



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Investigação da diversificação e evolução cromossômica em espécies de
Pimelodidae (Siluriformes): contribuição dos DNAs repetitivos e
cromossomos B.

Geovana de Cassia Malimpensa

SÃO CARLOS
2019

**Investigação da diversificação e evolução cromossômica em espécies de
Pimelodidae (Siluriformes): contribuição dos DNAs repetitivos e
cromossomos B.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA
E BIOLOGIA MOLECULAR

Investigação da diversificação e evolução cromossômica em espécies de
Pimelodidae (Siluriformes): contribuição dos DNAs repetitivos e
cromossomos B.

Geovana de Cassia Malimpensa

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Geovana de Cássia Malimpensa, realizada em 18/02/2019:

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
UFSCar

Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo
UFSCar

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido
Unioeste

*Dedico este trabalho aos meus
pais Gilberto e Teresa, por todo
o amor, apoio e confiança.*

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, em quem sempre mantive minha fé, e que sei que estava ao meu lado o tempo todo, me dando coragem, força, e disposição para seguir em frente e nunca desistir.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, meu orientador, por todos os ensinamentos e oportunidades, e por toda a confiança e amizade. Obrigada.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, pela coorientação, ensinamentos, disposição em me ajudar sempre, pela paciência, e amizade.

Aos Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo e Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi, pelos ensinamentos, amizade e oportunidade de convívio.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva por toda a ajuda com os experimentos moleculares e pelos seus ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Carla Simone Pavanelli e Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta por toda a ajuda com a identificação taxonômica das espécies.

Aos técnicos do laboratório Piau, Gallo e Toninho, por todo o auxílio dentro do laboratório e principalmente nos períodos de coleta.

À secretária da Pós-Graduação Ivanildes, por toda a ajuda e paciência com os processos e dúvidas da pós.

Ao pessoal de Ponta Grossa, que me recebem tão bem quando estive lá, e que sempre estiveram dispostos à me ajudar, em especial a Geize e a Larissa. Obrigada pela amizade e paciência meninas.

Aos meus amigos do laboratório, Renata, Gustavo, Rafael, Manolo, Francisco, Ezequiel, Fernando, e aos que passaram por lá também, Cássia, Natália, Felipe, Taapu, Nuntiya, Sasha, Ahmed e Joe. Obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração, e por todo o apoio. Agradeço em especial às queridas Carla e Terumi, por sempre estarem dispostas à me ajudar, pela amizade e apoio, e à minha querida amiga e parceira de laboratório Ju, pela amizade e convívio, e por sempre me ajudar no que fosse preciso, mesmo a distância.

À minha querida amiga e eterna “boss” Josi, que mesmo longe, nunca me abandonou e sempre esteve disposta em me ajudar. Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência, e principalmente, pela sua amizade.

Aos meus colegas do LabBMC, que sempre estiveram dispostos à me ajudar no que fosse preciso. Agradeço especialmente ao Ueslei e à Carol, por toda a ajuda, pelos ensinamentos, amizade e paciência.

Aos meus pais, Gilberto e Teresa, por sempre me apoiarem, incentivarem, por todas as orações e confiança. Obrigada por me ajudarem a chegar até aqui, por me ensinarem a ser uma pessoa correta, justa e honesta, e por me mostrarem o caminho da verdade, da dignidade e do sucesso. Me faltam palavras para expressar todo o sentimento de gratidão, amor e respeito que eu tenho por vocês. Muito obrigada, eu amo muito vocês.

Ao meu namorado, Guilherme, pela paciência, apoio, conselhos, risadas, amor e carinho, por ser meu melhor amigo e por me dar forças para que eu nunca desistisse dos meus sonhos. Te amo.

À toda a minha família, em especial aos meus avós e minhas amigas e irmãs do coração, Gisele e Gabriela, que sempre foram minha fonte de inspiração. Obrigada em

especial, aos meus avós Ademar e Aparecida, que sempre cuidaram de mim, e que mesmo não estando mais aqui, sei que certamente estão muito orgulhosos e contentes. Amo vocês. Saudades eternas.

Às minhas amigas queridas, Kevlyn, Giovana e Camila. Obrigada pela amizade, pelas risadas, pelo apoio e por estarem sempre do meu lado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq), por todo o apoio financeiro.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICM-Bio) pela autorização (licença N^o10538-1) e apoio na coleta dos exemplares.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução e ao Laboratório de Citogenética de Peixes do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos pelo suporte e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas e Quadros.....	iv
Resumo.....	v
Abstract	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais da ordem Siluriformes	1
1.2. Considerações gerais sobre Pimelodidae, com ênfase para <i>Bergiaria</i> e <i>Pimelodus</i>	1
1.3. Caracterização dos locais de estudo	3
1.3.1. Bacia do Rio São Francisco.....	3
1.3.2. Bacia do Rio Paraná	4
1.4. Estudos citogenéticos em Pimelodidae.....	4
1.5. Aspectos gerais dos cromossomos supranumerários ou B	6
1.6. DNAs repetitivos: destaque para os estudos em peixes Neotropicais	7
1.7. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)	10
1.8. DNA <i>barcoding</i>	10
1.9. Figuras e Tabelas	12
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Amostras coletadas	15
4.2. Metodologia Citogenética Clássica	15
4.2.1. Obtenção de cromossomos mitóticos.....	15
4.2.2. Bandamento C.....	16
4.2.3 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs).....	17
4.3. Metodologia Citogenética Molecular	17
4.3.1. Bandamento CDD	17
4.3.2. Isolamento de DNAs repetitivos	17
4.3.3. Marcação das sondas	18
4.3.4. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	19
4.3.4.1. Hibridização simples <i>in situ</i> fluorescente (Simple-FISH).....	19
4.3.4.2. Hibridização dupla <i>in situ</i> fluorescente (Double-FISH).....	20
4.3.5. Hibridização Genômica Comparativa (CGH).....	21
4.3.5.1. Preparação das Sondas.....	21

