelmente estão associados à processos de inversão pericêntrica e/ou  
13 translocações (Figura 3b).

14 Portanto, com base nessas análises os rearranjos cromossômicos  
15 estruturais aparecem na filogenia como uma condição derivada dentro da família  
16 Pimelodidae, limitados apenas ao clado OCP. A variação no  $2n$  não está,  
17 necessariamente, relacionada com a variação na posição da Ag-RON, pois grupos  
18 distintos apresentaram rearranjos cromossômicos diferentes: enquanto o grupo  
19 “*Calophysus*” parece ter sofrido fusões cromossômicas, originando  $2n=54$  em  
20 *Megalonema platanum* e, posteriormente,  $2n=50$  em *C. macropterus*, *L. pati* e *P.*  
21 *pirinampu*, o grupo “*Pimelodus*” teria passado por rearranjos do tipo inversões  
22 pericêntricas, alterando a posição dos sítios de Ag-RONs e mantendo o mesmo  
23 número diploide (Figura 3a, b respectivamente).

24 As espécies de pimelodídeos analisadas neste estudo apresentaram  
25 algumas particularidades, como em *Calophysus macropterus* que apresentou  
26 número diploide diferente do padrão conservado em Pimelodídeos, além de dois

1 pares portadores dos genes ribossomais 5S, sendo um deles sintênico ao DNAr  
2 18S. A espécie *Exallodontus aguanae* apresentou características bem diferentes do  
3 comumente encontrado na literatura, como a presença da RON no primeiro par  
4 metacêntrico, fato relatado pela primeira vez na família, além da sintonia dos genes  
5 ribossomais. Já *Propimelodus eigenmanni* apresentou características citogenéticas  
6 frequentemente relatadas na família Pimelodidae, sendo esta a espécie mais  
7 conservada dentre as três aqui analisadas.

8 Tais informações sugerem que, ao longo do processo evolutivo destas  
9 espécies, mudanças cromossômicas podem ter ocorrido de maneiras distintas,  
10 resultando nas variações que hoje são encontradas nas diferentes  
11 espécies/populações da família Pimelodidae. Os dados citogenéticos aqui  
12 apresentados estão de acordo com a filogenia molecular previamente descrita e,  
13 possivelmente, rearranjos cromossômicos como fusões e inversões pericêntricas  
14 desempenharam um papel importante na evolução cariotípica de grupos específicos  
15 da família Pimelodidae, inclusive nas espécies analisadas no presente estudo.

## 1 Referências bibliográficas

- 2 Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations  
3 on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1:103–120
- 4 Borin LA, Martins-Santos IC (2002) Cytogenetic aspects in species of the genus  
5 *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the river Paraná Basin.  
6 *Cytologia* 67(2):199-204
- 7 Borin LA, Martins-Santos IC (2004) Study on karyotype and occurrence of B  
8 chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes,  
9 Pimelodidae) from the river Iguaçu. *Hereditas* 140(3):201-209
- 10 Carvalho RA, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2004) Cytogenetic analysis of A-and B-  
11 chromosomes of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi  
12 River, Paraná, Brazil. *Cytologia* 69(4):381-385
- 13 Carvalho RAD, Dias AL (2005) Cytogenetic characterization of B chromosomes in  
14 two populations of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the  
15 Capivara Reservoir (Paraná, Brazil). *Caryologia* 58(3):269-273
- 16 Carvalho RAD, Dias AL (2007) Interindividual size heteromorphism of NOR and  
17 chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. *Brazilian*  
18 *Archives of Biology and Technology* 50(1):141-146
- 19 Carvalho RA, Laudicina A, Giuliano-Caetano L, Martins-Santos IC, Dias AL (2010)  
20 Cytogenetic analysis of the 18S, 5S rDNA and B chromosome of *Iheringichthys*  
21 *labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes, Pimelodidae). *Brazilian Journal of Biology*  
22 70(3):631-636
- 23 Carvalho RAD, Sanchez S, Swarça AC, Fenocchio AS, Martins-Santos IC, Dias AL  
24 (2011) Chromosomal analyses in *Megalonema platanum* (Siluriformes:  
25 Pimelodidae), an endangered species from South American rivers. *Neotropical*  
26 *Ichthyology* 9(1):177-182
- 27 Castro J, Sánchez L, Martínez P (1998) Analysis of the inheritance of NOR size  
28 variants in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Heredity* 89:264-266
- 29 Della-Rosa VA, Bertollo LAC, Ferrari I, Takahashi CS, Moreira-Filho O, Foresti F  
30 (1980) Estudos citogenéticos de peixes da Amazônia. II. Ordem siluriformes. *Ci*  
31 *and Cult* 32:735
- 32 Dias AL, Foresti F (1993) Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae  
33 (Siluroidei). *Revista Brasileira de Genética* 585-600
- 34 Eschmeyer WN, Fong JD ESPÉCIES POR FAMÍLIA / SUBFAMÍLIA.  
35 [http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByF](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp)  
36 [amily.asp](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp). Acessado em 01 jun 2018
- 37 Fenocchio AS, Bertollo LA (1992) Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces,  
38 Siluriformes) from the Brazilian amazon region. *Cytobios* 69(276):41-46

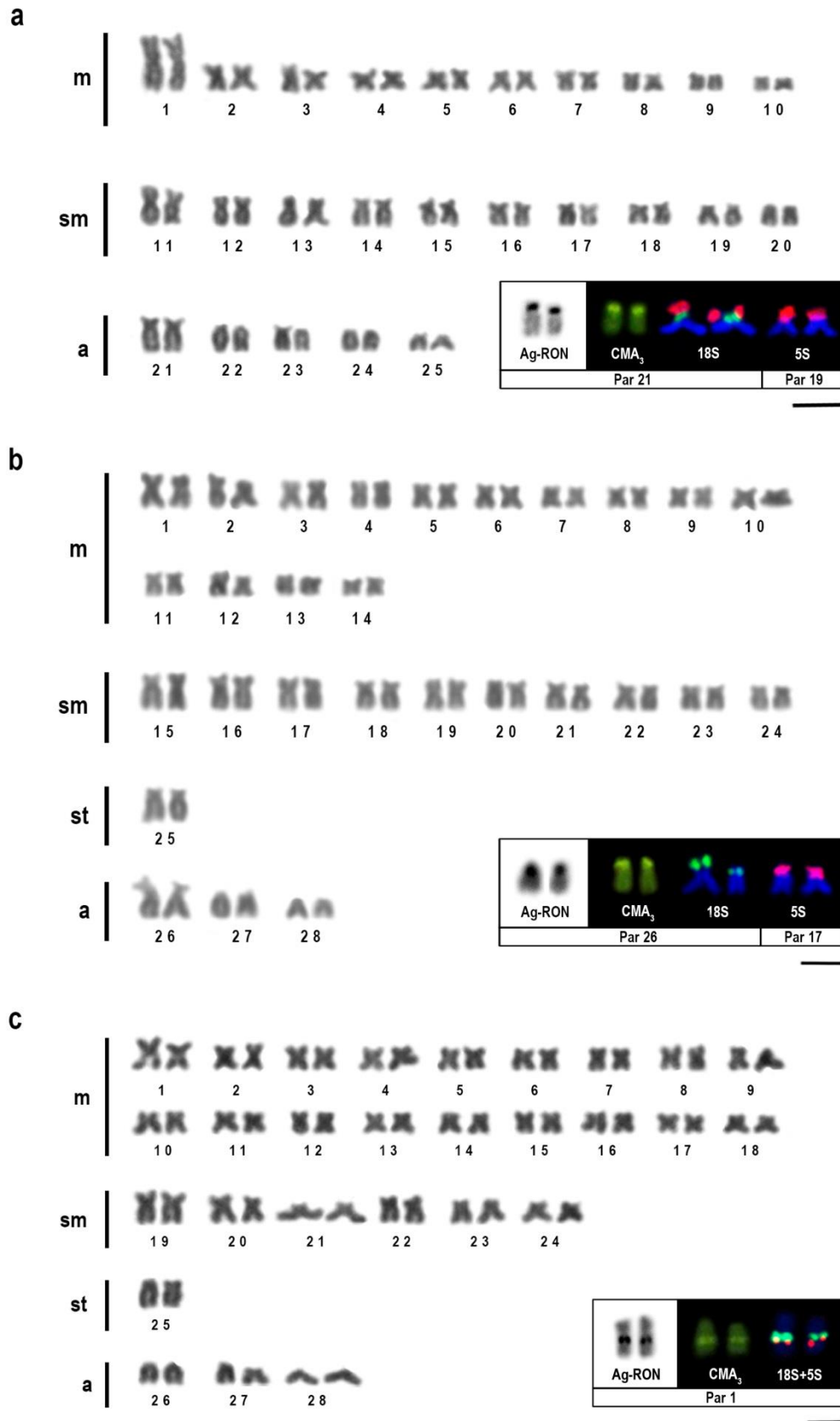
- 1 Ferreira M, Bressane KCO, Moresco ARC, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF,  
2 Garcia C (2014) Comparative application of direct sequencing, PCR-RFLP, and  
3 cytogenetic markers in the genetic characterization of *Pimelodus* (Siluriformes:  
4 Pimelodidae) species: Possible implications for fish conservation. *Genetics and  
5 Molecular Research* 13(2):4529-4544
- 6 Galetti-Jr PM, Mestriner CA, Monaco PJ, Rasch EM (1995) Post-zygotic  
7 modifications and intra and interindividual nucleolar organizing region variations  
8 in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. *Chromosome Research*  
9 3(5):285-290
- 10 Garcia C, Moreira Filho O (2005) Cytogenetical analyses in three fish species of the  
11 genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco:  
12 considerations about the karyotypical evolution in the genus. *Neotropical  
13 Ichthyology* 3(2):285-290
- 14 Garcia C, Moreira Filho O (2008) Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus*  
15 species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as  
16 species markers and conservation of the 18S rDNA sites. *Genetics and  
17 Molecular Biology* 31(1):261-264  
18
- 19 Girardi, SC, Pavanelli CS, Margarido VP (2018) Contributions to the systematic of  
20 Pimelodidae (Osteichthyes, Siluriformes): basic and molecular cytogenetics on  
21 seven species of *Pimelodus* from three Brazilian hydrographic systems.  
22 *Neotropical Ichthyology* 16(2):e170148
- 23 Gonçalves ÁLM, Prado FDD, Ferreira DC, Voltolin TA, Senhorini JA, Foresti F, Porto-  
24 Foresti F (2014) First cytogenetic characterization of the giant Amazonian catfish  
25 *Brachyplatystoma filamentosum* (Siluriformes, Pimelodidae). *Caryologia*  
26 67(2):101-105
- 27 Hatanaka TE, Galetti PM Jr (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes  
28 in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz 1829 (Characiformes,  
29 Prochilodontidae). *Genetica* 122:239-244
- 30 Honji RM, Caneppele D, Pandolfi M, Nostro FLL, Moreira RG (2016) A case of  
31 intersex occurrence in *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877)  
32 (Siluriformes: Pimelodidae) under captivity condition: a cytogenetic and  
33 morphological study. *Neotropical Ichthyology* 14(4)
- 34 Hoorn C, Wesselingh FP, Ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Jaramillo  
35 C (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape  
36 evolution, and biodiversity. *Science* 330(6006):927-931
- 37 Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolar organizer regions  
38 with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014–1015
- 39 Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on  
40 chromosomes. *Hereditas* 52:201–220

- 1 Lui RL, Blanco DR, Moreira Filho O, Margarido VP (2012) Propidium iodide for  
2 making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic &*  
3 *Histochemistry* 87(7):433-438
- 4 Lundberg JG, Sullivan JP, Hardman M (2011) Phylogenetics of the South American  
5 catfish family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) using nuclear and  
6 mitochondrial gene sequences. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences*  
7 *of Philadelphia* 161(1):153-189
- 8 Maddison WP, DR Maddison (2014) Mesquite: um sistema modular para análise  
9 evolutiva. Versão 3.0 <http://www.mesquiteproject.org>
- 10 Martins C, Galetti-Jr PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in  
11 *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7(5):363-  
12 367
- 13 Martins-Santos IC, Julio Jr HF, Burin I (1996) Karyotypic studies of four species of  
14 the Sorubiminae subfamily (Pisces, Siluriformes). *Caryologia* 49(1):73-80
- 15 Matoso DA, de Almeida Val VMF, da Silva M, Moraes-Neto A, Almeida MC, Vicari  
16 MR, Artoni RF (2011) Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion*  
17 *melanodermatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodidae): a reappraisal the  
18 existence of sex chromosome system in the species. *Reviews in Fish Biology*  
19 *and Fisheries* 21(3):497-508
- 20 Mazzuchelli J, Swarça AC, Dias AL (2007) Structural chromosome polymorphism in a  
21 *Pimelodus maculatus* La Cepède, 1803 population (Siluriformes, Pimelodidae)  
22 from the Paranapanema River basin, PR, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*  
23 67(4):935-937
- 24 Molina WF, Alves DEO, Araújo WC, Martinez PA, Silva MF, Costa GW (2010)  
25 Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish  
26 cytogenetic preparations. *Genetics and Molecular Research* 9(3):1807-1814
- 27 Moraes-Neto A, Silva MD, Matoso DA, Vicari MR, Almeida MCD, Collares-Pereira  
28 MJ, Artoni RF (2011) Karyotype variability in neotropical catfishes of the family  
29 Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology* 9(1):97-105
- 30 Nirchio M, Mujica A, Oliveira C, Granado A, Mora J, Hett AK, Sola L (2013)  
31 *Pseudoplatystoma metaense* and *P. orinocoense* (Siluriformes: Pimelodidae)  
32 from the Orinoco basin, Venezuela: cytogenetic and molecular analyses. *Italian*  
33 *journal of zoology* 80(4):526-535
- 34 Oliveira C, Gosztonyi AE 2000 A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus*  
35 (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome  
36 evolution in siluriforms. *Caryologia* 53(1):31-37
- 37 Prado FDD, Nunes TL, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2012)  
38 Cytogenetic characterization of F1, F2 and backcross hybrids of the Neotropical  
39 catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*  
40 (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetics and molecular biology* 35(1):57-64