4.3.5.2. FISH para CGH	21
4.3.6. Forma de análise dos resultados citogenéticos.....	22
4.4. Metodologia Molecular.....	22
4.4.1. Extração de DNA	22
4.4.2. Purificação e Clonagem das Sequências Repetitivas	23
4.4.3. Amplificação do gene citocromo C oxidase subunidade I (COI).....	24
4.4.4. Sequenciamento Nucleotídico.....	24
4.4.5. Análise das sequências	25
4.4.5.1. Análise dos dados do gene COI.....	25
4.5. Figuras e Tabelas	28
5. REFERÊNCIAS	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1. Capítulo 1	47
Resumo.....	48
Abstract	49
6.1.1. Introdução.....	50
6.1.2. Materiais e Métodos	51
6.1.3. Resultados	53
6.1.4. Discussão.....	54
6.1.5. Agradecimentos.....	58
6.1.6. Referências	60
6.1.7. Figuras e Tabelas.....	67
6.2. Capítulo 2	72
Resumo.....	73
Abstract	74
6.2.1. Introdução.....	75
6.2.2. Materiais e Métodos	76
6.2.3. Resultados	78
6.2.4. Discussão.....	79
6.2.5. Referências	84
6.2.6. Figuras e Tabelas.....	91
6.3. Capítulo 3	94
Resumo.....	95
Abstract	96

6.3.1. Introdução.....	97
6.3.2. Materiais e Métodos	98
6.3.3. Resultados	99
6.3.4. Discussão.....	100
6.3.5. Referências	105
6.3.6. Figuras e Tabelas.....	110
6.4. Capítulo 4	117
Resumo.....	118
Abstract	119
6.4.1. Introdução.....	120
6.4.2. Materiais e Métodos	121
6.4.3. Resultados	126
6.4.4. Discussão.....	129
6.4.5. Referências	134
6.3.6. Figuras e Tabelas.....	139
7. CONCLUSÕES.....	145

LISTA DE FIGURAS

MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 1.** Fotos de exemplares de *Bergiaria westermanni* (a); *Pimelodus microstoma* (b) e *Pimelodus pohli* (c)29
- Figura 2.** Foto de exemplar de *Pimelodus fur*29
- Figura 3.** Mapa ilustrativo dos pontos de coleta das espécies de Pimelodidae analisadas30

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 1

- Figura 1.** Cariótipos de *B. westermanni* após a coloração convencional com Giemsa (A) e bandamento C (B). Os cromossomos portadores das Ag-RONs estão em destaque no box superior direito67
- Figura 2.** Metáfases de *B. westermanni* após a coloração CDD (A) e FISH com as sondas (GATA)_n (B) e (TTAGGG)_n (C). As setas indicam os cromossomos portadores da RON, e os asteriscos indicam os cromossomos B67
- Figura 3.** Cariótipo de *B. westermanni* após FISH com as sondas de DNAr 5S (sinais vermelhos) e DNAr 18S (sinais verdes). **Box A** – Sinais de DNAr 18S estão presentes em apenas 3 dos 4 cromossomos B. **Box B** – Colocalização das sequências DNAr 5S, snRNA U2, e histonas no par cromossômico 5. **Box C** – Localização das sequências de histonas no par cromossômico 1468
- Figura 4.** Número de nucléolos por núcleo evidenciados pela impregnação com nitrato de prata e FISH com DNAr 18S69

Capítulo 2

- Figura 1.** Cariótipos de *Pimelodus microstoma* (A e B) e *Pimelodus pohli* (C e D), evidenciando a coloração convencional com Giemsa (A e C) e o bandamento C (B e D), respectivamente. Cromossomos portadores dos sítios Ag-RONs estão destacados nos *boxes*91
- Figura 2.** Cariótipos de *Pimelodus pohli* (A) e *Pimelodus microstoma* (B) submetidos à FISH com sondas de DNAr 45S (sinal verde) e DNAr 5S (sinal vermelho). Os resultados com as sondas snRNAs U1 e U2, e histonas H3 e H4 estão destacados nos *boxes*92
- Figura 3.** Idiograma das espécies de *Pimelodus* estudadas com os dados obtidos com o mapeamento dos DNAs repetitivos.....93

Capítulo 3

Figura 1. Metáfases de <i>B. westermanni</i> submetidas à FISH com os microssatélites (C) ₃₀ , (CA) ₁₅ , (GA) ₁₅ , (CAA) ₁₀ , (CAC) ₁₀ e (CAG) ₁₀ . Os asteriscos indicam os cromossomos B. Os boxes mostram os sítios nos cromossomos B	110
Figura 2. Metáfases de <i>B. westermanni</i> submetidas à FISH com os microssatélites (CGG) ₁₀ , (CAT) ₁₀ , (GAA) ₁₀ , (GAC) ₁₀ , (GAG) ₁₀ e (TAC) ₁₀ . Os asteriscos indicam os cromossomos B. Os boxes mostram os sítios nos cromossomos B	111
Figura 3. Metáfases de <i>P. microstoma</i> submetidas à FISH com os microssatélites (C) ₃₀ , (CA) ₁₅ , (GA) ₁₅ , (CAA) ₁₀ , (CAC) ₁₀ e (CAG) ₁₀	112
Figura 4. Metáfases de <i>P. microstoma</i> submetidas à FISH com os microssatélites (CGG) ₁₀ , (CAT) ₁₀ , (GAA) ₁₀ , (GAC) ₁₀ , (GAG) ₁₀ e (TAC) ₁₀	113
Figura 5. Metáfases de <i>P. pohli</i> submetidas à FISH com os microssatélites (C) ₃₀ , (CA) ₁₅ , (GA) ₁₅ , (CAA) ₁₀ , (CAC) ₁₀ e (CAG) ₁₀	114
Figura 6. Metáfases de <i>P. pohli</i> submetidas à FISH com os microssatélites (CGG) ₁₀ , (CAT) ₁₀ , (GAA) ₁₀ , (GAC) ₁₀ , (GAG) ₁₀ e (TAC) ₁₀	115
Figura 7. Metáfases de <i>P. microstoma</i> (A) e <i>P. pohli</i> (B) submetidas à FISH com sonda da sequência (GATA) _n	116

Capítulo 4

Figura 1. Metáfases de <i>P. microstoma</i> (A) e <i>P. pohli</i> (B) submetidas à FISH com a sonda (TTAGGG) _n . Em B, os asteriscos indicam os cromossomos portadores de ITS.....	140
Figura 2. Metáfases de <i>B. westermanni</i> submetidas à técnica de CGH. Primeira coluna: coloração com DAPI (azul); Segunda coluna: padrão de hibridização com o gDNA de <i>B. westermanni</i> (Bw gDNA) (verde); Terceira Coluna: padrões de hibridização com gDNA de <i>P. fur</i> (Pf gDNA), com gDNA de <i>P. microstoma</i> (Pm gDNA) e com gDNA de <i>P. pohli</i> (Pp gDNA); Quarta coluna: imagens sobrepostas de cada gDNA com a imagem corada com DAPI, com as regiões genômicas compartilhadas evidenciadas em amarelo	141
Figura 3. Comparação entre a distância COI intra e interespecífica utilizando as espécies <i>B. westermanni</i> , <i>P. microstoma</i> e <i>P. pohli</i> . Os quatro quadrantes indicados representam: (I) a concordância entre a taxonomia atual e a identificação molecular; (II) possível existência de espécies crípticas; (III) recente divergência, sinonímia ou hibridização; e, (IV) nenhuma correspondência entre taxonomia e identificação molecular	142
Figura 4. Árvore de <i>Neighbor-Joining</i> para as espécies estudadas utilizando o modelo de distância Kimura-2-parâmetros. Números nos nós representam valores de <i>bootstrap</i> obtidos em	