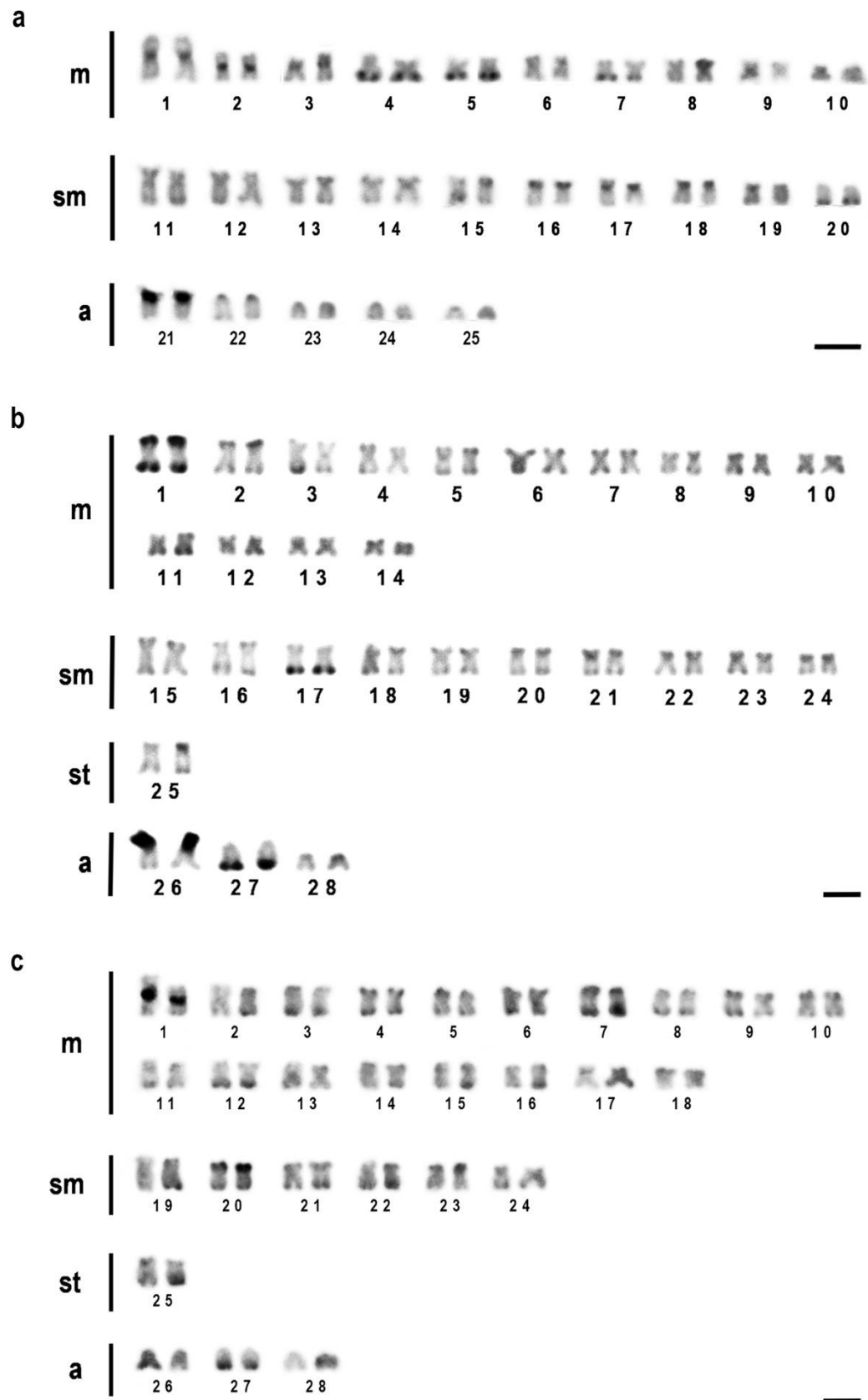
- 1 Queiroz LJ, Torrente-Vilara G, Ohara WM, Pires THS, Zuanon J, Doria (2013) Peixes  
2 do Rio Madeira. São Paulo
- 3 Ramirez-Gil H, Feldberg E, Almeida-Val VMF, Val AL (1998) Karyological,  
4 biochemical, and physiological aspects of *Calophysus macropterus* (Siluriformes,  
5 Pimelodidae) from the Solimões and Negro rivers (Central Amazon). Brazilian  
6 Journal of Medical and Biological Research 31(11):1449-1458
- 7 Ribeiro LB, Matoso DA, Almeida MC, Vicari MR, Moraes-Neto A, Svidnicki MCCM,  
8 Artoni RF (2008) Karyotypic variability in *Iheringichthys labrosus* (Teleostei,  
9 Pimelodidae) from the Tibagi River basin (Parana State, Brazil). Genetics and  
10 Molecular Research 7(3):718-724
- 11 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual  
12 (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press
- 13 Sanchez S, Swarça AC, Fenocchio AS (2010) Cytogenetic Studies and Evolutive  
14 Considerations in Species of the *Calophysus* Group (Siluriformes, Pimelodinae).  
15 Cytologia 75(3):223-227
- 16 Sanchez S, Swarça AC, Fenocchio AS (2014) Cytogenetics analyses among  
17 populations of the fish *Iheringichthys labrosus* (Kröyer, 1874) (Siluriformes,  
18 Pimelodidae). Karyotype analysis, C-banding and Ag-RONs distribution. Brazilian  
19 Journal of Biology 74(1):212-216
- 20 Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS (2000) Comparative genome organization in  
21 plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. The Plant  
22 Cell 12(5):617-635
- 23 Schweizer D 1980 Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific  
24 heterochromatic regions (DA-DAPI bandas) in human chromosomes.  
25 Cytogenetic and Genome Research 27(2-3):190-193
- 26 Sczepanski TS, Vicari MR, De Almeida MC, Nogaroto V, Artoni RF (2013)  
27 Chromosomal organization of repetitive DNA in *Sorubim lima* (Teleostei;  
28 Pimelodidae). Cytogenetic and genome research 141(4):309-316
- 29 Souza L, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2003) Karyotypic study of three species of  
30 *Pimelodus* (Pisces, Pimelodidae) from the Paraguai River basin. Cytologia  
31 68(4):345-350
- 32 Souza L, Swarça AC, Dias AL (2004a) Analysis of the nucleolus organizer regions in  
33 5 species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae), using AgNO<sub>3</sub>,  
34 CMA3 and FISH with the 18S rDNA probe. Caryologia 57(2):144-150
- 35 Souza L, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2004b) Banding chromosome pattern of two  
36 species of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Paraná river basin of  
37 Brazil. Folia Biologica 52(3-4):165-169

- 1 Sumner ATA (1972) Simple technique for demonstrating centromeric  
2 heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304–306
- 3 Swarça AC, Giuliano-Caetano L, Dias AL (1999) Cytogenetic characterization  
4 through chromosomic banding of *Pinirampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae)  
5 from the Tibagi river basin PR/Brazil. *Caryologia* 52(1-2):31-35
- 6 Swarça AC, Giuliano-Caetano L, Vanzela ALL, Dias AL (2001a) Heteromorphism of  
7 rDNA size in *Pinirampus pirinampu* (Pisces: Pimelodidae) detected by in situ  
8 hybridization. *Cytologia* 66(3):275-278
- 9 Swarça AC, Cestari MM, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2001b) Cytogenetic  
10 characterization of the large South American siluriform fish species *Zungaro*  
11 *zungaro* (Pisces, Pimelodidae). *Chromosome Science* 5(1):51-55
- 12 Swarça AC, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2001c) Analyses of nucleolus organizer  
13 regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae).  
14 *Genetica* 110(1):97
- 15 Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL (2005a) Karyotype divergence  
16 among populations of giant catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei:  
17 Pimelodidae) indicates higher species diversity. *Ichthyological Exploration of*  
18 *Freshwaters* 16(4):325
- 19 Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL (2005b) First chromosome data on  
20 *Steindachneridion scripta* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) from Brazilian  
21 rivers: Giemsa, CBG, G-, and RE banding. *Genet Mol Res* 4:734-741
- 22 Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Bertolo LAC, Dias AL (2006) Heteromorphic  
23 sex chromosome system with an exceptionally large Y chromosome in a catfish  
24 *Steindachneridion* sp (Pimelodidae). *Cytogenetic Genome Research* 112:325-  
25 328
- 26 Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL (2008) Analyses of the structure of  
27 NORs in two species of South American Sorubiminae fishes (Siluriformes) by  
28 means of several cytogenetic techniques. *Folia biologica* 56(1-1):31-35
- 29 Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL (2009) Localization and  
30 characterization of the 5S rDNA bearing chromosome in two *Steindachneridion*  
31 species by means of different cytogenetic techniques. *Cytologia* 74(3):323-327
- 32 Swarça AC, Sanchez S, Dias AL, Fenocchio AS (2013) Cytogenetics of the Porthole  
33 Shovelnose Catfish, *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840)  
34 (Siluriformes, Pimelodidae), a widespread species in South American rivers.  
35 *Comparative cytogenetics* 7(2):103-110
- 36 Swarça AC, Dias AL, Fenocchio AS (2017) Cytogenetic studies in the redbtail catfish,  
37 *Phractocephalus hemiliopterus* (Bloch & Schneider, 1801) (Siluriformes,  
38 Pimelodidae) a giant fish from Amazon basin. *Comparative Cytogenetics*  
39 11(1):119

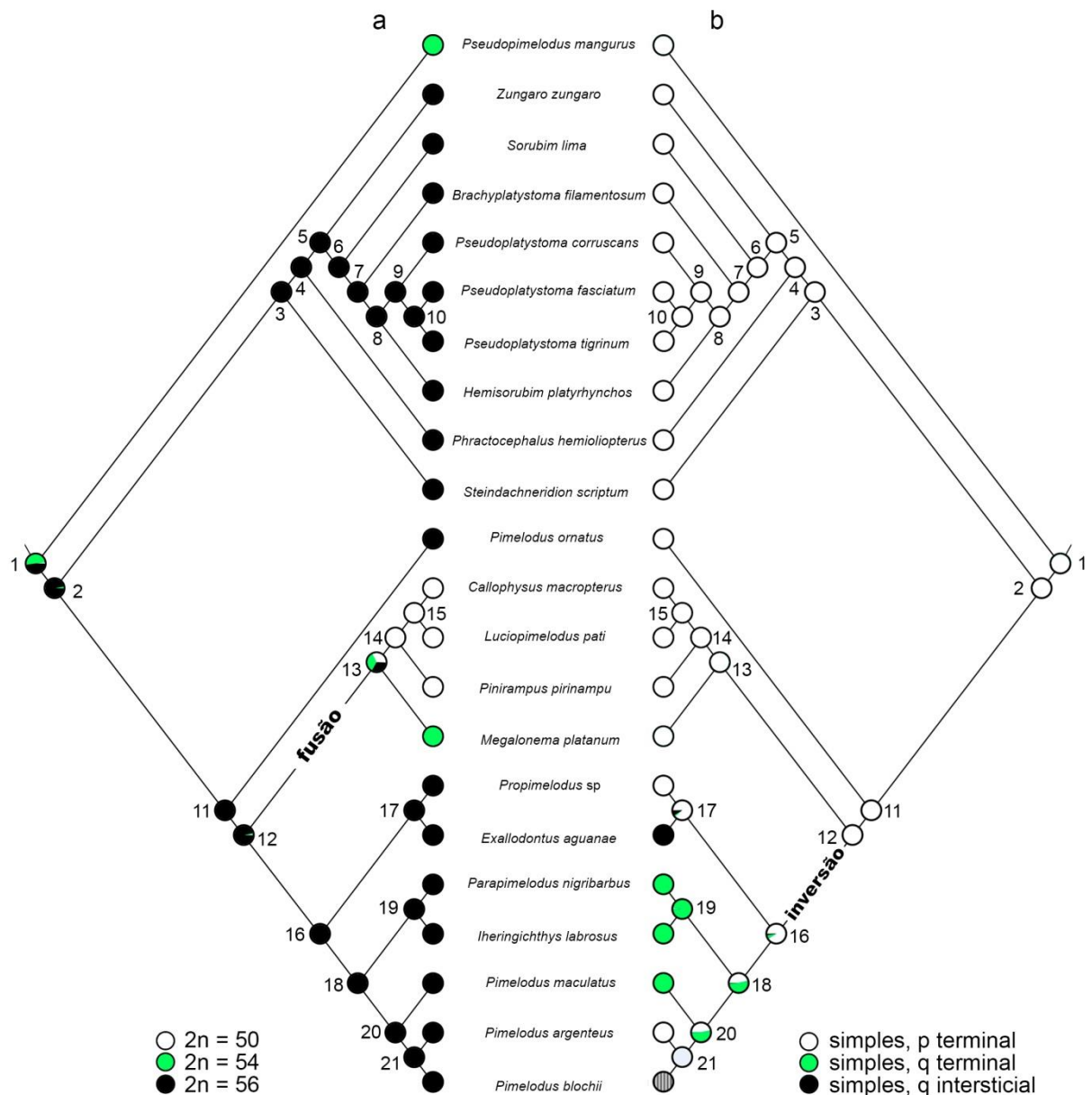
- 1 Toledo V, Ferrari I 1976b Estudo citogenético de três espécies do gênero *Pimelodus*  
2 (Pimelodidae, Pisces). Científica 4 (2):101-106
- 3 Treco FR, Malabarba LR, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2008) Cytogenetic study of  
4 two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio  
5 Grande do Sul, Brazil. Neotropical Ichthyology 6(1):87-92
- 6 Treco FR, Dias AL (2009) Short Note Karyotypes of Two Species of the Genus  
7 *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae). Folia biologica 57(1-2):43-48
- 8 Vasconcelos CD, Martins-Santos IC (2000) Chromosome polymorphism in species of  
9 the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). Hereditas 132(2):103-109
- 10 Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C (1999b) Supernumerary chromosomes in two  
11 species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). Chromosome science  
12 3(1):9-13



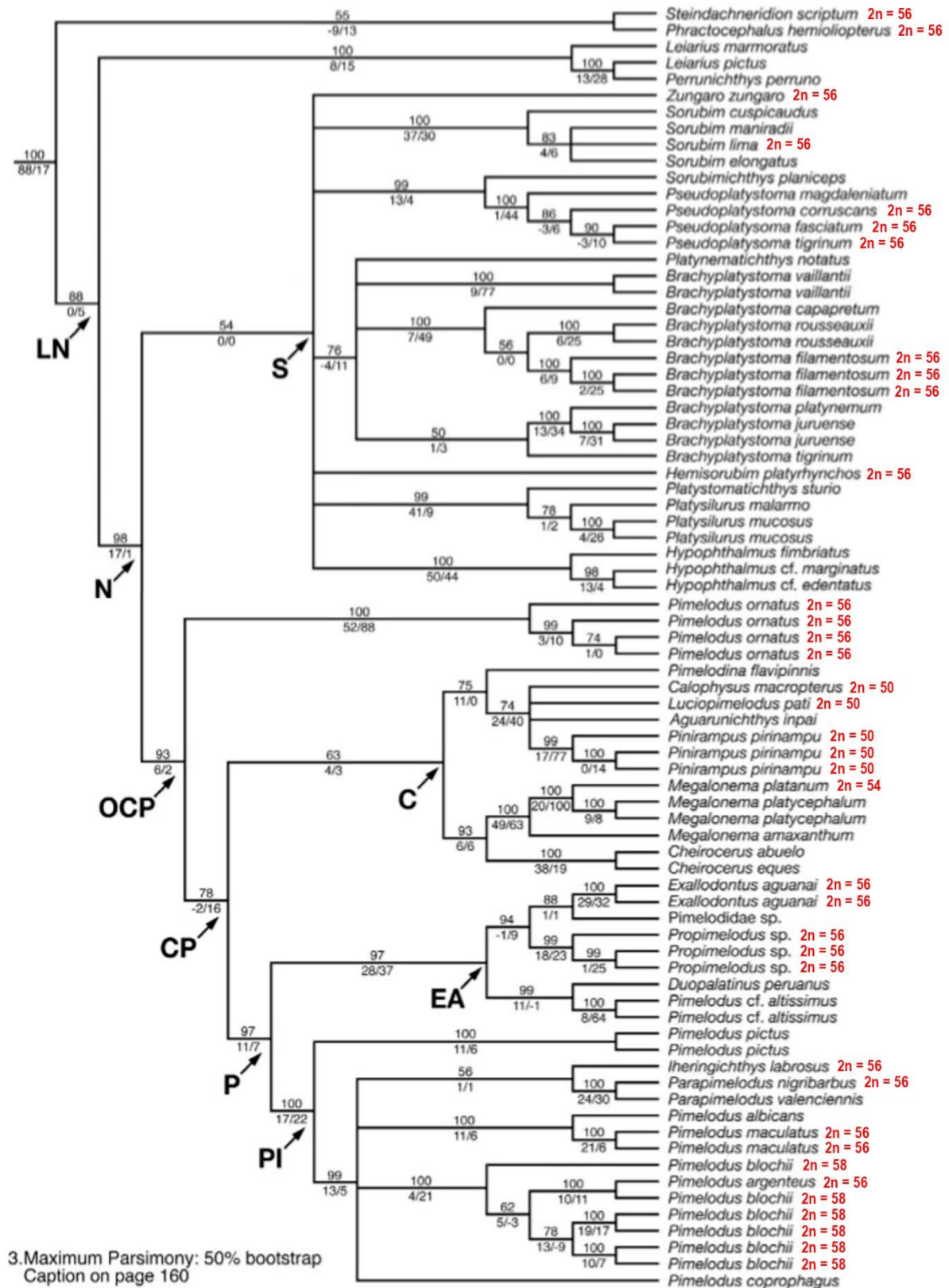
**Figura 1** – Cariótipo com coloração convencional de *Calophysus macropterus* (a), *Propimelodus eigenmanni* (b) e *Exallodontus aguanae* (c). Nos boxes, os pares cromossômicos com Ag-RON, fluorocromo CMA<sub>3</sub>, FISH com sonda de DNAr 18S (sinal verde) e 5S (sinal vermelho). Barra = 10 µm.



**Figura 2** – Cariótipo com bandamento C evidenciando os blocos heterocromáticos de *Calophysus macropterus* (a), *Propimelodus eigenmanni* (b) e *Exallodontus aguanae* (c). Note os pares cromossômicos 21, 26 e 1 em (a), (b) e (c), respectivamente, com bloco heterocromático associado às RONS. Marcações biteloméricas evidentes nos pares 1 e 7 em (b) e (c), respectivamente. Barra = 10 $\mu$ m.



**Figura 3** – Reconstrução do caráter ancestral do número diploide (a) e da localização da Ag-RON (b) na família Pimelodidae. Modelo de reconstrução do estado ancestral utilizado a máxima verossimilhança, sob o modelo de probabilidade MK1 (Markov k-state), no software Mesquite versão 3.0. A reconstrução do caráter ancestral foi estimada a partir da árvore de Máxima Parcimônia de sequências nucleares e mitocondriais, respeitando a regra majoritária de 50% (LUNDBERG et al., 2011). As espécies que não possuem dados citogenéticos são representadas pelos círculos listrados em cinza.



**Figura 4** – Cladograma mostrando as relações filogenéticas na família Pimelodidae, com base em marcadores moleculares (LUNDBERG et al., 2011). Em vermelho os números diploides encontrados na literatura. \*LN = clado *Leiarium-neopimelodines*, N = *neopimelodines*, S = *sorubimines*, OCP = clado *Pimelodus ornatus-Calophysus-Pimelodus*, CP = clado *Calophysus-Pimelodus*, C = *calophysines*, P = *pimelodines*, EA = grupo *Exallodontus-Pimelodus altissimus*, PI = grupo *Pimelodus*.

**Tabela 1** – Dados citogenéticos sobre a família Pimelodidae, atualizados a partir de Swarça et al. (2017).

Família Pimelodidae								
Gênero/Espécie	Localidade	2n	Cariótipo	NF	Ag-RON	18S	5S	Referência
<b>Bergiaria</b>								
<i>B. westermanni</i>	R. São Francisco/MG	56	42m-sm+14st-a	98*	Par 27 st-a, q terminal	-	-	Dias e Foresti (1993)
<b>Brachyplatystoma</b>								
<i>B. filamentosum</i>	R. Araguaia/GO	56	24m+12sm+10st+10a	102*	Par 22 st, p terminal	Par 22 st, p terminal	Par 19 st, p peric	Gonçalves et al. (2014)
<b>Calophysus</b>								
<i>C. macropterus</i>	R. Negro, R. Solimões/AM	50	22m+18sm+10a	90	Par 22 a, p terminal	-	-	Ramirez-Gil et al. (1998)
<i>C. macropterus</i>	R. Solimões/AM	50	20m+20sm+10a	90	Par 21 a, p terminal	Par 21 a, p terminal	Par 19 sm, p terminal e par 21 a, p terminal	Presente estudo
<b>Exallodontus</b>								
<i>E. aguanae</i>	R. Solimões/AM	56	36m+12sm+2st+6a	106	Par 1 m, q intersticial	Par 1 m, q intersticial	Par 1 m, q intersticial	Presente estudo
<b>Hemisorubim</b>								
<i>H. platyrhynchos</i>	R. Paraná/PR	56	22m+18sm+6st+10a	102	Par 18 sm, p terminal	-	-	Martins-Santos et al. (1996)
<i>H. platyrhynchos</i>	R. Paraná, Corrientes/ARG	56	22m+16sm+10st+8a	104	1 par st, p terminal	1 par st, p terminal	-	Swarça et al. (2013)
<i>H. platyrhynchos</i>	R. Miranda/MS	56	22m+16sm+10st+8a	104	1 par st, p terminal	1 par st, p terminal	-	Swarça et al. (2013)
<b>Iheringichthys</b>								
<i>I. labrosus</i>	R. Tibagi/PR (Londrina)	56	32m+8sm+6st+10a	102	1 par st, q, terminal	1 par st, q, terminal	1 par st, q intersticial	Carvalho et al. (2004, 2010)
<i>I. labrosus</i>	R. Tibagi/PR (Res. Capivara)	56	26m+12sm+6st+12a	100*	1 par st, q terminal	1 par st, q terminal	1 par st-a, q terminal	Carvalho e Dias (2005, 2007)
<i>I. labrosus</i>	Res. Jurumirim/SP	56	22m+19sm+10st+6a	108*	Par 23 st, q terminal	-	-	Vissotto et al. (1999b)
<i>I. labrosus</i>	R. Guaraúna/PR	56	14m+32sm+4st+6a	106	Par 16 sm, p terminal	-	-	Ribeiro et al. (2008)
<i>I. labrosus</i>	R. Paraná/ARG	56	42m-sm+14st-a	98	1 par st-a, q terminal	-	-	Sanchez et al. (2014)
<b>Luciopimelodus</b>								
<i>L. pati</i>	R. Paraná, Corrientes/ARG	50	16m+14sm+8st+12a	88	Par 20 a, p terminal	-	-	Sanchez et al. (2010)
<b>Megalonema</b>								
<i>M. platanum</i>	R. Paraná/ARG	54	24m+16sm+2st+12a	96*	Par 15 sm, p terminal	Par 15 sm, p terminal	-	Carvalho et al. (2011)
<i>M. platanum</i>	R. Tibagi/PR	54	24m+16sm+2st+12a	96*	Par 15 sm, p terminal	Par 15 sm, p terminal	-	Carvalho et al. (2011)

<b>Parapimelodus</b>								
<i>P. nigribarbis</i>	Lago Guaíba/RS	56	20m+20sm+4st+12a	100	Par 22 st, q terminal	-	-	Treco et al. (2008)
<b>Phractocephalus</b>								
<i>P. hemiliopterus</i>	Bacia Amazônica/BR	56	16m+20sm+6st+14a	98	Par 23 a, p terminal	1 par st, p	1 par sm, p	Swarça et al. (2017)
<b>Pimelodus</b>								
<i>P. absconditus</i>	R. Paraná, Porto Rico/PR	56	24m+18sm+8st+6a	106	Par 25 st, q terminal	-	-	Borin e Martins-Santos (2002)
<i>P. absconditus</i>	R. Alto Uruguai/RS	56	24m+18sm+8st+6a	106*	Par 24 st, q terminal	Par 24 st, q terminal	Par 18, q peric	Giradi et al. (2018)
<i>P. argenteus</i>	R. Paraguai/MS	56	24m+16sm+12st+4a	108	Par 26 st, p terminal	-	-	Souza et al. (2003)
<i>P. blochii</i>	R. Solimões/AM	58	-	-	-	-	-	Della-Rosa et al. (1980)
<i>P. britskii</i>	R. Iguazu/PR	56	24m+18sm+8st+6a	106	1 par st, q terminal	1 par st, q terminal	1 par st, q terminal e 1 par sm, peric	Moraes-Neto et al. (2011)
<i>P. britskii</i>	R. Iguazú/PR	56	24m+18sm+8st+6a	106*	Par 23 st, q terminal	Par 23 st, q terminal	Par 17sm, q peric; par 23 st, q terminal; par 28 a, q terminal	Giradi et al. (2018)
<i>P. fur</i>	R. São Francisco/MG	54	32m+8sm+6st+8a	100	Par 20 sm, q terminal	Par 20 sm, q terminal	Par 1 m, q intersticial e par 17 sm, q peric	Garcia e Moreira Filho (2005, 2008)
<i>P. fur</i>	R. Mogi, Pardo e da Onça/SP	56	30m+14sm+12a	100	-	-	-	Toledo e Ferrari (1976b)
<i>P. maculatus</i>	R. São Francisco/MG	56	32m+12sm+12st	112	Par 20 sm, q terminal	Par 20 sm, q terminal	Par 1 m, q intersticial; par 17 sm, q terminal e par 21 sm, q peric	Garcia e Moreira Filho (2005, 2008)
<i>P. maculatus</i>	Córrego Congonhas/PR	56	20m+20sm+10st+6a	106	-	-	-	Mazzuchelli et al. (2007)
<i>P. maculatus</i>	R. São Francisco/MG R. MogiGuacu/SP	56	40m-sm+16st-a	96	Par 27 st-a, q terminal	-	-	Dias e Foresti (1993)
<i>P. maculatus</i>	R. Tibagi/PR	56	20m+20sm+10st+6a	106	Par 23 st, q terminal	-	-	Swarça et al. (2001c)
<i>P. maculatus</i>	R. Paranapanema, Jurum. /SP	56	20m+20sm+10st+6a	106*	Par 22 st, q terminal	-	-	Vissotto et al. (1999b)
<i>P. maculatus</i>	R. Paraná, Porto Rico/PR	56	20m+20sm+10st+6a	106	Par 23 st, q terminal	-	-	Borin e Martins-Santos (2002)
<i>P. maculatus</i>	Lago Guaíba/RS	56	24m+20sm+6st+6a	106	Par 24 st, q terminal	-	-	Treco et al. (2008)
<i>P. maculatus</i>	Angatuba/SP	56	24m +22sm+8st+2a	110	Par 21 st, q terminal	Par 21 st, q terminal	1 par st, q terminal	Ferreira et al. (2014)
<i>P. maculatus</i>	Guapiara/SP	56	28m+18sm+4st+6a	106	Par 24 st, q terminal	Par 24 st, q terminal	1 par st, q terminal	Ferreira et al. (2014)
<i>P. maculatus</i>	Res. Três Lagoas/MS	56	20m+22sm+10st+4a	108	Par 25 st, q terminal	Par 25 st, q terminal	1 par st, q terminal	Ferreira et al. (2014)
<i>P. maculatus</i>	Terra Roxa/SP	56	22m+26sm+6st+2a	110	Par 26 st, q terminal	Par 26 st, q terminal	1 par st, q terminal	Ferreira et al. (2014)
<i>P. maculatus</i>	R. Paraguai, Corumbá/MS	56	22m+16sm+10st+8a	104	Par 23 st, q terminal	-	-	Souza et al. (2003)
<i>P. maculatus</i>	R. Ijuí/RS	56	24m+20sm+6st+6a	106*	Par 23 st, q terminal	Par 23 st, q terminal	Par 23 st, q terminal	Giradi et al. (2018)

<i>P. maculatus</i>	R. Mogi, Pardo e da Onça/SP	56	30m+14sm+12a	100	-	-	-	Toledo e Ferrari (1976b)
<i>P. micróstoma</i> ▲	R. Tibagi/PR	56	22m+22sm+6st+6a	106	Par 25 st, q terminal	1 par st, q terminal	-	Souza et al. (2004a, b)
<i>P. microstoma</i> ▲	R. Piquiri, N. Laranjeiras/PR	56	18m+24sm+6st+8a	104	Par 23 st, q terminal	-	-	Treco e Dias (2009)
<i>P. microstoma</i> ▲	R. Mogi-Guaçu, Pirassun. /SP	56	32m+14sm+6st+4a	108	Par 25 st, q terminal	Par 25 st, q terminal	1 par sm, q peric	Ferreira et al. (2014)
<i>P. microstoma</i> ▲	R. Piquiri/PR	56	24m+18sm+8st+6a	106*	Par 24 st, q terminal	Par 24 st, q terminal	Par 18 sm, q peric	Giradi et al. (2018)
<i>P. mysteriosus</i>	R. Paraguai/MS	56	26m+20sm+2st+8a	104	Par 24 st, p terminal	-	-	Souza et al. (2003)
<i>P. mysteriosus</i>	R. Iguaçu/PR	56	28m+10sm+2st+16a	96*	Par 20 st, q terminal	Par 20 st, q terminal	Par 1 m, q inter; pares 21 e 22 a, q peric	Giradi et al. (2018)
<i>P. ornatus</i>	R. Paraná, Porto Rico/PR	56	20m+18sm+8st+10a	102	Par 22 st, p terminal	-	-	Borin e Martins-Santos (2002)
<i>P. ortmanni</i>	R. Iguaçu, Reserv. Caxias/PR	56	24m+18sm+8st+6a	106*	Par 26 st, q terminal	-	-	Borin e Martins-Santos (2004)
<i>P. ortmanni</i>	R. Iguaçu/PR	56	24m+18sm+8st+6a	106*	Par 24 st, q terminal	Par 24 st, q terminal	Par 18 sm, q peric	Giradi et al. (2018)
<i>P. pantaneiro</i> ■	R. Paraguai/MS	56	22m+16sm+10st+8a	104	Par 23 st, q terminal	-	-	Souza et al. (2003)
<i>P. paranaensis</i>	R. Piquiri, N. Laranjeiras/PR	56	22m+22sm+4st+8a	104	Par 24 st, q terminal	-	-	Treco e Dias (2009)
<i>P. paranaensis</i>	R. Piquiri/PR	56	22m+22sm+4st+8a	104*	Par 24 st, q terminal	Par 24 st, q terminal	Pares 13 e 18 sm, q peric; par 26 a, q peric	Giradi et al. (2018)
<i>Pimelodus</i> sp	R. São Francisco/MG	56	40m-sm+16st-a	96	Par 27 st-a, q terminal	-	-	Dias e Foresti (1993)
<i>Pimelodus</i> sp	R. São Francisco/MG	56	32m+12sm+6st+6a	106	Par 20 sm, q terminal	Par 20 sm, q terminal	Par 1 m, q intersticial; par 17 sm, q peric e par 21 sm, q peric	Garcia e Moreira Filho (2005, 2008)
<i>Pimelodus</i> sp	R. Iguaçu/PR	56	24m+26sm+4st+2a	110	Par 26 st, q terminal	1 par st, q terminal	-	Souza et al. (2004a, b)
<i>Pimelodus</i> sp	R. Iguaçu, Reserv. Caxias/PR	56	30m+14sm+8st+4a	108*	Par 26 st, q terminal	-	-	Borin e Martins-Santos (2004)
<i>Pimelodus</i> sp	R. Mogi, Pardo e da Onça/SP	56	30m+14sm+12a	100	-	-	-	Toledo e Ferrari (1976b)
<b><i>Pinirampus</i></b>								
<i>P. pirinampu</i>	R. Paraná/PR	50	22m+12sm+4st+12a	88	Par 21 a, p terminal	-	-	Vasconcelos e Martins-Santos (2000)
<i>P. pirinampu</i>	R. Tibagi/PR	50	26m+12sm+2st+10a	90	Par 20 st, p terminal	Par 20 st, p terminal	-	Swarça et al. (1999, 2001a)
<i>P. pirinampu</i>	R. Paraná, Corrientes/ARG	50	18m+14sm+4st+14a	86	Par 20 a, p terminal	-	-	Sanchez et al. (2010)
<b><i>Propimelodus</i></b>								
<i>P. eigenmanni</i>	R. Solimões/AM	56	28m+20sm+2st+6a	106	Par 26 a, p terminal	Par 26 a, p terminal	Par 17 sm, p terminal	Presente estudo
<b><i>Pseudoplatystoma</i></b>								
<i>P. corruscans</i>	R. Paraná, Porto Rico/PR	56	18m+16sm+10st+12a	100	Par 10 sm, p terminal	-	-	Martins-Santos et al. (1996)
<i>P. corruscans</i>	R. Paraguai/MS	56	20m+16sm+8st+12a	100	1 par a, p terminal	1 par a, p terminal	1 par st, p; 1 homólogo m peric	Swarça et al. (2005a)