1.000 pseudoréplicas	143
Figura 5. Análise filogenética das quatro espécies estudadas utilizando as três metodologias (DNA <i>barcoding</i> , GMYC e bPTP) e estimativa dos tempos de divergência	144

LISTA DE TABELAS E QUADROS

INTRODUÇÃO

Quadro 1. Espécies de Pimelodidae encontradas nas bacias dos rios São Francisco e Alto Rio Paraná.....	12
---	----

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1. Espécies coletadas e informações de seus respectivos pontos de coleta.....	28
Tabela 2. Sequências de DNAs repetitivos amplificadas e seus respectivos <i>primers</i>	28

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 1

Tabela 1. População de <i>B. westermanni</i> evidenciando o número de metáfases analisadas com a presença de cromossomos B em cada espécime.	69
Tabela S1. Protocolo para as reações de PCR e concentração dos mix.....	70
Tabela S2. Frequência de nucléolos por núcleo em 783 núcleos de 4 indivíduos analisados com a técnica de impregnação com nitrato de prata	70
Tabela S3. Dados das sequências de rDNA 5S, snRNA U2 e histonas de <i>B. westermanni</i>	71

Capítulo 2

Tabela 1. Dados das amostras e número de depósito das espécies analisadas.....	91
---	----

Capítulo 3

Tabela 1. Padrão de distribuição dos sítios microssatélites nas espécies analisadas	116
--	-----

Capítulo 4

Tabela 1. Informações das espécies coletadas	139
Tabela 2. Distância genética entre as espécies analisadas. Na diagonal principal (negrito) estão os valores intraespecíficos	139

Resumo

Pimelodidae compreende 114 espécies válidas, com poucas delas caracterizadas citogeneticamente, principalmente do ponto de vista da citogenética molecular. Além disso, a identificação taxonômica das espécies na família ainda é muito imprecisa e problemática, devido a ausência de um diagnóstico baseado em relações filogenéticas. Neste contexto, foram realizadas análises citogenéticas (clássicas e moleculares) e moleculares (DNA *barcoding*, GMYC e bPTP) em quatro espécies de Pimelodidae: *Bergiaria westermanni*, *Pimelodus fur* e *Pimelodus pohli*, da bacia do Rio São Francisco, e *Pimelodus microstoma*, da bacia do Alto Rio Paraná, com o intuito de contribuir com a taxonomia, caracterização e evolução cromossômica e interrelações na família. Em *B. westermanni*, *P. microstoma* e *P. pohli*, foi constatado um conservadorismo no número diploide ($2n$), no padrão de distribuição da heterocromatina, na localização dos sítios Ag-RONs/DNAr 45S, na clusterização dos genes de histonas, na sintenia entre snRNA U2 DNAr 5S, e no padrão de distribuição de treze microssatélites diferentes. Entretanto, algumas outras características citogenéticas mostraram-se variáveis entre as espécies, como o número diploide em *P. fur*, a fórmula cariotípica, o número e localização dos sítios DNAr 5S, a localização dos sítios H3/H4 em *P. microstoma*, a presença de cromossomos B portadores de sítios DNAr 18S em *B. westermanni*, a ocorrência de ITS em *P. pohli*, a sintenia entre snRNA U2, DNAr 5S e histonas em *B. westermanni*, a presença de um bloco conspícuo do microssatélite (GATA)_n em *P. microstoma*. Tais características evidenciam a diversificação cariotípica ocorrida entre as espécies ao longo da evolução cromossômica e sustentam sua delimitação taxonômica. Os dados obtidos com a CGH mostraram o compartilhamento de gDNA de *B. westermanni* com os gDNAs das outras espécies. Porém, a presença de gDNA comum restringiu-se a somente algumas poucas regiões cromossômicas, o que reforça ainda mais a diversificação ocorrida entre essas espécies. Análises nos núcleos de *B. westermanni* com as técnicas de Ag-RON e FISH com a sonda de DNAr 18S revelaram a presença de até 05 Ag-RONs e 04 sítios de DNAr 18S nesses núcleos,

indicando que os sítios Ag-RONs presentes nos cromossomos B desta espécie sejam ativos. A ocorrência de sítios de DNAr 18S e (GATA)_n nos cromossomos A e B de *B. westermanni*, sugere a provável origem intraespecífica deste cromossomo supranumerário. Essa hipótese é também corroborada pela CGH, que evidenciou a predominância de conteúdo genômico de *B. westermanni* nesse cromossomo. Assim, o presente trabalho apresenta resultados citogenéticos, principalmente relacionados ao mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos, e moleculares inéditos para Pimelodidae, contribuindo para um melhor entendimento da biodiversidade presente nesse grupo.

Palavras-chave: CGH, citogenética, delimitação de espécies, DNA *barcoding*, DNAs repetitivos, diversificação cariotípica, Pimelodidae