<i>P. corruscans</i>	R. Paraná, Jupia/SP R. Paraná/PR	56	26m+10sm+6st+14a	98	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	1 par st, p; 1 homólogo sm subt	Swarça et al. (2005a)
<i>P. corruscans</i>	Bacia do R. Paraguai	56	20m+12sm+12st+12a	100*	Par 18 st, p terminal	Par 18 st, p terminal	1 par st, p peric	Prado et al. (2012)
<i>P. fasciatum</i>	R. Solimões/AM	56	18m+14sm+10st+14a	98	1 par st, p terminal	-	-	Fenocchio e Bertollo (1992)
<i>P. metaense</i>	Laguna de Castillero/BO	56	24m+18sm+14st-a	98	Par 13 sm, p terminal	Par 13 sm, p terminal	1 par sm, p parac	Nirchio et al. (2013)
<i>P. orinicoense</i>	Laguna de Castillero/BO	56	24m+18sm+14st-a	98	Par 13 sm, p terminal	Par 13 sm, p terminal	1 par sm, p parac	Nirchio et al. (2013)
<i>P. reticulatum</i>	Rio Paraguai	56	22m+20sm+6st+8a	104	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	1 par sm, p intersticial	Moraes-Net et al. (2011)
<i>P. reticulatum</i>	Bacia do R. Paraguai	56	20m+12sm+12st+12a	100*	Par 18 st, p terminal	Par 18 st, p terminal	1 par st, p peric	Prado et al. (2012)
<i>P. tigrinum</i>	R. Solimões/AM	56	18m+16sm+8st+14a	98	1 par st, p terminal	-	-	Fenocchio e Bertollo (1992)
<b>Sorubim</b>								
<i>S. lima</i>	R. Paraná, Porto Rico/PR	56	18m+12sm+14st+12a	100	1 par sm, p terminal	-	-	Fenocchio e Bertollo (1992)
<i>S. lima</i>	R. Araguaia, B. do Garças/MT	56	20m+14sm+10st+12a	100	Par 11 sm, p terminal	-	-	Martins-Santos et al. (1996)
<i>S. lima</i>	Rio Paraguai	56	24m+16sm+8st+8a	104	1 par st, p terminal	1 par st, p terminal	1 par sm, p intersticial	Moraes-Net et al. (2011)
<i>S. lima</i>	Rio Paraguai	56	24m+16sm+8st+8a	104	-	1 par st, p terminal	1 par sm, p terminal e peric	Sczepanski et al. (2013)
<b>Steindachneridion</b>								
<i>S. doceanum</i>	R. doce/MG	56	18m+20sm+10st+8a	104*	Par 25, p terminal	-	1 par st, p	Swarça et al. (2018) in press
<i>S. melanodermatum</i> ◆	R. Iguaçú/PR	56	20m+24sm+2st+10a XX 21m+23sm+2st+10a XY	102*	1 par a, p terminal	1 par a, p terminal	Par 23 st, p subt	Swarça et al. (2006, 2008, 2009)
<i>S. melanodermatum</i> ◆	R. Iguaçú/PR	56	14 m+22sm+12st+8a	104	Par 25 a, p terminal	Par 25 a, p terminal	Par 19 st, p subt	Matoso et al. (2011)
<i>S. parahybae</i>	R. Paraíba do Sul/RJ	56	14m+22sm+12st+8a	104	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	1 par sm, p intersticial	Moraes-Net et al. (2011)
<i>S. parahybae</i>	R. Paraíba do Sul/RJ	56	14m+22sm+12st+8a	104	-	-	-	Honji et al. (2016)
<i>S. scripta</i>	R. Paranapanema R. Tibagi/PR	56	24m+20sm+4st+8a	104	1 par a, p terminal	1 par a, p terminal	Par 23 st, p subt	Swarça et al. (2005b, 2008, 2009)
<b>Zungaro</b>								
<i>Z. luetkeni</i> ●	R. Paraná, Foz do Iguaçú/PR	56	26m+10sm+6st+14a	98	Par 15 sm, p terminal	-	-	Martins-Santos et al. (1996)
<i>Z. zungaro</i>	R. Paraná, Jupia/SP	56	32m+6sm+8st+10a	102*	Par 20 st, p terminal	Par 20 st, p terminal	-	Swarça et al. (2001b)

2n: número diploide, NF: número fundamental, Ag-RON: regiões organizadoras de nucléolos coradas com nitrato de prata, 18S: DNA ribossomal 18S, 5S: DNA ribossomal 5S, m: metacêntrico, sm: submetacêntrico, st: subtelocêntrico, a: acrocêntrico, p: braço curto, q: braço longo, peric: pericentromérica, subt: subterminal, crs: cromossomo, R: rio, Res: reservatório, MG: Minas Gerais, GO: Goiás, AM: Amazonas, PR: Paraná, ARG: Argentina, MS: Mato Grosso do Sul, SP: São Paulo, RS: Rio Grande do Sul, BR: Brasil, BO: Bolívia, MT: Mato Grosso, RJ: Rio de Janeiro. \*Número fundamental recalculado no presente trabalho, considerando m, sm e st com dois braços e a com um braço; m-sm com dois braços e st-a com um braço. ▲: Espécie renomeada, anteriormente denominada *Pimelodus heraldoi*. ■: Espécie renomeada, anteriormente denominada *Pimelodus maculatus*. ◆: Espécie renomeada, anteriormente denominada *Steindachneridion* sp.●: Espécie renomeada, anteriormente denominada *Paulicea luetkeni*.

**Tabela 2** – Valores proporcionais das probabilidades em cada nó, estimando qual o provável caráter ancestral na família Pimelodidae (2n e Ag-RON). Reconstrução do estado ancestral utilizado a máxima verossimilhança, sob o modelo de probabilidade Mk1, no software Mesquite versão 3.0.

Família Pimelodidae	Número diploide			Localização Ag-RON		
	Nós	2n=50	2n=54	2n=56	p terminal	q terminal
1	0,020	<b>0,504</b>	<b>0,475</b>	<b>0,995</b>	0,002	0,002
2	0,002	0,028	<b>0,969</b>	<b>0,999</b>	0,000	0,000
3	0,000	0,001	<b>0,998</b>	<b>0,999</b>	0,000	0,000
4	0,000	0,000	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	0,000	0,000
5	0,000	0,000	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	0,000	0,000
6	0,000	0,000	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	0,000	0,000
7	0,000	0,000	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	0,000	0,000
8	0,000	0,000	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	0,000	0,000
9	0,000	0,000	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	0,000	0,000
10	0,000	0,000	<b>0,999</b>	?	?	?
11	0,001	0,008	<b>0,989</b>	<b>0,999</b>	0,000	0,000
12	0,015	0,021	<b>0,962</b>	<b>0,995</b>	0,003	0,001
13	<b>0,327</b>	<b>0,347</b>	<b>0,325</b>	<b>0,999</b>	0,000	0,000
14	<b>0,971</b>	0,014	0,013	<b>0,999</b>	0,000	0,000
15	<b>0,998</b>	0,000	0,000	<b>0,999</b>	0,000	0,000
16	0,000	0,000	<b>0,998</b>	<b>0,911</b>	0,062	0,025
17	0,000	0,000	<b>0,999</b>	<b>0,891</b>	0,022	0,085
18	0,000	0,000	<b>0,999</b>	<b>0,466</b>	<b>0,527</b>	0,005
19	0,000	0,000	<b>0,999</b>	0,020	<b>0,977</b>	0,001
20	0,000	0,000	<b>0,999</b>	<b>0,470</b>	<b>0,525</b>	0,004
21	0,000	0,000	<b>0,999</b>	?	?	?

2n: número diploide, p: braço curto, q: braço longo. Os pontos de interrogação representam os nós onde não foi possível fazer a estimativa, por falta de informação citogenética de alguma espécie presente neste nó. Em vermelho observam-se os maiores valores probabilísticos, indicando o provável caráter ancestral.

## Capítulo 2

**Integração de dados citogenéticos e filogenéticos de *Pimelodella cristata*  
(Siluriformes, Heptapteridae) da bacia Amazônica com inferências evolutivas  
no gênero**

\* Este artigo será submetido à publicação na revista Biological Journal of the  
Linnean Society

---

1 **Integração de dados citogenéticos e filogenéticos de *Pimelodella cristata***  
2 **(Siluriformes, Heptapteridae) da bacia Amazônica com inferências evolutivas no**  
3 **gênero**

4 **Mariana Costa Terra, Fábio Hiroshi Takagui, Joana Neres da Cruz Baldissera,**  
5 **Moema Cristina Costa de Lima, Eliana Feldberg, Ana Lúcia Dias**

6 **Resumo**

7 Dentre os 32 gêneros pertencentes à família Heptapteridae, o gênero *Pimelodella*  
8 tem grande representatividade, sendo o mais abundante em número de espécies,  
9 composto por 82 espécies válidas. As relações entre as espécies deste gênero não  
10 são bem estabelecidas, considerando o número reduzido de análises citogenéticas e  
11 moleculares voltadas para este grupo, deixando dúvidas sobre a taxonomia e  
12 filogenia do gênero *Pimelodella*. O presente estudo traz a primeira caracterização  
13 citogenética de *Pimelodella cristata* coletada na bacia Amazônica e uma análise  
14 integrativa associando dados filogenéticos moleculares com dados citogenéticos,  
15 visando estimar prováveis caracteres ancestrais e condições derivadas dentro do  
16 gênero *Pimelodella*, e assim melhor compreender as relações evolutivas dentro  
17 deste grupo de peixes. *P. cristata* apresentou  $2n=46$  e o cariótipo composto por  
18  $22m+18sm+2st+4a$  (NF=88). A região organizadora de nucléolo (Ag-RON) se  
19 mostrou localizada em um par cromossômico acrocêntrico, correspondente à  
20 constrição secundária, fluorocromo CMA<sub>3</sub> e ao sítio de DNAr 18S. As sequências de  
21 DNAr 5S foram encontradas na posição terminal de dois pares cromossômicos  
22 metacêntricos, não sintênicos ao DNAr 18S. A heterocromatina mostrou-se  
23 distribuída em algumas regiões terminais e intersticiais, além de um evidente bloco  
24 heterocromático no par correspondente à constrição secundária, apresentando um  
25 grande heteromorfismo entre cromossomos homólogos. Os dados aqui  
26 apresentados são os primeiros envolvendo uma espécie da família Heptapteridae na  
27 bacia Amazônica, a qual exibiu algumas características particulares geralmente não  
28 encontradas na literatura.

29 **Palavras-chave:** Citocromo Oxidase I, DNAs ribossomais, evolução cariotípica,  
30 relações filogenéticas

## 1 Introdução

2 A família Heptapteridae é um grupo monofilético pertencente à ordem  
3 Siluriformes, composta por 3.891 espécies distribuídas em 39 famílias (Eschmeyer &  
4 Fong, 2018). São consideradas válidas 218 espécies de heptapterideos (Eschmeyer  
5 & Fong, 2018), entretanto, menos da metade delas foram estudadas  
6 citogeneticamente.

7 Nesta família observa-se uma variação cariotípica desde  $2n$  igual a 42 em  
8 *Imparfinis hollandi* Haseman, 1911 (Margarido & Moreira-Filho, 2008) até 58 em  
9 *Imparfinis schubarti* (Gomes, 1956) (Kantek *et al.*, 2009) e em *Rhamdia quelen*  
10 (Quoy & Gaimard, 1824) (Garcia & Almeida-Toledo, 2010). Dentro desta família, as  
11 espécies do gênero *Pimelodella*, objeto deste estudo, mostram que  $2n=46$  é  
12 bastante comum neste grupo de peixes, mas também é possível encontrar números  
13 diploides diferentes como  $2n=50$  em *Pimelodella* cf. *chagresi* (Steindachner, 1876);  
14  $2n=52$  em *Pimelodella* aff. *avanhandavae*, *P. avanhandavae* Eigenmann, 1917,  
15 *Pimelodella* sp 2 e *P. taenioptera* Miranda Ribeiro, 1914 e  $2n=58$  em *P. australis*  
16 Eigenmann, 1917, *P. kronei* (Miranda Ribeiro, 1907), *P. lateristriga* (Lichtenstein,  
17 1823) e *P. transitória* Miranda Ribeiro, 1907 (Tabela 1).

18 Essa variabilidade no número diploide na família Heptapteridae e no gênero  
19 *Pimelodella*, pode ser resultado de rearranjos cromossômicos que ocorreram  
20 durante a evolução cariotípica, tais como fusões e fissões (Borba *et al.*, 2012;  
21 Conde-Saldaña *et al.*, 2017).

22 Marcadores cito-moleculares vem sendo utilizados nos estudos de  
23 caracterização citogenética de espécies de *Pimelodella*, utilizando sondas de DNA  
24 ribossomal 18S e de DNA ribossomal 5S (Tabela 1). A sintonia dos dois genes  
25 ribossomais não é um evento comum, sendo observada apenas em *Pimelodella*

1 *gracilis* (Valenciennes, 1835) e *Pimelodella*. cf. *chagresi* (Garcia & Almeida-Toledo,  
2 2010; Conde-Saldaña *et al.*, 2017, respectivamente).

3 As relações filogenéticas dentro da família Heptapteridae ainda não são  
4 totalmente bem definidas, com base em caracteres morfológicos foi estabelecido  
5 que *Pimelodella* é um dos gêneros basais, junto com *Brachyrhamdia* e *Goeldiella*  
6 (FERRARIS, 1988; LUNDBERG, 1991, BOCKMANN e MIQUERALENA, 2008).  
7 Peixoto (2011) traz uma árvore filogenética baseada em genes mitocondriais,  
8 agrupando algumas espécies de *Pimelodella* de diferentes bacias e microbacias  
9 entretanto, ainda são escassas as informações disponíveis na literatura que  
10 esclareçam dúvidas relacionadas à sistemática do gênero *Pimelodella*.

11 Até o momento, nenhuma espécie do gênero *Pimelodella* da bacia amazônica  
12 foi analisada citogeneticamente, bem como não há hipóteses filogenéticas  
13 envolvendo espécies desta região, constituindo fatores limitantes para elucidação de  
14 relações evolutivas. Como uma contribuição ao conhecimento, o objetivo deste  
15 estudo foi analisar citogeneticamente uma espécie de peixe da família  
16 Heptapteridae, *Pimelodella cristata* (Müller & Troschel, 1849), coletada no rio  
17 Solimões, bacia Amazônica e comparar o padrão cariotípico com as demais  
18 espécies do gênero já descritas na literatura. Além disto, o presente estudo busca  
19 realizar uma análise filogenética prévia no gênero *Pimelodella*, integrando dados  
20 citogenéticos e moleculares para determinação de alguns padrões cromossômicos  
21 ancestrais. Desta forma espera-se uma maior compreensão dos processos  
22 evolutivos e das relações filogenéticas neste grupo de peixes.

## 1 **Material e métodos**

### 2 **Material e local de coleta**

3 Foram analisados 5 espécimes, de sexo não identificado, de *Pimelodella*  
4 *cristata* (Müller & Troschel, 1849), coletados no rio Solimões, pertencente à bacia  
5 Amazônica: município de Iranduba/AM S 3 17' 30.40" O 60 11' 22.69".

6 As coletas foram realizadas utilizando tarrafa e rede de arrasto. O material  
7 foi processado e fixado no Laboratório de Genética Animal do Instituto Nacional de  
8 Pesquisas da Amazônia (INPA) e as análises citogenéticas foram realizadas no  
9 laboratório de Citogenética Animal da Universidade Estadual de Londrina. Os  
10 exemplares foram identificados e depositados no Museu de Zoologia da  
11 Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), voucher: MZUEL-Peixes 17796.

### 12 **Extração de DNA**

13 Para a extração do DNA foi utilizado o tecido muscular de quatro indivíduos  
14 de *Pimelodella cristata*, seguindo o protocolo proposto por Sambrook *et al.* (1989)  
15 com modificações. As amostras de DNA extraídas foram eluídas em 50ng/μL,  
16 quantificadas em sistema NanoDrop e a integridade do DNA foi verificada em gel de  
17 agarose 1% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e visualizado sob  
18 luz de Led. As amostras foram armazenadas a -20°C.