Abstract

Pimelodidae comprises 114 valid species, with few of them are cytogenetically characterized, mainly, especially with respect to molecular cytogenetics. In addition, the species taxonomic delimitation is still very imprecise and problematic due to the absence of diagnoses based on phylogenetic relationships. In this context, cytogenetic analyzes (classical and molecular) and molecular (DNA *barcoding*, GMYC and bPTP) were carried out in four species of Pimelodidae: *Bergiaria westermanni*, *Pimelodus fur* and *Pimelodus pohli* from the São Francisco River basin, and *Pimelodus microstoma* from the Upper Paraná River basin, aiming to provide evolutionary and taxonomic subsidies for them. *B. westermanni*, *P. microstoma* and *P. pohli* species showed conservation concerning the diploid number (2n), heterochromatin distribution pattern, Ag-NORs/rDNA 45S sites localization, histone gene clustering, syntenia between U2 snRNA/rDNA 5S, and distribution pattern of thirteen different microsatellites. However, differentiations were found for some other cytogenetic features, such as the 2n in *P. fur*, the karyotype formula, number and location of 5S rDNA sites and the location of H3/H4 histones in *P. microstoma*, the presence of NOR bearing B chromosomes in *B. westermanni*, the ITS occurrence in *P. pohli*, the syntenia between U2 snRNA, 5S rDNA and histones in *B. westermanni*, and the presence of a conspicuous microsatellite (GATA)_n block in *P. microstoma*. Such features evidence the karyotype diversification that occurred among these species along their evolutionary process and support their taxonomic delimitation. CGH data showed the sharing of *B. westermanni* gDNA with the gDNAs of other species, in few chromosomal regions, thus reinforcing their genetic diversification. Analysis on *B. westermanni* nuclei with Ag-NOR staining and FISH with 18S rDNA probe revealed the presence of zero up to five Ag-NORs and four sites of 18S rDNA sites, indicating that the Ag-NORs in the B chromosomes of this species are active regions. 18S rDNA and (GATA)_n sites were identified on A and B chromosomes of *B. westermanni*, suggesting the probable intraspecific origin of supernumerary chromosome. This hypothesis is also supported by CGH, which has evidenced the predominance of *B. westermanni* genomic

content in this chromosome. The molecular analyzes also supported the occurrence of four distinct species, reinforcing the taxonomic and cytogenetic data. Thus, this study present new molecular and cytogenetic data for Pimelodidae species and contributes to a better understanding of their chromosomal and molecular diversity.

Keywords: CGH, cytogenetics, DNA *barcoding*, karyotpe diversification, repetitive DNAs, Pimelodidae, species delimitation,

1. INTRODUÇÃO

O grupo dos peixes é o mais diverso dentre os vertebrados (Nelson, 2016), possuindo 35.016 espécies válidas, distribuídas em 5.194 gêneros (Fricke *et al.*, 2019). A região Neotropical abriga a maior diversidade de peixes de água doce conhecida (McConnell & Lowe-McConnell, 1999), com 71 famílias e 4.475 representantes (Buckup, 2011), sendo que o Brasil apresenta mais de 3.400 espécies dessas espécies (Froese & Pauly, 2018).

Nesse contexto, estudos citogenéticos em peixes se fazem de grande valia para a expansão do conhecimento sobre esse grupo, contribuindo para o entendimento de processos evolutivos, de problemas taxonômicos, biogeográficos e filogenéticos.

1.1. Aspectos gerais da ordem Siluriformes

Os Siluriformes compreendem cerca de 3.730 espécies válidas, alocadas em 40 famílias e 490 gêneros (Nelson, 2016; Fricke *et al.*, 2019), sendo que 1.000 delas ocorrem no Brasil (Buckup *et al.*, 2007). Esses peixes possuem ampla distribuição, sendo encontrados desde ilhas até ambientes costeiros de todos os continentes, exceto na Antártida (Grande & Eastman, 1986). Popularmente conhecidos como acaris, mandis, bagres e cascudos, esses peixes são sedentários, geralmente, encontrados em fundos de rios, com hábitos predominantemente crepusculares e noturnos (Britski, 1991). Morfologicamente, não possuem escamas no corpo, o qual é recoberto por pele espessa ou placas ósseas, não apresentam dentes, possuem três pares de barbilhões, e nadadeiras raiadas, sendo que, o primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitoral é transformado em um espinho (Mess, 1974; Britski *et al.*, 1988; Nelson, 2016).

1.2. Considerações gerais sobre Pimelodidae, com ênfase para *Bergiaria* e *Pimelodus*

Pimelodidae é composta por 114 espécies válidas, distribuídas em 32 gêneros (Nelson, 2016; Fricke *et al.*, 2019). Esses peixes são encontrados em toda a América Central e América do Sul, com exceção da parte sul deste continente (Nelson, 2016), e são popularmente conhecidos

como “mandis” e “bagres” (Britisk *et al.*, 1984). No âmbito taxonômico, a identificação de Pimelodidae ainda é muito imprecisa e apresenta diversos problemas em virtude da ausência de um diagnóstico baseado em relações filogenéticas, fazendo com que muitas espécies sejam posteriormente realocadas após a realização de estudos filogenéticos e moleculares (Garavello & Shibatta, 2007; Girardi *et al.*, 2018).

O gênero *Bergiaria* Eingenmann & Norris, 1900 possui duas espécies (Lundberg & Littmann, 2003; Ferraris Jr., 2007), entre elas, *Bergiaria westermanni* Lutken, 1874, nativa da bacia do Rio São Francisco (Barbosa *et al.*, 2017) e que distingue-se por seus lábios muito desenvolvidos. Já *Pimelodus* La Cepède, 1803 é representado por 36 espécies (Fricke *et al.*, 2019).

Pimelodus fur ocorre na bacia do rio São Francisco (Ribeiro & Lucena, 2006; Barbosa *et al.*, 2017), e exibe padrão de coloração uniforme com pequenos pontos escuros concentrados na porção ântero-lateral do tronco (Garavello & Shibatta, 2007). *Pimelodus microstoma* ocorre na bacia do Alto Rio Paraná, e possui corpo de coloração similar à de *P. fur*, distinguindo-se das demais espécies do gênero pela presença de uma nadadeira adiposa longa, boca pequena e um barbilhão maxilar pequeno (Ribeiro & Lucena, 2006; 2007). *Pimelodus pohli* é endêmica da bacia do Rio São Francisco (Barbosa *et al.*, 2017), possui corpo com coloração semelhante ao das espécies acima citadas, mas diferencia-se pela presença de lábios não desenvolvidos, barbilhões maxilares longos, e uma barra escura no lobo ventral da nadadeira caudal (Ribeiro & Lucena, 2006).

A inclusão das espécies em *Pimelodus* é feita com base em um diagnóstico morfológico (Ribeiro *et al.*, 2008). Em *Pimelodus*, especificamente, alguns fatores dificultam ainda mais a correta identificação taxonômica das espécies, como a semelhança nos padrões morfológicos e o grande número de representantes no gênero (Ribeiro & Lucena, 2006).