### 19 **Preparação de cromossomos e coloração convencional**

20 Foi realizada uma indução mitótica 48 horas antes da eutanásia dos peixes,  
21 por meio de um lisado bacteriano injetado na região intraperitoneal (2 ml), de acordo  
22 com Molina *et al.* (2010). A obtenção dos cromossomos mitóticos foi realizada a

1 partir da técnica de preparação direta proposta por Bertollo *et al.* (1978) e para a  
2 análise deste material as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5% por 8  
3 minutos.

4 A montagem do cariótipo foi realizada com o auxílio do programa Adobe  
5 Photoshop CS6, a partir da classificação cromossômica proposta por Levan *et al.*  
6 (1964), com algumas modificações, considerando cromossomos metacêntricos,  
7 submetacêntricos e subtlocêntricos com dois braços e cromossomos acrocêntricos  
8 com um braço para cálculo do número fundamental (NF).

#### 9 **Bandamentos cromossômicos e Hibridação Fluorescente *in situ***

10 Para a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo ativas (Ag-RONs)  
11 foi aplicada a técnica de impregnação por nitrato de prata, proposta por Howell &  
12 Black (1980). Para a determinação do padrão de distribuição da heterocromatina foi  
13 realizada a técnica de bandamento C de acordo com Sumner (1972), com  
14 modificação na etapa de coloração, ocorrendo substituição da solução de Giemsa  
15 pelo fluorocromo Iodeto de Propídeo, proposto por Lui *et al.* (2012). As regiões ricas  
16 em pares de bases GC e AT foram identificadas utilizando os fluorocromos  
17 cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4'-6-diamidino-2 fenilindol (DAPI), respectivamente, a  
18 partir da técnica de Schweizer (1980).

19 A técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada de acordo  
20 com Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000) com modificações, utilizando as  
21 sondas de DNAr 18S isolada de *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829  
22 (Hatanaka & Galetti, 2004) e de DNAr 5S isolada de *Pimelodella cristata* utilizando o  
23 par de *primers*: A – 5' TACGCCGATCGTCCGATC 3' e B – 5'  
24 CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC 3' (Martins & Galetti, 1999). Para isso foi realizada

1 a reação de PCR contendo 36,5 µl de água ultra pura; 5 µl de buffer 10x; 2 µl de  
2 MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 1 µl de dNTP mix 10mM; 2 µl de iniciador A (10 µM) e 2 µl do iniciador  
3 B (10 µM); 1 µl de DNA molde (100ng) e 0,5 µl de Taq polimerase (5U/ µl).

4 O perfil das reações de PCR iniciou pelas etapas de desnaturação inicial de  
5 2 min a 94°C seguido por 35 ciclos de 94°C por 45 seg, anelamento a 60°C por 30  
6 seg e extensão a 72°C por 30 seg, seguido por uma etapa final de extensão de 5  
7 minutos a 72°C.

8 A sonda de DNAr 18S (aproximadamente 1800 pb) foi marcada com biotina-  
9 14-dATP por nick translation e detectada com avidina-FITC, enquanto a sonda de  
10 DNAr 5S (200 pb) foi marcada com Cy3-AP3-dUTP (marcação direta). Os  
11 cromossomos foram contracolorados com DAPI.

12 Para a análise das lâminas foi utilizado um microscópio de epifluorescência  
13 (Leica DM2000) acoplado a uma câmera digital (MoticamPro 282B) e, por meio do  
14 software Motic Images Advanced, versão 3.2, as imagens foram capturadas.

### 15 **Amplificação da região COI, sequenciamento e edição das sequências**

16 A amplificação da sequência do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I  
17 (COI) foi realizada por meio da técnica de PCR, a partir do DNA total de quatro  
18 indivíduos de *Pimelodella cristata* utilizando os *primers*: FishF1 – 5'  
19 TCAACCAACCACAAAGACATTG 3' e FishR1 – 5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAG  
20 3' (Ward *et al.*, 2005). A reação de 25 µl continha: 10,5 µl de água ultra pura; 12,5 µl  
21 de kit de PCR GoTaq Green Master Mix; 0,5 µl de iniciador *forward* e 0,5 do *reverse*  
22 e 1 µl de DNA molde (100ng). O perfil das reações de PCR seguiu as etapas de:  
23 desnaturação inicial de 5 min a 94°C seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 seg,

1 anelamento a 48°C por 30 seg e extensão a 72°C por 1 min, seguido por uma etapa  
2 final de extensão de 10 minutos a 72°C.

3 Após a amplificação, foi realizado um gel de agarose 1% e a purificação dos  
4 produtos da PCR com o kit de Purificação PCR ExoSAP-IT GE Helthcare Bio-  
5 Sciences Ltd, seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida foi realizada a reação  
6 de BigDye, a purificação e o sequenciamento das quatro amostras de DNA de  
7 *Pimelodella cristata* com o sequenciador automático ABI-PRISM 3500 XL (Applied  
8 Biosystems).

9 A qualidade das sequências foi conferida por meio do aplicativo  
10 Electropherogram Quality Analysis (Togawa & Brigido, 2003), disponível online. Foi  
11 realizado o cálculo de distância entre espécies no programa MEGA v. 6.0 (Tamura *et*  
12 *al.*, 2013), considerando o modelo de Kimura 2-parameters (Kimura, 1980). A partir  
13 deste mesmo programa, o conjunto de dados foi editado e alinhado, resultando em  
14 um fragmento final de 637 pb.

### 15 **Construção da árvore filogenética**

16 As sequências do COI de *Pimelodella cristata* aqui obtidas pelo  
17 sequenciamento, juntamente com mais 12 sequências encontradas no banco de  
18 dados BOLD Systems (Barcode of Life Data System) (Tabela 2) foram utilizadas  
19 para construção da árvore consenso.

20 Para a inferência das relações evolutivas entre as espécies do gênero  
21 *Pimelodella* (considerando sequências fornecidas pelo banco de dados e a  
22 sequência de *Pimelodella cristata*) foram utilizadas como grupo externo as espécies

1 *Imparfinis mirini* Haseman, 1911 e *Cetopsorhamdia iheringi* Schubart & Gomes,  
2 1959.

3 As inferências Bayesianas (BI) e as análises de Máxima Verossimilhança  
4 (ML) foram estimadas no Portal CIPRES Science Gateway v. 3.1 (Miller *et al.*, 2010),  
5 a partir do melhor modelo evolutivo TIM3 + gamma, gerado pelo programa  
6 jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008) considerando o valor AIC (Akaike Information  
7 Criterion). O programa Figtree v1. 4. 2 foi usado para editar e salvar as árvores  
8 bayesianas (BI) e de máxima verossimilhança (ML), que foram concatenadas  
9 resultando numa árvore consenso. Para isso, foram empregados os arquivos  
10 infile.nex.con.tre (para abrir a árvore bayesiana) e o arquivo  
11 RAxML\_bipartitions.result (para abrir a árvore de máxima verossimilhança), ambos  
12 gerados no CIPRES.

### 13 **Reconstrução do caráter citogenético ancestral**

14 Para a reconstrução do caráter citogenético ancestral no gênero *Pimelodella*  
15 foi utilizada a árvore filogenética molecular de Máxima Verossimilhança (ML), baseada  
16 em sequências moleculares do gene mitocondrial COI. Foi construída uma matriz  
17 composta por 13 táxons, incluindo o grupo externo composto por *Imparfinis mirini* e  
18 *Cetopsorhamdia iheringi*.

19 O caráter ancestral tanto do número diploide (2n) quanto da localização da  
20 Ag-RON foi estimado seguindo o modelo de reconstrução de máxima  
21 verossimilhança, sob o modelo de probabilidade Mk1 (Markov k-state) no software  
22 Mesquite, versão 3.0 (Maddison & Maddison, 2014). Para cada nó foi estimado o  
23 provável caráter ancestral, observado em vermelho na Tabela 3, considerando os  
24 caracteres número diploide e localização da Ag-RON.

## 1 **Resultados**

### 2 **Análises cromossômicas**

3           A espécie *Pimelodella cristata* apresentou  $2n=46$  com fórmula cariotípica de  
4  $22m+18sm+2st+4a$  e  $NF=88$  (Figura 1a). Foi possível observar uma constrição  
5 secundária na região terminal do braço curto do par acrocêntrico 22, coincidente  
6 com a marcação da Ag-RON, sendo  $CMA_3$  positiva (Figura 1a, box), evidenciando  
7 um heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos.

8           Muitas marcações heterocromáticas foram encontradas, distribuídas nas  
9 regiões terminais e intersticiais dos cromossomos. Um bloco heterocromático bem  
10 evidente, correspondente à constrição secundária foi observado no braço curto do  
11 par acrocêntrico 22 (Figura 1b).

12           *Pimelodella cristata* apresentou apenas um par cromossômico portador do  
13 gene ribossomal 18S, confirmando a RON detectada pela técnica de impregnação  
14 por nitrato de prata (Figura 1a, box), assim como heteromorfismo entre  
15 cromossomos homólogos.

16           Foram encontrados quatro sítios do gene ribossomal 5S, localizados na  
17 posição terminal do braço curto de cromossomos metacêntricos (Figura 1a, box).

### 18 **Filogenia Molecular**

19           A árvore consenso que apresenta a relação evolutiva entre espécies do gênero  
20 *Pimelodella* traz em preto os valores de verossimilhança (que vão de 0 à 100%) e, em  
21 vermelho, os valores bayesianos (que vão de 0,0 à 1) como observado na Figura 2.

22           Tanto a árvore de Inferência Bayesiana (BI) quanto a árvore de Máxima  
23 Verossimilhança (ML) deram origem aos mesmos agrupamentos, informando que, o  
24 gênero monofilético é composto por dois grandes clados, suportado pelos altos valores

1 ML=100% e BI=1.

2 A espécie *P. cristata* aparece evolutivamente mais próxima ao clado formado  
3 pelas espécies: *P. meeki* Eigenmann, 1910, *P. gracilis*, *P. vittata* (Lütken, 1874) e *P.*  
4 *enochi* Fowler, 1941, que apresenta um valor de suporte moderado (ML=78% e  
5 BI=0,63), considerando 50% no valor de *bootstrap*. Já o segundo clado é formado  
6 pelas espécies *P. lateristriga*, *P. laticeps* Eigenmann, 1917, *P. avanhandavae*, *P.*  
7 *parnahybae* Fowler, 1941, *P. chagresi* e *Pimelodella* sp, sendo este um clado mais  
8 distante da espécie *P. cristata* (Figura 2).

### 9 **Estimativa do caráter citogenético ancestral no gênero *Pimelodella***

10 O primeiro caráter a ser analisado foi o número diploide ancestral dentro do  
11 gênero *Pimelodella*. O resultado sugere que o provável caráter ancestral dentro do  
12 grupo é  $2n=46$  ou  $2n=58$ , suportado por valores probabilísticos semelhantes (47% e  
13 42% - Tabela 3). Em contrapartida, sabe-se que o número diploide igual a 50 é uma  
14 condição derivada presente na espécie *Pimelodella chagresi* (Figura 3a), que surgiu  
15 a partir do nó 9.

16 Outro caráter analisado dentro do gênero foi a posição da Ag-RON cujo  
17 estado ancestral mais provável está na porção terminal do braço curto, devido ao  
18 alto valor probabilístico no nó ancestral (78%), observado na Tabela 3. O único  
19 caráter derivado foi observado em *Pimelodella vittata*, que apresentou este sítio na  
20 porção terminal do braço longo (Figura 3b), surgindo a partir do nó 4.

## 1 **Discussão**

### 2 **Dados cariotípicos**

3           Dentro do gênero *Pimelodella*, o número diploide igual a 46 é  
4 frequentemente relatado, como neste estudo em *Pimelodella cristata*, porém, valores  
5 de  $2n=50$ , 52 e 58 também vêm sendo observados, confirmando uma variabilidade  
6 cariotípica neste grupo de peixes (Tabela 1), demonstrando que rearranjos  
7 cromossômicos do tipo fusões ou fissões estão ocorrendo durante a sua evolução  
8 cariotípica, assim como na família Heptapteridae (Borba *et al.*, 2012; Gouveia *et al.*,  
9 2013). Essa variabilidade no número diploide em *Pimelodella* pode ser um marcador  
10 cromossômico para caracterização das espécies deste gênero, como considerado  
11 por Gouveia *et al.* (2013).

12           Além da variação no número diploide, variações na fórmula cariotípica  
13 também podem ser observadas entre diferentes populações de espécies de  
14 *Pimelodella* (Tabela 1), resultado de rearranjos cromossômicos estruturais como  
15 inversões e/ou translocações (Garcia & Almeida-Toledo, 2010).

16           Dentro do gênero *Pimelodella*, a localização das RONS em um par  
17 cromossômico, geralmente submetacêntrico, na posição terminal do braço curto é  
18 mais frequente, como pode ser observado na Tabela 1. Entretanto, podem ocorrer  
19 variações em relação ao tipo cromossômico portador da RON, localizada também  
20 em cromossomos do tipo metacêntrico ou subteloicêntrico, como em *Pimelodella aff.*  
21 *avanhandavae*, *P. gracilis* e *P. avanhandavae* (Tabela 1). No presente estudo, a  
22 espécie *P. cristata* exibiu a constrição secundária em um par de cromossomos  
23 acrocêntricos, sendo este o par portador da RON. Até o momento, apenas *P.*  
24 *avanhandavae* analisada por Fernandes *et al.* (2013) tinha apresentado a RON em  
25 cromossomos deste tipo.

1 A presença de RONS na posição terminal no braço longo foi observada em  
2 poucas espécies como *P. meeki*, *P. avanhandavae* e *P. vittata* (Tabela 1), podendo  
3 ser resultante de rearranjos cromossômicos como inversões pericêntricas. Apenas  
4 um caso de RONS múltiplas foi observado neste gênero, em *P. avanhandavae* que  
5 apresentou dois pares cromossômicos portadores destas regiões, sendo um deles  
6 do tipo subteloentrico e o outro, acrocêntrico (Fernandes *et al.*, 2013).

7 A espécie *P. cristata* apresentou um evidente heteromorfismo de tamanho  
8 da RON entre os cromossomos homólogos, resultado de um processo de  
9 acumulação deste gene ribossomal, podendo este ser um marcador específico para  
10 a espécie. Vidotto *et al.* (2004) analisando a espécie *P. meeki* também evidenciaram,  
11 em algumas metáfases, um grande heteromorfismo de tamanho entre os  
12 cromossomos homólogos portadores da Ag-RON.

13 Desta forma, as variações relacionadas às RONS também podem ser muito  
14 importantes para a caracterização e a diferenciação das espécies, seja com relação  
15 à quantidade ou posição deste marcador, podendo ou não ocorrer heteromorfismo  
16 entre os cromossomos homólogos portadores dessas regiões.

17 Independente da sua localização, as RONS no gênero *Pimelodella*  
18 comumente exibem uma correspondência com o fluorocromo CMA<sub>3</sub> (Garcia &  
19 Almeida-Toledo *et al.*, 2010; Dazzani *et al.*, 2012; Gouveia *et al.*, 2013; Barbosa *et*  
20 *al.*, 2015), sendo esta uma região com grande quantidade de pares de bases GC,  
21 intercaladas aos genes ribossomais, como observado em *P. cristata*.

22 As análises realizadas no gênero mostram sítios de DNAr 18S localizados  
23 em apenas um par cromossômico, confirmando a conservação do padrão simples  
24 das Ag-RONS (Tabela 1). Este mesmo padrão se manteve em *P. cristata*, sendo  
25 possível observar o heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos,

1 resultado de um processo de acumulação deste gene ribossomal.

2 Na maioria das espécies do gênero *Pimelodella* o DNAr 5S aparece em  
3 apenas um par cromossômico, porém, algumas espécies como *Pimelodella* cf.  
4 *chagresi*, *P. gracilis*, *P. spelaea* Trajano, Reis & Bichuette, 2004, duas populações  
5 de *Pimelodella* sp e *P. cristata* neste estudo, apresentaram mais de um par portador  
6 deste gene (Tabela 1).