Para ilustrar tais dificuldades taxonômicas tem-se o caso de *P. fur* e *P. microstoma*, que devido a identificação taxonômica imprecisa, decorrente de similaridades morfológicas, foram

consideradas espécies sinônimas por muito tempo (Ribeiro & Lucena, 2007). Adicionalmente, tem-se o caso de *Pimelodus heraldoi*, que foi descrita para o Rio Mogi-Guaçu, bacia do Alto Rio Paraná (Azpelicueta, 2001), e que é similar morfológicamente à *P. microstoma*, com as duas sendo distinguidas apenas pelo padrão de cor de *P. microstoma* (Ribeiro & Lucena, 2007), o que permitiu concluir que *P. heraldoi* não é uma espécie distinta de *P. microstoma*, mas sim, um sinônimo júnior desta (Ribeiro & Lucena, 2010)

1.3. Caracterização dos locais de estudo

1.3.1. Bacia do rio São Francisco

A bacia do Rio São Francisco drena 7,5% do território brasileiro (639.219 Km²), sendo a terceira maior do Brasil (CBHSF, 2018), e abrangendo sete estados brasileiros (Sato & Godinho, 2004; CBHSF, 2018). O Rio São Francisco percorre extensão de aproximadamente 2.800 Km desde o início do seu curso, na Serra da Canastra, até a sua foz, no oceano Atlântico entre os estados de Sergipe e Alagoas (Silva *et al.*, 2003; CBHSF, 2018). Essa bacia é dividida em quatro regiões: 1) Alto São Francisco - que vai da nascente até o município de Pirapora – MG; 2) Médio São Francisco - de Pirapora até o lago de Sobradinho, na cidade de Remanso – BA; 3) Sub-Médio São Francisco - de Remanso até a cachoeira da cidade de Paulo Afonso - BA; e, 4) Baixo São Francisco - desta cachoeira até sua foz (Sato & Godinho, 1999; CBHSF, 2018). Uma grande diversidade de peixes é encontrada na bacia do Rio São Francisco, com a ocorrência de 304 espécies, sendo 85 pertencentes à Siluriformes. Os dados para Pimelodidae mostram a ocorrência de apenas 8 espécies, distribuídas em 6 gêneros (Barbosa *et al.*, 2017) (Quadro 1).

1.3.2. Bacia do Rio Paraná

A bacia hidrográfica do Rio Paraná drena uma área de 2.600.000 Km², sendo a segunda maior do Brasil (Latrubesse *et al.*, 2005). O Rio Paraná percorre 4.695 Km, desde o início do seu curso, na confluência dos rios Grande e Paranaíba, na região da Serra da Mata da Corda -

MG, até desembocar no Rio da Prata, na altura da foz do Rio Uruguai (divisa Argentina-Uruguai), sendo 3.809 Km percorridos dentro do território brasileiro (Agostinho & Julio Jr., 1999; Agostinho *et al.*, 2004). No Brasil, o Rio Paraná divide-se em: 1) Alto Rio Paraná – do município de Três Lagoas – MS, até o antigo Salto de Sete Quedas, hoje inundado pelo reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu (Foz do Iguaçu – PR); e 2) Baixo Rio Paraná, que vai da Usina de Itaipu até a conexão com o Rio Paraguai, na Argentina (Agostinho & Julio Jr., 1999; Agostinho *et al.*, 2004). A ictiofauna da bacia do Rio Paraná apresenta 639 espécies de peixes, sendo que destas, 310 ocorrem na região do Alto Rio Paraná, as quais se distribuem em 38 ordens. Para Siluriformes são descritas 127 espécies, das quais 17 pertencem à Pimelodidae (Langeani *et al.*, 2007) (Quadro 1).

1.4. Estudos citogenéticos em Pimelodidae

Das 114 espécies válidas pertencentes à Pimelodidae, somente 34 delas apresentam estudos citogenéticos (Girardi *et al.*, 2018). Grande variação no número diploide ($2n$) é verificada na família, com espécies exibindo desde 50 cromossomos, verificado em *Callophysus macropterus* (Ramirez-Gil *et al.*, 1998), *Luciopimelodus pati* (Sánchez *et al.*, 2010) e *Pirinampus pinirampu* (Swarça *et al.*, 1999; 2001; Vasconcelos & Martins-Santos, 2000; Sanchez *et al.*, 2010); 54 cromossomos, evidenciado em *Megalonema platanum* (Carvalho *et al.*, 2011) e *P. fur* (Garcia & Moreira-Filho, 2005); 56 cromossomos, demonstrado em *Pseudoplatystoma fasciatus* (Fenocchio & Bertollo, 1992); 58 cromossomos, observado em *Pimelodus cf. maculatus* (Souza *et al.*, 2000); à até 60 cromossomos, constatado em *Conorhynchos conirostris* (Marques *et al.*, 2008), classificada atualmente como *incertae sedis* em Siluriformes por não compartilhar nenhuma sinapomorfia com outras espécies de Pimelodidae (Carvalho & Beheregaray, 2018). Entretanto, os dados disponíveis para o grupo indicam o predomínio de $2n = 56$ cromossomos (Girardi *et al.*, 2018), que é sugerido como o $2n$ basal para os Siluriformes (Oliveira & Gosztonyi, 2000; Moraes-Neto *et al.*, 2011).

A pouca quantidade de heterocromatina é característica das espécies de Pimelodidae (Girardi *et al.*, 2018). Geralmente, os blocos heterocromáticos encontram-se alocados nas regiões terminais, centroméricas e/ou pericentroméricas dos cromossomos na maioria das espécies (Dias & Foresti, 1993; Garcia & Moreira-Filho, 2005; Ferreira *et al.*, 2014; Swarça *et al.*, 2017; 2018). Entretanto, em *C. conirostris (incertae sedis)* observa-se a presença de grandes blocos na região terminal da maioria dos cromossomos (Marques *et al.*, 2008). Em relação à localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), na maioria das vezes elas são coincidentes com a heterocromatina (Matoso *et al.*, 2011; Girardi *et al.*, 2018; Malimpensa *et al.*, 2018; Swarça *et al.*, 2018), predominando as RONs simples (Dias & Foresti, 1993; Borin & Martins-Santos, 2002; Treco & Dias, 2009; Carvalho *et al.*, 2010; 2011; Swarça *et al.*, 2013; 2017; 2018), apesar de já ter sido registrada a ocorrência de RONs múltiplas também (Souza *et al.*, 2000)

Somente um caso de sistema de cromossomos sexuais é relatado na família, o do tipo XX/XY, para *Steindachneridion melanodermatum* (Swarça *et al.*, 2006). Porém, a ocorrência de cromossomos B em Pimelodidae pode ser verificada *B. westermanni* (Dias & Foresti, 1993; Malimpensa *et al.*, 2018), *Iheringichtys labrosus* (Vissoto *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2008; Carvalho & Dias, 2005; 2007; Carvalho *et al.*, 2004; 2010; Sánchez *et al.*, 2014), *Megalonema platanum* (Carvalho *et al.*, 2011), *Pimelodus ortmani* (Borin & Martins-Santos, 2004; Girardi *et al.*, 2018) e *P. sp.* (Dias & Foresti, 1993; Borin & Martins-Santos, 2004; Garcia & Moreira-Filho, 2005; 2008).

Dados de citogenética molecular são escassos na família (Marques *et al.*, 2008; Matoso *et al.*, 2011; Sczepanski *et al.*, 2013; Malimpensa *et al.*, 2018; ver revisão Girardi *et al.*, 2018), com a maioria dos estudos se limitando ao mapeamento físico dos genes ribossomais (DNAr) 18S e 5S (Girardi *et al.*, 2018). A maioria das espécies de Pimelodidae apresenta sítios de DNAr 18S geralmente terminais e coincidentes com as RONs, em apenas um único par cromossômico (Swarça *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2004; Garcia & Moreira-Filho, 2008; Swarça *et al.*, 2013; 2017; Girardi *et al.*, 2018;). Já os sítios de DNAr 5S podem estar localizados em apenas um

(Girardi *et al.*, 2018; Swarça *et al.*, 2017; 2018) ou em mais que dois pares cromossômicos (Garcia & Moreira-Filho, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Girardi *et al.*, 2018).

1.5. Aspectos gerais dos cromossomos supranumerários ou B

Presentes em 1.685 espécies de eucariotos (Jones, 2017), os cromossomos B são cromossomos adicionais e dispensáveis no cariótipo de alguns indivíduos/populações de algumas espécies. Geralmente originam-se dos cromossomos do complemento A, mas seguem a sua própria evolução (Camacho, 1993), não sendo essenciais à reprodução, desenvolvimento e sobrevivência dos organismos (Jones & Rees, 1982; Carvalho *et al.*, 2008). Ainda, segundo Jones & Rees (1982), os cromossomos B podem variar em morfologia e frequência numérica, exibem um padrão de herança não-mendeliana, são geralmente compostos por heterocromatina, e não se recombinam com os cromossomos do complemento A. Porém, apesar de sua dispensabilidade, Yoshida *et al.* (2011) evidenciaram que os cromossomos B podem atuar na determinação sexual de fêmeas de cíclideos africanos, assim como verificado por Miao *et al.* (1991), com esses elementos aumentando a resistência à antibióticos do fungo *Nectria haematococca*, favorecendo a sua patogenicidade. Além disso, os Bs podem se acumular em populações naturais, por meio de segregação preferencial ou não-disjunção cromossômica, uma vez que não obedecem as leis de segregação mendeliana (Camacho, 2005; Burt & Trivers, 2006; Jones *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2017).

Diversas classes de genes estão presentes nos cromossomos B, tais como elementos transponíveis (TEs - transposons e retrotransposons), DNAs ribossomais e DNAs satélites (satDNA) (Camacho, 2005), genes para histonas (Hashimoto *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014; Utsunomia *et al.*, 2016), *small nuclear RNA U2* (snRNA U2) (Bueno *et al.*, 2013), o microsatélite (GATA)_n (Malimpensa *et al.*, 2018), DNA organelar (Marques *et al.*, 2013), pseudogenes (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2013). Genes transcricionalmente ativos também já foram identificados nos cromossomos B de alguns organismos, como em *Eyprepocnemis plorans*

(Ruiz-Estévez *et al.*, 2012; Navarro-Dominguéz *et al.*, 2017), *Crepis capillaris* (Leach *et al.*, 2005), *Capreolus pygargus* (Trifonov *et al.*, 2013), *Secale cereale* (Carchilan *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2017) e *Astatotilapia latifasciata* (Ramos *et al.*, 2017).

Na maioria dos organismos portadores, os cromossomos B originam-se dos cromossomos do complemento A (Camacho, 2005). Em *A. latifasciata*, verificou-se sítios do DNAr 18S em regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos B, assim como em 3 pares cromossômicos do complemento A, sugerindo uma possível origem intraespecífica desses B a partir dos cromossomos A portadores de clusters de DNAr 18S (Polleto *et al.*, 2010). Análises posteriores, utilizando sequenciamento de nova geração (NGS), corroboraram essa hipótese por revelarem vários grupos de ligação compartilhados entre os cromossomos A e B da espécie (Valente *et al.*, 2014).

Em *Astyanax paranae*, sítios de DNAr 18S e histona H1 cromossomos Bm (B metacêntrico) e Bsm (B submetacêntrico) dessa espécie e em dois pares cromossômicos do complemento A, levou a conclusão de que estes pares podem ser os possíveis ancestrais dos cromossomos B de *A. paranae* (Silva *et al.*, 2014). Adicionalmente, o compartilhamento de sequências de DNA entre os cromossomos A e B verificados com a pintura cromossômica utilizando sondas de DNA obtidas dos cromossomos Bm e Bsm desse peixe, reforçam tal hipótese (Silva *et al.*, 2014).

1.6. DNAs repetitivos: destaque para os estudos em peixes neotropicais

O genoma dos eucariotos é composto em grande parte por DNAs repetitivos (Martins, 2007), que podem estar distribuídos *in tandem* (DNA satélites - satDNAs, DNAs mini- e microssatélites, e as famílias multigênicas - rDNAs, genes para histonas e genes snRNA), ou dispersos ao longo do genoma, compreendendo os transposons e retrotransposons (Charlesworth *et al.*, 1994; Sumner, 2003).

Os DNAs repetitivos são importantes marcadores citogenéticos, pois auxiliam na compreensão da estrutura e organização do genoma (Silva *et al.*, 2013; Utsunomia *et al.*, 2014; Barbosa *et al.*, 2015), na detecção de rearranjos cariotípicos (Rosa *et al.*, 2012; Traldi *et al.*, 2013; Barros *et al.*, 2017); na elucidação de problemas taxonômicos e filogenéticos (Teixeira *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2011), na caracterização e evolução da ictiofauna (Vicari *et al.*, 2010), e na compreensão da evolução de cromossomos sexuais (Vicari *et al.*, 2008; Schemberger *et al.*, 2011; Traldi *et al.*, 2013; Ziemniczak *et al.*, 2015) e cromossomos B (Polleto *et al.*, 2010; Daniel *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Malimpensa *et al.*, 2018).