7 Há uma variação em relação à posição dos sítios de DNAr 5S, observados  
8 tanto em posição terminal quanto intersticial, de braço curto ou longo (Tabela 1).  
9 Entretanto, a localização mais relatada no gênero *Pimelodella* destes sítios  
10 ribossomais é na região terminal do braço curto, como ocorre em *Pimelodella*  
11 *cristata*.

12 Segundo Martins & Galleti-Jr (1999) a localização do DNAr 5S na região  
13 intersticial é encontrado na maioria dos peixes, sendo este um provável caráter  
14 ancestral, portanto, espécies que apresentam este sítio na porção terminal  
15 provavelmente devem ter passado por um processo de rearranjo cromossômico do  
16 tipo inversão. É difícil estimar qual o caráter ancestral neste caso, pois poucas  
17 espécies do gênero *Pimelodella* apresentam resultados de DNAr 5S e, por este  
18 motivo, não é possível traçar a linha evolutiva deste caráter, desta forma não  
19 podemos afirmar se *P. cristata* passou por um processo de rearranjo que resultou na  
20 posição terminal deste sítio.

21 Geralmente, o padrão de distribuição da heterocromatina no gênero  
22 *Pimelodella* não apresenta muitas variações, caracterizado por poucas e fracas  
23 marcações, com localização em regiões pericentroméricas e terminais dos  
24 cromossomos (Vasconcelos & Martins-Santos, 2000; Swarça *et al.*, 2003; Dazzani *et*  
25 *al.*, 2012; Gouveia *et al.*, 2013; Kantek *et al.*, 2015; Conde-Saldaña *et al.*, 2017).

1 *Pimelodella cristata* não seguiu este padrão e mostrou uma quantidade maior de  
2 heterocromatina, apresentando a RON totalmente heterocromática, sendo  
3 características marcantes para a espécie. Além disto, esta espécie também  
4 apresentou alguns blocos heterocromáticos intersticiais, característica esta  
5 encontrada apenas em duas populações de *Pimelodella gracilis* (Garcia & Almeida-  
6 Toledo, 2010; Fernandes *et al.*, 2013).

7 Este estudo é o primeiro relato citogenético de *Pimelodella cristata* na região  
8 Amazônica e os resultados mostram que esta espécie apresenta características  
9 particulares não descritas frequentemente na literatura resultado, provavelmente, de  
10 alterações genéticas que podem estar ocorrendo ao longo da história evolutiva desta  
11 espécie.

## 12 **Relações Filogenéticas e Reconstrução de caráter citogenético ancestral**

13 Dentro da família Heptapteridae o gênero *Pimelodella* tem grande  
14 representatividade, composto por 82 espécies descritas (Eschmeyer & Fong, 2018)  
15 entretanto, em relação ao gene mitocondrial COI, apenas 10 possuem sequências  
16 depositadas no banco de dados, até o momento, sendo este o marcador molecular  
17 com maior número de sequências.

18 Considerando a análise filogenética prévia realizada neste estudo, observa-  
19 se o agrupamento das espécies do gênero *Pimelodella* em dois grandes clados,  
20 onde *Pimelodella cristata* aparece mais próxima às espécies *P. meeki*, *P. gracilis*, *P.*  
21 *vittata* e *P. enochi* porém, este agrupamento é suportado por um valor probabilístico  
22 moderado (ML=78% e BI=0,63) como mostra a Figura 2. Este valor moderado  
23 provavelmente é resultado da pouca quantidade de espécies disponíveis no banco  
24 de dados e, por este motivo, muitas espécies que poderiam estar entre *Pimelodella*

1 *cristata* e as demais espécies deste clado, não estão ali representadas, havendo  
2 uma lacuna de informações entre elas.

3 Este padrão se repete no segundo clado, formado por *Pimelodella*  
4 *lateristriga*, *P. laticeps*, *P. avanhandavae*, *P. parnahybae*, *P. chargresi* e *Pimelodella*  
5 sp, que apresenta um valor de suporte ainda mais baixo (ML=48% e BI=0,9),  
6 enfatizando que estas espécies foram agrupadas, mas não são tão próximas assim  
7 (Figura 2).

8 Peixoto (2011) também trouxe uma análise filogenética do gênero  
9 *Pimelodella*, a partir de 4 genes mitocondriais e do método da Máxima Parcimônia  
10 (MP), utilizando espécies e populações de diferentes bacias hidrográficas brasileiras.  
11 A autora também evidenciou a divisão das espécies em dois grandes clados,  
12 separando as espécies provenientes da bacia do Paraná e Paraguai daquelas  
13 provenientes da bacia Amazônica e do Prata. Entretanto, as espécies utilizadas por  
14 Peixoto (2011) diferem, em sua grande maioria, das espécies do presente trabalho,  
15 sendo difícil uma comparação.

16 Neste estudo, apesar do número de espécies e marcadores moleculares não  
17 serem suficientes para estabelecer uma análise filogenética mais abrangente, pode-  
18 se fazer uma análise prévia e evidenciar o agrupamento das espécies em dois  
19 clados, sendo clara a relação de *Pimelodella cristata* dentro de um dos grupos.

20 Associando esta análise molecular aos dados citogenéticos de *Pimelodella*  
21 *cristata* e demais espécies de *Pimelodella* descritos na literatura, foi possível  
22 estabelecer uma representação probabilística das relações ancestral/derivado,  
23 considerando caracteres como número diploide e localização da Ag-RON.

24 O primeiro caráter a ser analisado foi o número diploide ancestral dentro do  
25 gênero *Pimelodella*. Observando a Figura 3a, não se pode afirmar qual o 2n

1 ancestral neste grupo de peixes, pois os resultados sugerem que  $2n=46$  ou  $2n=58$   
2 são os mais prováveis, com valores probabilísticos semelhantes, 47% e 42%,  
3 respectivamente.

4 Borba *et al.* (2012) sugerem  $2n=58$  como caráter basal em Heptapterídeos,  
5 considerando apenas a frequência deste  $2n$  na família. Com base nesta hipótese  
6 Gouveia *et al.* (2013) sugerem que o gênero *Pimelodella*, junto com o gênero  
7 *Imparfinis*, são grupos onde rearranjos cromossômicos podem estar ocorrendo, uma  
8 vez que possuem variações no  $2n$ . Seguindo nossos resultados, não podemos  
9 afirmar se o gênero *Pimelodella* está mantendo o  $2n$  basal, primeiro por não saber  
10 ao certo qual é o número diploide ancestral dentro da família Heptapteridae e,  
11 segundo por não conseguir estimar qual o  $2n$  ancestral dentro do gênero  
12 *Pimelodella*.

13 Considerando o gênero *Pimelodella*, o clado onde *Pimelodella cristata* está  
14 inserida apresenta o  $2n=46$  como número diploide ancestral, com base em um alto  
15 valor probabilístico (89%), representado pelo nó 3, como observado na Tabela 3,  
16 clado este que aparentemente se mostra mais conservado. No segundo clado  
17 observam-se variações do número diploide: *P. lateristriga* apresenta  $2n=58$ , *P.*  
18 *chagresi* apresenta  $2n=50$  e *P. avanhandavae* apresenta  $2n=46$  (Figura 3a).

19 Esta variação no  $2n$  é resultado de possíveis rearranjos cromossômicos  
20 estruturais do tipo fusões ou fissões (Borba *et al.*, 2012; Gouveia *et al.*, 2013),  
21 ocorrendo com maior frequência neste segundo clado. Como não é possível  
22 estabelecer o  $2n$  ancestral, não se pode afirmar se ao longo da história evolutiva  
23 destas espécies o número diploide está tendendo a aumentar ou diminuir.

24 Em relação à posição das Ag-RONs, o caráter ancestral está localizado na  
25 porção cromossômica terminal do braço curto (Figura 3b), com um valor

1 probabilístico de 78% (Tabela 3). Este valor é mais alto considerando o nó ancestral  
2 do gênero *Pimelodella* (96%), representado pelo nó 2. Este padrão de Ag-RONs  
3 parece ser bastante conservado dentro do grupo, observado em praticamente todas  
4 as espécies analisadas até o momento (valores acima de 92%).

5 A única variação foi encontrada em *Pimelodella vittata*, que apresentou este  
6 sítio localizado na região terminal do braço longo, sendo esta uma condição  
7 derivada dentro do gênero *Pimelodella*, que surgiu a partir do nó 4. Possivelmente  
8 esta variação é resultado de rearranjos cromossômicos estruturais, do tipo inversão  
9 pericêntrica.

10 A tendência evolutiva em *Pimelodella cristata* manteve o padrão  
11 frequentemente relatado de  $2n=46$  encontrado no clado onde está inserida e o  
12 padrão de Ag-RONs simples, p terminal. Estas características também são  
13 frequentemente encontradas em outras espécies do gênero *Pimelodella* (Garcia &  
14 Almeida-Toledo, 2010; Dazzani *et al.*, 2012; Conde-Saldaña *et al.*, 2017). Os  
15 rearranjos cromossômicos estruturais que aparecem na filogenia como uma provável  
16 condição derivada não estão presentes nesta espécie, considerando os caracteres  
17 aqui inferidos.

18 É possível que uma evolução cromossômica divergente tenha ocorrido entre  
19 estes dois grandes clados do gênero *Pimelodella* (Figura 3), pois tais grupos  
20 parecem manter padrões diferentes entre eles: o primeiro clado mostra um padrão  
21 conservado enquanto o segundo apresenta caracteres derivados. A tendência  
22 evolutiva do sítio Ag-RON não parece estar diretamente relacionada com a variação  
23 do  $2n$ , pois a única variação encontrada, em *P. vittata*, ocorre justamente no clado  
24 onde o  $2n=46$  mantém-se mais conservado.

25 Neste estudo foi realizada uma análise integrada de dados citogenéticos

1 com filogenéticos moleculares, mostrando uma complementariedade entre eles. A  
2 filogenia molecular agrupou as espécies em dois clados e este padrão se manteve  
3 com os dados citogenéticos ancestrais ( $2n$  e Ag-RON), com algumas variações.  
4 Estes resultados mostram a importância da integração de marcadores moleculares e  
5 citogenéticos para estabelecimento de caracteres cromossômicos ancestrais e os  
6 processos evolutivos envolvidos, ressaltando a necessidade de mais estudos  
7 voltados para este grupo de peixes.

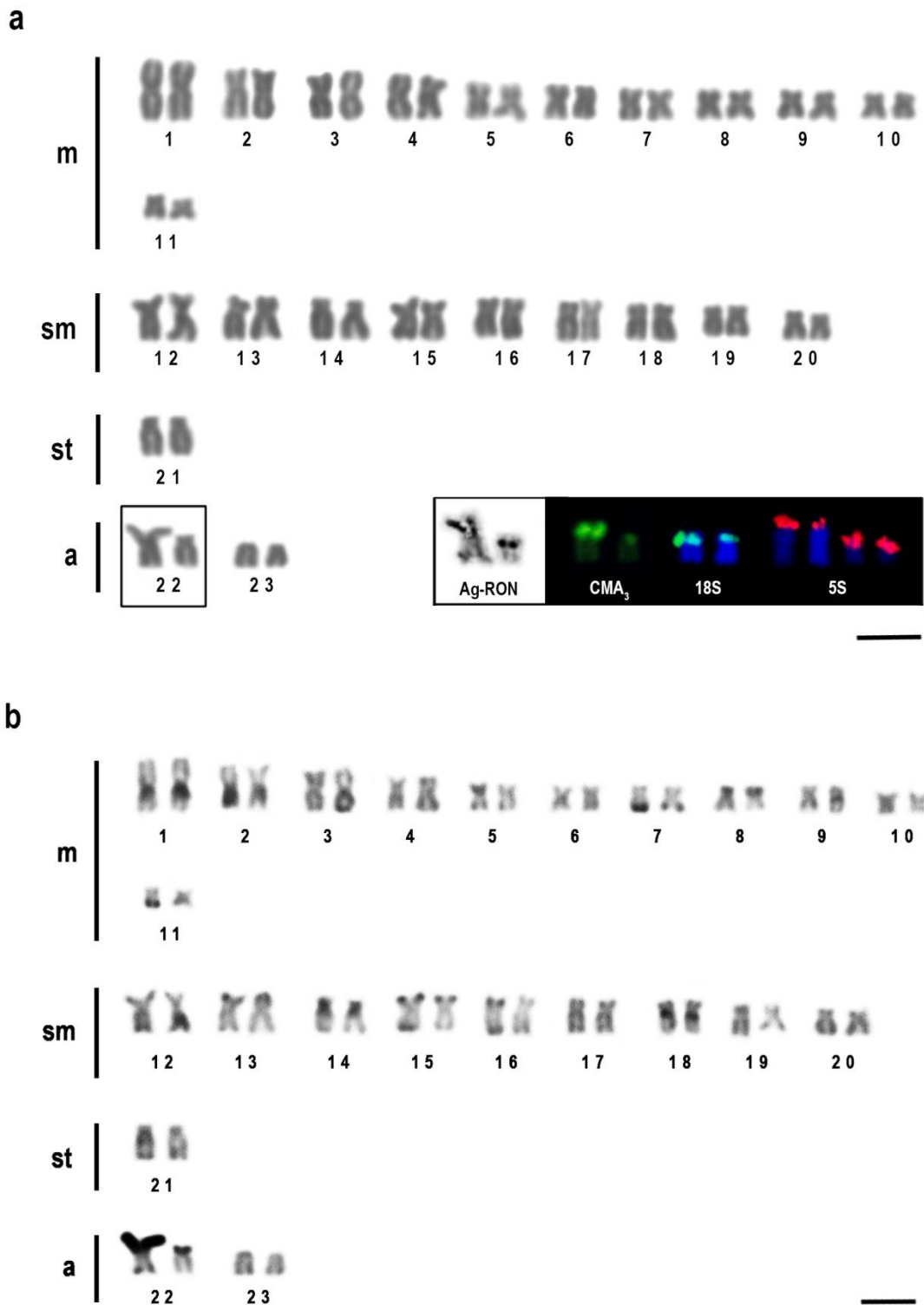
1 **Referências bibliográficas**

- 2 **Almeida-Toledo LF, Foresti F, Trajano E, De Almeida Toledo Filho S. 1992.**  
 3 Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and its  
 4 presumed ancestor, *P. transitoria*. *Caryologia* **45(3-4)**: 255-262.
- 5 **Barbosa LM, Ferreira GEB, Prizon AC, Portela-Castro ALB, Martins-Santos IC.**  
 6 **2015.** Cytogenetic characterization of species of the family Heptapteridae  
 7 (Teleostei: Siluriformes) from the Cuiabá and Ivaí River Basins, Brazil. *Genetics*  
 8 *and Molecular Research* **14(3)**: 8640-8649.
- 9 **Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. 1978.** Cytotaxonomic  
 10 considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* **1**: 103–  
 11 120.
- 12 **Borba RS, Silva EL, Pacheco ACS, Parise-Maltempo PP, Alves AL. 2012.** Trends  
 13 in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish Family Heptapteridae  
 14 Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). *Rev Fish Biol Fish* **22**: 509–518.
- 15 **Bockmann FA, Miquelarena AM. 2008.** Anatomy and phylogenetic relationships of  
 16 a new catfish species from northeastern Argentina with comments on the  
 17 phylogenetic relationships of the genus *Rhamdella* Eigenmann and Eigenmann  
 18 1888 (Siluriformes, Heptapteridae). *Zootaxa* **1780**: 1-54.
- 19 **Conde-Saldaña CC, Barreto CAV, Villa-Navarro FA, Dergam JA. 2017.** An  
 20 Unusual Accumulation of Ribosomal Multigene Families and Microsatellite  
 21 DNAs in the XX/XY Sex Chromosome System in the Trans-Andean Catfish  
 22 *Pimelodella cf. chagresi* (Siluriformes: Heptapteridae). *Zebrafish* **15(1)**: 55-62.
- 23 **Dazzani B, Garcia C, Peixoto M, Trajano E, Almeida-Toledo LFD. 2012.**  
 24 Cytogenetic and molecular analyses in troglotic and epigeal species of  
 25 *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from Brazil. *Neotropical Ichthyology*  
 26 **10(3)**: 623-632.
- 27 **Dias AL, Foresti F. 1993.** Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae  
 28 (Siluroidei). *Revista Brasileira de Genética* 585-600.
- 29 **Eschmeyer WN, Fong JD.** ESPÉCIES POR FAMÍLIA / SUBFAMÍLIA.  
 30 [http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByF](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp)  
 31 [amily.asp](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp). Acessado em 01 jun 2018.
- 32 **Fernandes CA, Damásio JF, da Rosa Guterres Z, Abelha MCF. 2013.** Cytogenetic  
 33 Studies in Two Species of Genus *Pimelodella* (Teleostei, Siluriformes,  
 34 Heptapteridae) from Iguatemi River Basin, Brazil. *Cytologia* **78(1)**: 91-95.
- 35 **Ferraris CJ Jr. 1988.** Relationships of the Neotropical catfish genus *Nemuroglanis*,  
 36 with a description of a new species (Osteichthyes: Siluriformes: Pimelodidae).  
 37 *Proc. Biol. Soc. Wash.* **101(3)**: 509-516.