Os satDNAs são compostos por 100-300 pares de bases (pb), estão presentes em 1.000-10.000 cópias no genoma e são os principais componentes da heterocromatina (John, 1988; Martins, 2007). Eles vêm sendo muito explorados em peixes neotropicais (Mestriner *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003; Vicari *et al.*, 2010), devido à formação de sequências de satDNA espécie-específicas, organizadas de modos diferentes em cada genoma (Martins, 2007; Milani *et al.*, 2017). Os minissatélites (VNTR – *Variable Number of Tandem Repeat*) possuem 10-60 pb, estão presentes em 5-50 cópias no genoma, e por sua intensa dinâmica evolutiva, são bons marcadores individuais específicos (Martins, 2007). A sequência telomérica (TTAGGG)_n é um minissatélite altamente conservado entre os vertebrados (Meyne *et al.*, 1990). Localizada nos telômeros, ela é responsável por replicar e manter essas regiões estáveis e íntegras evitando, assim, eventos de quebras, recombinação e degradação do DNA (Slijepcevic, 1998; Barros *et al.*, 2017). O mapeamento físico dessa sequência é amplamente utilizado em estudos sobre evolução cariotípica em peixes neotropicais, por permitir a detecção de rearranjos cromossômicos (Margarido & Moreira-Filho, 2008; Cioffi & Bertollo, 2012; Rosa *et al.*, 2012; Traldi *et al.*, 2013; Pucci *et al.*, 2016).

Os microssatélites ou sequências simples repetidas (*Simple Sequence Repeats* - SSRs) são curtas sequências de DNA, de 1-6 pb, repetidas de 5 a 100 vezes por loco no genoma (Eppelen & Eppelen-Haupt, 2002; Martins, 2007), e que estão envolvidas com a estrutura cromossômica e

com o controle da expressão gênica (Pucci *et al.*, 2016). Os SSRs localizam-se preferencialmente nas regiões heterocromáticas dos cromossomos, bem como em cromossomos B e sexuais (Martins, 2007; Scacchetti *et al.*, 2015; Utsunomia *et al.*, 2018). Por seu alto polimorfismo, os SSRs são muito utilizados em estudos sobre a evolução do genoma de diversos organismos (Schneider *et al.*, 2015), incluindo peixes (Cioffi *et al.*, 2011; Terencio *et al.*, 2013; Yano *et al.*, 2014; Scacchetti *et al.*, 2015; Pucci *et al.*, 2016; Gouveia *et al.*, 2017; de Moraes *et al.*, 2017; Utsunomia *et al.*, 2018).

Em eucariotos superiores, o DNAr encontra-se organizado em duas famílias multigênicas distintas, compostas de centenas a milhares de cópias, e responsáveis pela formação das subunidades ribossômicas. A maior família é formada pelo DNAr 45S, que compreende os genes rDNA 18S, 5.8S e 28S. A segunda família é menor, sendo formada pelo DNAr 5S (Martins & Wasco, 2004). Devido ao seu alto grau de conservação molecular, essas sequências se configuram como importantes marcadores citotaxonômicos, auxiliando na compreensão da estrutura do genoma e de relações evolutivas em muitos grupos de peixes (Martins & Galetti Jr., 1999; 2000; Silva *et al.*, 2013; Traldi *et al.*, 2012; 2013; 2016; Swarça *et al.*, 2017).

Outras famílias multigênicas importantes são a dos genes histônicos (H1, H2A, H2B, H3 e H4), responsáveis pela codificação das proteínas histonas (Eirin-López *et al.*, 2004), e a dos snRNAs (genes snRNA U1, U2, U4, U5 e U6), responsáveis pelo processo de splicing do RNA (Valadkhan, 2005). Contrariamente aos DNAs ribossomais, dados citogenéticos referentes ao mapeamento dessas famílias gênicas são restritos a poucas espécies de peixes (Pendás *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 2011; 2012; Lima-Filho *et al.*, 2012; Pansonato-Alves *et al.*, 2013a, 2013b; Costa *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013; 2014; 2016; Utsunomia *et al.*, 2014; 2016; Scacchetti *et al.*, 2015; Getlekha *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017; Yano *et al.*, 2017a; Malimpensa *et al.*, 2018).

1.7. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

A técnica de Hibridização Genômica Comparativa (CGH - *Comparative Genomic Hybridization*), inicialmente desenvolvida para estudos aplicados na análise de células tumorais (Kallioniemi *et al.*, 1992), é uma modificação da metodologia usual de FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*), que utiliza como sonda o DNA genômico total (gDNA) da espécie, e permite comparar o gDNA de indivíduos de uma mesma espécie ou de espécies diferentes, buscando observar a presença de regiões sintênicas ou específicas (Symonová *et al.*, 2015).

Em peixes, a CGH tem se mostrado uma excelente ferramenta em diversos tipos de estudos, como na comparação de genomas entre espécies simpátricas (Symonová *et al.*, 2013), na localização de regiões cromossômicas sexo-específicas (de Freitas *et al.*, 2017), na investigação de homologias entre cromossomos de diferentes espécies (Yano *et al.*, 2017b; Carvalho *et al.*, 2017), na evidenciação da origem e da diferenciação de sistemas de cromossomos sexuais e Bs (Fantinati *et al.*, 2011; de Freitas *et al.*, 2017), na caracterização da composição molecular dos cromossomos (Yano *et al.*, 2017b) e em estudos citotaxonômicos (de Moraes *et al.*, 2017).

1.8. DNA *Barcoding*

A identificação e a classificação de peixes são realizadas baseadas, predominantemente, em caracteres morfológicos, apresentando, assim, algumas limitações, que levam a ocorrência de identificações taxonômicas imprecisas (Hebert *et al.*, 2003). Sendo assim, tornou-se necessária a criação de uma nova metodologia de identificação, que não utilizasse do diagnóstico morfológico.

Atualmente, a abordagem mais utilizada na identificação de espécies é o DNA *barcoding*, que utiliza um fragmento do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I (COI), contendo cerca de 650 pb (Hebert *et al.*, 2003). Esse gene foi escolhido por possuir algumas características importantes: 1) ele codifica proteínas, ou seja, não possui íntrons, nem inserções e deleções (*indels*), além de ter uma taxa muito baixa de recombinação; 2) apresenta *primers* universais

robustos, que amplificam em quase todos os filos animais existentes; 3) exibe uma alta incidência de substituições de bases no nucleotídeo que ocupa a terceira posição dos códons, levando a uma rápida taxa de evolução nesse gene, e permitindo a discriminação não só de espécies estreitamente relacionadas, mas também de grupos filogeográficos dentro de uma mesma espécie (Hebert *et al.*, 2003).