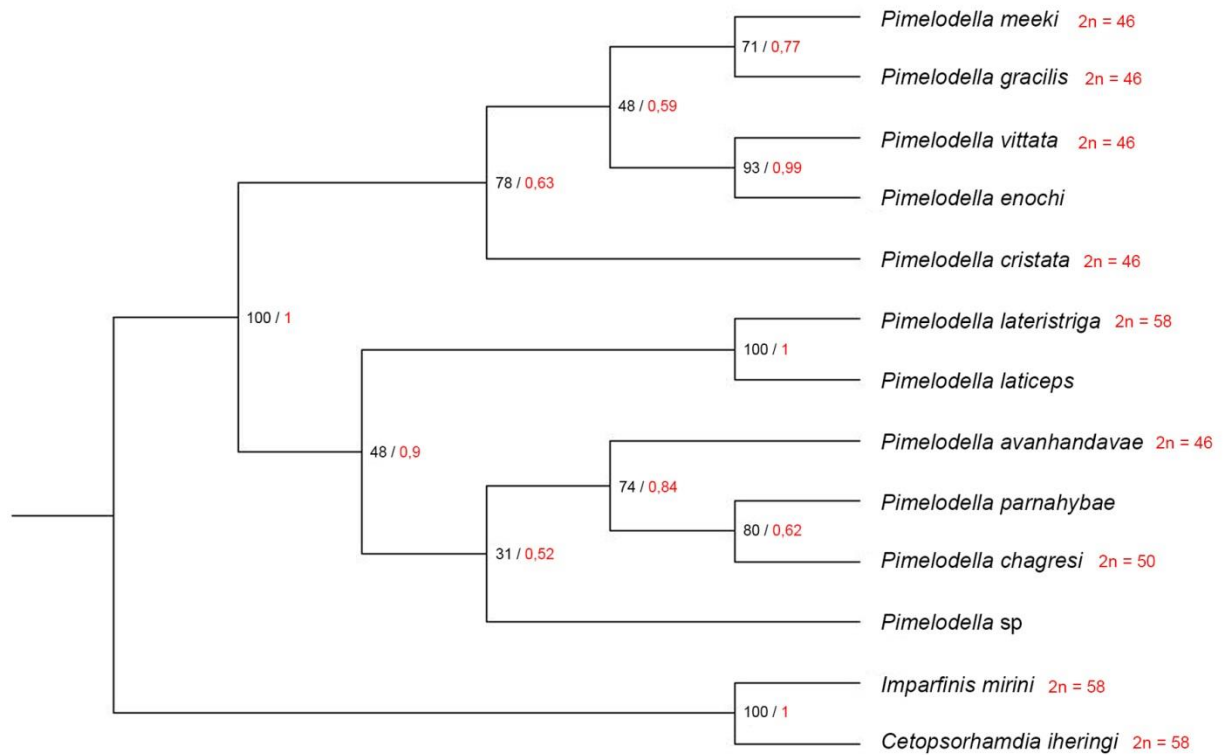
- 1 **Garcia C, Almeida-Toledo LF. 2010.** Comparative chromosomal analyses in  
2 species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of  
3 structural and numerical polymorphisms. *Caryologia* **63**: 32-40.
- 4 **Gouveia JG, de Moraes VPO, Sampaio TR, da Rosa R, Dias AL. 2013.**  
5 Considerations on karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and  
6 Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes:  
7 Heptapteridae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **23(2)**: 215-227.
- 8 **Gouveia JG. 2016.** Citogenética de peixes das famílias Heptapteridae e  
9 Pseudopimelodidae (Siluriformes): Contribuições para estudos com DNAs  
10 repetitivos. D. inédito Phil. Tese, Universidade Estadual de Londrina.
- 11 **Hatanaka TE, Gatetti PM Jr. 2004.** Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA  
12 genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz 1829 (Characiformes,  
13 Prochilodontidae). *Genetica* **122**: 239-244.
- 14 **Howell WM, Black DA. 1980.** Controlled silver staining of nucleous organizer regions  
15 with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**: 1014-  
16 1015.
- 17 **Kantek DLZ, Peres WAM, Moreira-Filho O. 2015.** Cytogenetic study of heptapterids  
18 (Teleostei, Siluriformes) with particular respect to the *Nemuroglanis* subclade.  
19 *Comparative cytogenetics* **9(1)**: 17.
- 20 **Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964.** Nomenclature for centromeric position on  
21 chromosomes. *Hereditas* **52**: 201-220.
- 22 **Lui RL, Blanco DR, Moreira Filho O, Margarido VP. 2012.** Propidium iodide for  
23 making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic &*  
24 *Histochemistry* **87(7)**: 433-438.
- 25 **Lundberg JG. 1991.** *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of  
26 Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) from deep river channels of South  
27 America and delimitation of the subfamily Pimelodinae. *Proc. Biol. Soc. Wash*  
28 **104**: 840-869.
- 29 **Maddison WP, DR Maddison. 2014.** Mesquite: um sistema modular para análise  
30 evolutiva. Versão 3.0 <http://www.mesquiteproject.org>.
- 31 **Margarido VP, Moreira-Filho O. 2008.** Karyotypic differentiation through  
32 chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi,  
33 Heptapteridae). *Genet Mol Biol* **31**: 235-238.
- 34 **Martins C, Galetti-Jr PM. 1999.** Chromosomal localization of 5S rDNA genes in  
35 *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* **7(5)**:  
36 363-367.
- 37 **Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010.** "Criando o Portal Científico CIPRES para  
38 inferência de grandes filogenéticas trees "em Proceedings of the Gateway

- 1 Computing Environments Workshop (GCE), 14 de novembro de 2010, Nova  
2 Orleans, LA pp 1 - 8.
- 3 **Molina WF, Alves DEO, Araújo WC, Martinez PA, Silva MF, Costa GW. 2010.**  
4 Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish  
5 cytogenetic preparations. *Genetics and Molecular Research* **9(3)**: 1807-1814.
- 6 **Moraes VPO. 2014.** Citogenética convencional e molecular de diferentes espécies  
7 dos gêneros *Heptapterus*, *Rhamdella* e *Pimelodella* (Siluriformes,  
8 Heptapteridae) de duas bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul. D. inédito  
9 Phil. Tese, Universidade Estadual de Londrina.
- 10 **Peixoto da SM. 2011.** Estudos sobre as relações filogenéticas e biogeográficas de  
11 espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann &  
12 Eigenmann, 1888 do Alto Paraná. 2011. 129. D. inédito Phil. Tese,  
13 Universidade de São Paulo.
- 14 **Posada D. 2008.** jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and*  
15 *Evolution* **25**: 1253–1256.
- 16 **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual  
17 (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press
- 18 **Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS. 2000.** Comparative genome organization in  
19 plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *The Plant*  
20 *Cell* **12(5)**: 617-635.
- 21 **Schweizer D. 1980.** Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific  
22 heterochromatic regions (DA-DAPI bandas) in human chromosomes.  
23 *Cytogenetic and Genome Research* **27(2-3)**: 190-193.
- 24 **Souza-Shibatta L, Pezenti LF, Ferreira DG, Almeida FSD, Sofia SH, Shibatta OA.**  
25 **2013.** Cryptic species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae)  
26 from the Miranda River, Paraguay River basin, Pantanal of Mato Grosso do Sul,  
27 Central Brazil. *Neotropical Ichthyology* **11(1)**: 101-109.
- 28 **Sumner ATA. 1972.** Simple technique for demonstrating centromeric  
29 heterochromatin. *Exp Cell Res* **75**: 304–306.
- 30 **Swarça AC, Vidotto AP, Dias AL. 2003.** Cytogenetic characterization of *Pimelodella*  
31 aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná State,  
32 Brazil). *Caryologia* **56(4)**: 421-425.
- 33 **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: molecular  
34 evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*,  
35 **30(12)**: 2725-2729.
- 36  
37 **Togawa RC, Brígido MM. 2003.** Web based tool for simple electropherogram quality  
38 analysis. In: *1 st International Conference on Bioinformatics and Computational*

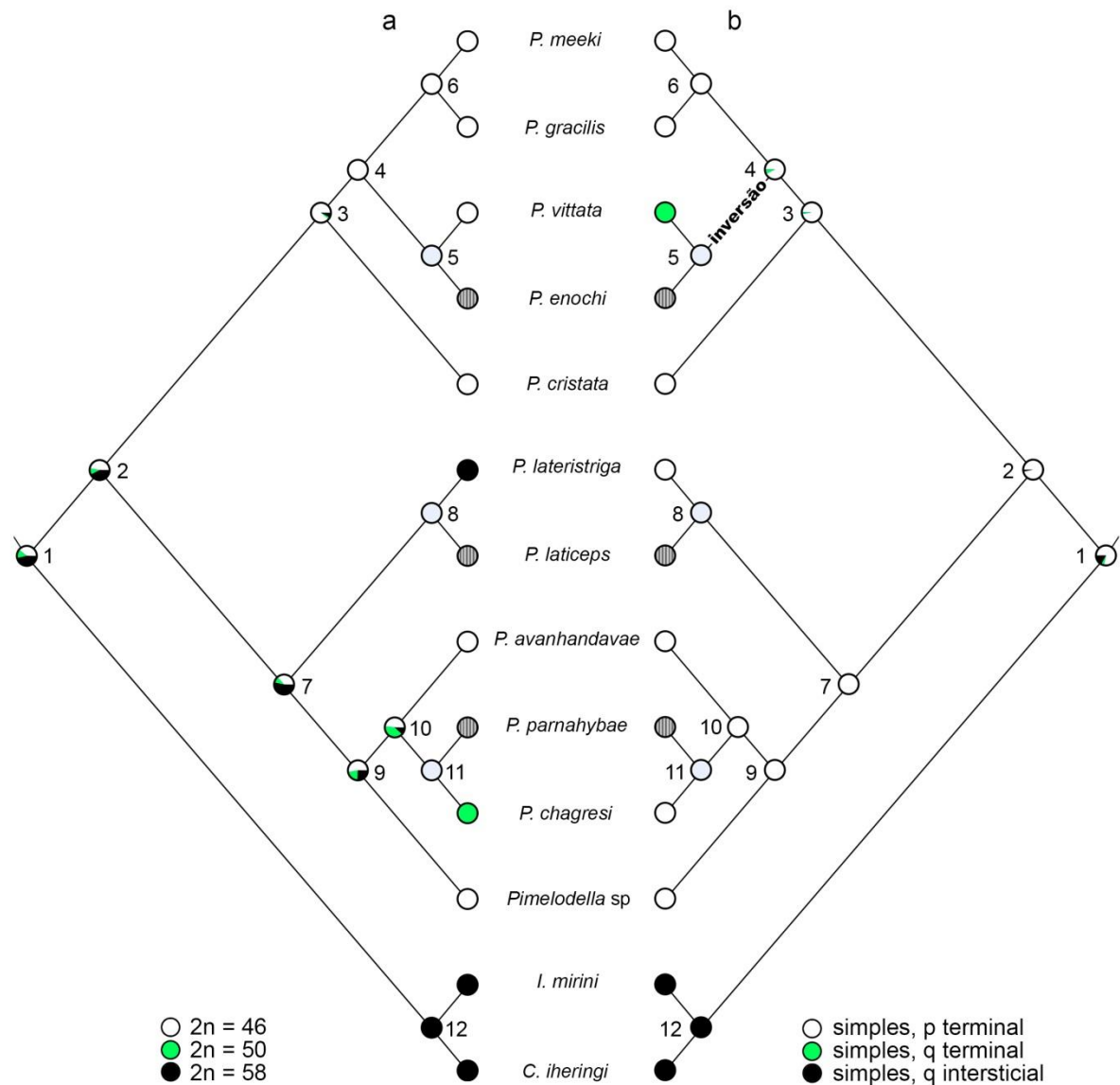
- 1 *Biology-IcoBiCoBi*. Ribeirão Preto. Disponível em:  
2 <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>.
- 3 **Toledo V, Ferrari I. 1976a.** Estudo citogenético de *Pimelodella* sp. e *Rhamdia hilarii*  
4 (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): Cromossomo marcador. *Científica* **4**: 120-  
5 123.
- 6 **Vasconcelos CD, Martins-Santos IC. 2000.** Chromosome polymorphism in species  
7 of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas* **132(2)**: 103-109.
- 8 **Vidotto AP, Swarça AC, Fenocchio AS, Dias AL. 2004.** Cytogenetic studies in  
9 three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi river  
10 basin (Brazil). *Journal of Heredity* **95(6)**: 517-520.
- 11 **Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C. 1999a.** Karyotype description of five species of  
12 Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* **3(1)**: 1-7.
- 13 **Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD. 2005.** DNA barcoding  
14 Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of  
15 London B. *Biological Sciences* **360(1462)**: 1847-1857.



**Figura 1** - Cariótipo de *Pimelodella cristata* com coloração convencional (a) e com bandamento C, evidenciando os blocos heterocromáticos (b). No box, o par cromossômico 22 com Ag-RON, fluorocromo CMA<sub>3</sub> e sonda de DNAr 18S (sinal verde), sendo possível observar um heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos, e dois pares cromossômicos com sonda de DNAr 5S (sinal vermelho). Barra = 10 µm.



**Figura 2** – Árvore filogenética consenso com análise prévia das relações entre espécies do gênero *Pimelodella*, considerando o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI). Valores de Máxima Verossimilhança representados em preto e Valores Bayesianos representados em vermelho. 2n: número diploide.



**Figura 3** – Reconstrução do caráter ancestral do número diploide (a) e da localização da Ag-RON (b) no gênero *Pimelodella*. Modelo de reconstrução do estado ancestral utilizado a máxima verossimilhança, sob o modelo de probabilidade Mk1 (Markov k-state), no software Mesquite versão 3.0. A reconstrução do caráter ancestral foi estimada a partir da árvore de Máxima Verossimilhança de sequência mitocondrial (COI), realizada no presente estudo. As espécies que não possuem dados citogenéticos são representadas pelos círculos listrados em cinza.

**Tabela 1** – Dados citogenéticos sobre o gênero *Pimelodella*, atualizados a partir de Gouveia (2016).

Família Heptapteridae								
Gênero/Espécie	Localidade	2n	Cariótipo	NF	Ag-RON	18S	5S	Referência
<b><i>Pimelodella</i></b>								
<i>Pimelodella</i> aff. <i>avanhandavae</i>	R. Tibagi/PR	52	30m+22sm	104	1 par m, p terminal	-	-	Swarça et al. (2003)
<i>Pimelodella australis</i>	Arroio Ribeiro/RS	58	34m+10sm+8st+6a	110	Par 20, p terminal	Par 20, p, terminal	-	Moraes (2014)
<i>Pimelodella avanhandavae</i>	R. Araquá/SP	46	20m+20sm+6st	92*	1 par st, p terminal	-	-	Vissotto et al. (1999a)
<i>Pimelodella avanhandavae</i>	R. Capivara/SP	46	20m+20sm+6st	92*	1 par st, p terminal	-	-	Vissotto et al. (1999a)
<i>Pimelodella avanhandavae</i>	Água Boa, Novo Mundo/MS	52	24m+20sm+8st	104	1 par st, p terminal e 1 par a, q terminal	-	-	Fernandes et al. (2013)
<i>Pimelodella boschmai</i>	Mogi-Guaçu Araras/SP	46	38m+8sm XY/XX	92*	Par 21 sm, p terminal	Par 21 sm, p, terminal	Par 20 sm, p terminal	Garcia e Almeida-Toledo (2010)
<i>Pimelodella</i> cf. <i>chagresi</i>	R. Alvarado/Colômbia	50	32m+14sm+4st	100	Par 22 sm, p terminal	Par 22 sm, p terminal e crs Y, q	Par 10 m, p terminal e crs Y, q	Conde-Saldaña et al. (2017)
<i>Pimelodella cristata</i>	R. Solimões/AM	46	22m+18sm+2st+4a	88	Par 22 a, p terminal	Par 22 a, p terminal	2 pares m, p terminal	Presente estudo
<i>Pimelodella gracilis</i>	Paraná Mariápolis/SP	46	34m+12sm	92	Par 18 sm, p terminal	Par 18 sm, p terminal	Pares 18 e 22 sm, p terminal, 1 crs par 19, intersticial	Garcia e Almeida-Toledo (2010)
<i>Pimelodella gracilis</i>	Água Boa, Novo Mundo/MS	46	20m+18sm+6st+2a	90	1 crs m, p terminal	-	-	Fernandes et al. (2013)
<i>Pimelodella griffini</i>	R. Miranda/MS	46	38m-sm+8st-a	84	-	-	-	Souza-Shibatta et al. (2013)
<i>Pimelodella kronei</i>	Cavernas na região de Iporanga/SP	58	54m-sm+4st	116*	Par 10 sm, p terminal	-	-	Almeida-Toledo et al. (1992)
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Paraíba do Sul Angra/RJ	58	36m+22sm	116	Par 20 sm, p terminal	Par 20 sm, p terminal	Par 14 m, q peric	Garcia e Almeida-Toledo (2010)
<i>Pimelodella laurenti</i>	Cordisburgo/MG	46	28m+14sm+4st	92*	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	Dazzani et al. (2012)
<i>Pimelodella meeki</i>	R. Limoeiro/PR	46	30m+12sm+4st	92*	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	-	Vidotto et al. (2004)
<i>Pimelodella meeki</i>	R. Couro de Boi/PR	46	30m+12sm+4st	92*	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	-	Vidotto et al. (2004)
<i>Pimelodella meeki</i>	R. Gabriel da Cunha/PR	46	30m+12sm+4st	92*	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	-	Vidotto et al. (2004)
<i>Pimelodella meeki</i>	São Miguel Arcanjo/SP	46	28m+12sm+6st	92*	Par 20 sm, p terminal	Par 20 sm, p terminal	Par 19 sm, p terminal	Garcia e Almeida-Toledo (2010)
<i>Pimelodella meeki</i>	Pilar do Sul/SP	46	28m+12sm+6st	92*	Par 20 sm, p terminal	Par 20 sm, p terminal	Par 19 sm, p terminal	Garcia e Almeida-Toledo (2010)
<i>Pimelodella meeki</i>	Rb. Jacutinga/PR	46	26m+14sm+6st	92	Par 17 sm, p terminal	Par 17 sm, p termina	-	Gouveia (2013)

<i>Pimelodella meeki</i>	Ribeirões da Bacia do Alto Paraná	46	26m+16sm+4st	92*	Par 15 sm, q terminal	Par 15 sm, q terminal	-	Borba et al. (2012)
<i>Pimelodella meeki</i>	R. Queixada/PR	46	26m+14sm+6st	92	Par 17 sm, p terminal	Par 17 sm, p terminal	-	Gouveia et al. (2016)
<i>Pimelodella</i> sp	R. Mogi-Guaçu/SP	46	40m-sm+6st-a XX/XY	86	1 par m-sm, p terminal	-	-	Dias e Foresti (1993)
<i>Pimelodella</i> sp	Pardo Cardoso/SP	46	34m+12sm	92	Par 21 sm, p terminal e Bs	Par 21 sm, p terminal	Par 22 sm, p terminal e crs par 6 m, q terminal	Garcia e Almeida-Toledo (2010)
<i>Pimelodella</i> sp	Botucatu/SP	46	28m+12sm+6st	92*	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	1 par sm, 1 par m, p terminal	Dazzani et al. (2012)
<i>Pimelodella</i> sp	Colina/SP	46	28m+12sm+6st	92*	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	Dazzani et al. (2012)
<i>Pimelodella</i> sp	Guapiara/SP	46	26m+16sm+4st	92*	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	Dazzani et al. (2012)
<i>Pimelodella</i> sp	Pirassununga/SP	46	28m+14sm+4st	92*	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	Dazzani et al. (2012)
<i>Pimelodella</i> sp	-	46	28m+10sm+8a	84	-	-	-	Toledo e Ferrari (1976a)
<i>Pimelodella</i> sp	R. Cuiabá/MT	46	26m+10sm+10st	92	Par 14 sm, p terminal	Par 14 sm, p terminal	-	Barbosa et al. (2015)
<i>Pimelodella</i> sp 1	R. Paraná/PR	46	20m+20sm+6a	86	1 par sm, p terminal	-	-	Vasconcelos e Martins-Santos (2000)
<i>Pimelodella</i> sp 2	R. Paraná/PR	52	22m+22sm+8st	104*	1 par sm, p terminal	-	-	Vasconcelos e Martins-Santos (2000)
<i>Pimelodella spelaea</i>	S. Domingos/GO	46	28m+14sm+4st	92*	1 par sm, p terminal	1 par sm, p terminal	2 pares sm, p terminal	Dazzani et al. (2012)
<i>Pimelodella taenioptera</i>	R. Miranda/MS	52	42m-sm+10st-a	94	-	-	-	Souza-Shibatta et al. (2013)
<i>Pimelodella taenioptera</i>	R. Aricá Mirim/MT	52	26m+22sm+4st	104	Par 14 sm, p terminal	Par 14 sm, p terminal	-	Barbosa et al. (2015)
<i>Pimelodella transitória</i>	Cavernas na região de Iporanga/SP	58	54m-sm+4st	116*	Par 10 sm, p terminal	-	-	Almeida-Toledo et al. (1992)
<i>Pimelodella vittata</i>	Rb. Minhocas/MG	46	16m+22sm+8st	92	Par 17 sm, q terminal	Par 17 sm, q terminal	1 par sm, q terminal	Kantek et al. (2015)

2n: número diploide, NF: número fundamental, Ag-RON: regiões organizadoras de nucléolos coradas com nitrato de prata, 18S: DNA ribossomal 18S, 5S: DNA ribossomal 5S, m: metacêntrico, sm: submetacêntrico, st: subtlocêntrico, a: acrocêntrico, p: braço curto, q: braço longo, peric: pericentromérica, crs: cromossomo, R: rio, Rb: ribeirão, PR: Paraná, RS: Rio Grande do Sul, SP: São Paulo, MS: Mato Grosso do Sul, AM: Amazonas, RJ: Rio de Janeiro, MG: Minas Gerais, MT: Mato Grosso, GO: Goiás. \*Número fundamental recalculado no presente trabalho, considerando m, sm e st com dois braços e a com um braço; m-sm com dois braços e st-a com um braço.

**Tabela 2** – Lista de espécies utilizadas para gerar a árvore consenso do gênero *Pimelodella*, com seus respectivos locais de coletas e código de acesso no banco de dados BOLD Systems.

Gênero <i>Pimelodella</i>		
Espécies	Localidade	Código de acesso
<i>Cetopsorhamdia iheringi</i>	R. Tibagi, Bacia do Alto Paraná/SP	PDCAP285-14
<i>Imparfinis mirini</i>	Bacia do Alto Paraná/SP	FUPR473-09
<i>Pimelodella avanhandavae</i>	Bacia do Alto Paraná/SP	FUPR487-09
<i>Pimelodella chagresi</i>	R. Tuirá, Panamá	BSFFA426-07
<i>Pimelodella cristata</i>	R. Solimões, Iranduba/AM	Presente estudo
<i>Pimelodella enochi</i>	Ecorregião da Caatinga, Paraíba	MNCE245-17
<i>Pimelodella gracilis</i>	Entre Rios, Rosario/ARG	LARI027-12
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Bacia Paraíba do Sul/RJ	FPSR252-09
<i>Pimelodella laticeps</i>	Buenos Aires/ARG	FARGB130-11
<i>Pimelodella meeki</i>	Bacia do Alto Paraná/SP	FUPR1188-10
<i>Pimelodella parnahybae</i>	Nordeste/MA	ITAPE017-15
<i>Pimelodella sp</i>	Nordeste/MA	ITAPE011-15
<i>Pimelodella vittata</i>	Minas Gerais	BSB370-10

R: rio, SP: São Paulo, AM: Amazonas, ARG: Argentina, RJ: Rio de Janeiro, MA: Maranhão. A sequência da espécie *Pimelodella cristata* do presente estudo será depositada no banco de dados BOLD Systems.

**Tabela 3** – Valores proporcionais das probabilidades em cada nó, estimando qual o provável caráter ancestral no gênero *Pimelodella* (2n e Ag-RON). Reconstrução do estado ancestral utilizando a máxima verossimilhança, sob o modelo de probabilidade MK1, no software Mesquite versão 3.0.

Gênero <i>Pimelodella</i>	Número diploide			Localização Ag-RON			
	Nós	2n=46	2n=50	2n=58	p terminal	q terminal	q intersticial
1		<b>0,396</b>	0,143	<b>0,459</b>	<b>0,786</b>	0,045	0,168
2		<b>0,473</b>	0,103	<b>0,422</b>	<b>0,968</b>	0,011	0,019
3		<b>0,890</b>	0,035	0,073	<b>0,972</b>	0,022	0,004
4		<b>0,984</b>	0,006	0,009	<b>0,928</b>	0,067	0,003
5		?	?	?	?	?	?
6		<b>0,995</b>	0,002	0,002	<b>0,996</b>	0,003	0,000
7		<b>0,368</b>	0,100	<b>0,530</b>	<b>0,998</b>	0,000	0,001
8		?	?	?	?	?	?
9		<b>0,530</b>	0,212	0,256	<b>0,999</b>	0,000	0,000
10		<b>0,484</b>	<b>0,399</b>	0,116	<b>0,999</b>	0,000	0,000
11		?	?	?	?	?	?
12		0,013	0,010	<b>0,976</b>	0,006	0,002	<b>0,990</b>

2n: número diploide, p: braço curto, q: braço longo. Os pontos de interrogação representam os nós onde não foi possível fazer a estimativa, por falta de informação citogenética de alguma espécie presente neste nó. Em vermelho observam-se os maiores valores probabilísticos, indicando o provável caráter ancestral.

## 6. Considerações Finais

O presente estudo traz três novas descrições citogenéticas de espécies pertencentes às famílias Heptapteridae, *Pimelodella cristata*, e Pimelodidae, *Propimelodus eigenmanni* e *Exallodontus aguanae*, além de descrições complementares da espécie *Calophysus macropterus*. No geral, as espécies analisadas apresentaram características cromossômicas comumente relatadas na literatura porém, algumas particularidades também foram evidenciadas.

1. A espécie *Pimelodella cristata* apresentou  $2n=46$  frequentemente encontrado no gênero *Pimelodella*. As espécies da família Pimelodidae, *Propimelodus eigenmanni* e *Exallodontus aguanae* mostraram  $2n=56$ , com diferentes fórmulas cariotípicas. *Calophysus macropterus* apresentou  $2n=50$ , diferente do padrão comumente encontrado em Pimelodídeos ( $2n=56$ ).
2. As RONS detectadas pela impregnação com nitrato de prata e com a sonda de DNAr 18S se mostraram simples nas quatro espécies porém, variações quanto à localização destes sítios foram observadas. As espécies *Pimelodella cristata*, *Calophysus macropterus* e *Propimelodus eigenmanni* apresentaram a RON na posição terminal de um par cromossômico acrocêntrico e *Exallodontus aguanae* em um par cromossômico metacêntrico na posição intersticial, sendo este o primeiro relato em Pimelodidae. Todas as RONS mostraram-se heterocromáticas e CMA<sub>3</sub> positivas.
3. Foi evidenciado heteromorfismo de tamanho da RON entre os cromossomos homólogos nas espécies *Pimelodella cristata*, *Propimelodus eigenmanni* e *Exallodontus aguanae*, observado com Giemsa, CMA<sub>3</sub> e

1 sonda de DNAr 18S. Em *Pimelodella cristata* pode-se também evidenciar  
2 um heteromorfismo da heterocromatina associada à RON.

3 4. A Hibridização Fluorescente *in situ* com DNAr 5S confirmaram um único  
4 par cromossômico portador deste gene para as espécies *Propimelodus*  
5 *eigenmanni* e *Exallodontus aguanae*, enquanto *Pimelodella cristata* e  
6 *Calophysus macropterus* apresentaram quatro sítios de DNAr 5S em 2  
7 pares cromossômicos diferentes. Destas espécies, duas apresentaram  
8 sintonia entre os genes ribossomais: *C. macropterus* e *E. aguanae*, sendo  
9 esta uma característica pouco observada na família Pimelodidae.

10 5. As espécies analisadas apresentaram um padrão de heterocromatina  
11 diferente do frequentemente descrito na literatura, composto por uma  
12 maior quantidade de bandas. As espécies de pimelodídeos mantiveram o  
13 padrão heterocromático localizado nas regiões terminais e  
14 pericentroméricas, já *Pimelodella cristata* apresentou ainda blocos  
15 intersticiais.

16 6. Com a integração dos dados filogenéticos moleculares associados aos  
17 citogenéticos foi possível sugerir prováveis caracteres cromossômicos  
18 ancestrais. No gênero *Pimelodella*  $2n=46$  e  $2n=58$  são prováveis números  
19 diploides ancestrais. Na família Pimelodidae  $2n=56$  tem maior  
20 probabilidade de ser o número diploide ancestral, suportado por um alto  
21 valor probabilístico. Já o grupo "*Calophysus*" apresenta espécies com  
22 características derivadas, como  $2n=54$  e  $2n=50$ , resultado de pelo menos  
23 duas prováveis fusões cromossômicas.

24 7. As espécies *Pimelodella cristata*, *Calophysus macropterus* e *Propimelodus*  
25 *eigenmanni* apresentaram como característica ancestral a localização da

- 1 Ag-RON na posição terminal do braço curto. Os cromossomos portadores  
2 de RONS de *Exallodontus aguanae* provavelmente passaram por eventos  
3 de inversões pericêntricas, resultando na localização intersticial do braço  
4 longo deste sítio.
- 5 8. Dentro da filogenia molecular do gênero *Pimelodella*, observam-se dois  
6 grandes agrupamentos, a espécie *Pimelodella cristata* se mantém no  
7 primeiro clado, apresentando os prováveis padrões ancestrais de 2n e Ag-  
8 RON deste grupo.
- 9 9. Os resultados apresentados contribuem com novos dados citogenéticos e  
10 com a compreensão dos processos evolutivos nas famílias Heptapteridae  
11 e Pimelodidae. Igualmente permitem realizar inferências com relação a  
12 caracteres ancestrais dentro dos grupos analisados, assim como  
13 condições derivadas e seus processos de mudança ao longo da evolução  
14 cariotípica.