Basicamente, a delimitação de espécies por meio do DNA *barcoding* é feita utilizando o modelo de substituição Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), o algoritmo de *Neighbor-Joining*, para examinar as relações entre os grupos e suas subseqüentes classificações, sendo baseada em dois critérios, a distância e a divergência genética entre os pares de sequências (Hebert *et al.*, 2003). Geralmente, táxons definidos pela metodologia do DNA *barcoding*, exibem baixa distância genética intraespecífica e alta distância interespecífica (Hebert *et al.*, 2004).

1.9. Figuras e Tabelas

Quadro 1. Espécies da família Pimelodidae encontradas nas bacias dos rios São Francisco e Alto Rio Paraná.

Gênero	Espécie	Bacia Hidrográfica
<i>Bagropsis</i>	<i>Bagropsis reinhardti</i>	São Francisco
<i>Bergiaria</i>	<i>Bergiaria westermanni</i>	
<i>Conorhynchus</i>	<i>Conorhynchus conirostris</i>	
<i>Duopalatinus</i>	<i>Duopalatinus emarginatus</i>	
<i>Pimelodus</i>	<i>Pimelodus fur</i>	
	<i>Pimelodus maculatus</i>	
	<i>Pimelodus pohli</i>	
<i>Pseudoplatystoma</i>	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	
<i>Hemisorubim</i>	<i>Hemisorubim platyhynchus</i>	Alto Rio Paraná
<i>Hypophthalmus</i>	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	
<i>Iheringichthys</i>	<i>Iheringichthys labrosus</i>	
<i>Megalonema</i>	<i>Megalonema platanum</i>	
<i>Pimelodus</i>	<i>Pimelodus absconditus</i>	
	<i>Pimelodus fur</i> *	
	<i>Pimelodus heraldoi</i> **	
	<i>Pimelodus maculatus</i>	
	<i>Pimelodus ornatus</i>	
	<i>Pimelodus paranaensis</i>	
<i>Pimelodus platicirris</i>		
<i>Pinirampus</i>	<i>Pinirampus pirinampu</i>	
<i>Pseudoplatystoma</i>	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	
	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	
<i>Sorubim</i>	<i>Sorubim lima</i>	
<i>Steindachneridion</i>	<i>Steindachneridion scriptum</i>	
	<i>Steindachneridion punctatum</i>	
<i>Zungaru</i>	<i>Zungaru jahu</i>	

Nomes de espécies atualizados: * *Pimelodus microstoma*; ** *Pimelodus microstoma*

2. JUSTIFICATIVA

Pimelodidae abriga um número significativo de espécies válidas (114 espécies), entretanto, poucas delas são caracterizadas citogeneticamente, principalmente do ponto de vista da citogenética molecular. Sob a ótica da taxonomia, a identificação das espécies ainda é muito imprecisa e apresenta diversos problemas. Nesse cenário, Pimelodidae se configura como um grupo que oferece muitas abordagens ainda em aberto para estudos de taxonomia, sistemática e de diferenciação e evolução cromossômica.

O mapeamento cromossômico dos DNAs repetitivos tem se configurado como uma ferramenta promissora na elucidação de problemas taxonômicos, no entendimento da estrutura e composição do genoma, na detecção de rearranjos cromossômicos e na identificação e evolução dos cromossomos B e sexuais, permitindo a elaboração de hipóteses mais sólidas sobre a evolução cromossômica nesses organismos. Em Pimelodidae, os dados de citogenética clássica evidenciam uma conservação em diversas características citogenéticas na maioria das espécies, justificando a importância da utilização dos DNAs repetitivos.

Outra característica importante do genoma eucarioto que vem sendo explorada é a ocorrência de cromossomos B em algumas espécies. Em Pimelodidae, a maioria das informações sobre esses elementos referem-se somente à sua caracterização geral, sem aprofundamento em aspectos da composição e origem dos mesmos. Neste contexto, a escassez de dados sobre esses elementos justifica o emprego do CGH, permitindo a melhor compreensão a respeito da origem e conteúdo genômico dos cromossomos B de *Bergiaria westermanni*. Adicionalmente a utilização dessa técnica pode auxiliar, juntamente com a aplicação da metodologia de DNA *barcoding*, na citotaxonomia do grupo e na delimitação das espécies, possibilitando uma melhor definição do status taxonômico de espécies de Pimelodidae, bem como da inferência de relações filogenéticas no grupo.

Nesse contexto, novos estudos envolvendo a localização *in situ* de diferentes tipos de DNAs repetitivos, a aplicação do CGH e a técnica de DNA *barcoding* serão de grande valia para expandir

os conhecimentos sobre a citotaxonomia, diversificação e evolução cariotípica, conteúdo genômico, e relações filogenéticas em Pimelodidae.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou estudar a diversificação cromossômica e a caracterização molecular em algumas espécies de Pimelodidae, a fim aprofundar conhecimentos sobre a evolução cariotípica e a taxonomia desse grupo, com enfoque em um conjunto de espécies morfológicamente similar, constituído por representantes dos gêneros *Pimelodus* e *Bergiaria*. Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Caracterizar o cariótipo das espécies *Bergiaria westermanni*, *Pimelodus fur*, *Pimelodus microstoma*, *Pimelodus pohli*, e por diferentes metodologias da citogenética clássica e molecular,
- 2) Investigar a organização genômica dos cromossomos B presentes em *B. westermanni* e sua provável origem nesta espécie.
- 3) Analisar o compartilhamento genômico e a distribuição cromossômica de diferentes classes de DNAs repetitivos, inferindo sobre seu papel na diferenciação dessas espécies.
- 4) Inferir sobre as relações existentes entre as espécies investigadas a partir das análises de seqüenciamento de genes mitocondriais e das características cromossômicas apresentadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras coletadas

Foram coletados exemplares de três espécies do gênero *Pimelodus* e uma do gênero *Bergiaria*, provenientes das bacias dos rios São Francisco e Paraná (Tab. 1; Figs. 1, 2, e 3). Todas as coletas foram realizadas com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio - licença N° 10538-1). Os exemplares das espécies foram capturados com o uso de tarrafas, arrastões e peneiras, e transportados vivos, em condições de oxigenação e temperatura adequadas, para o Laboratório de Citogenética de Peixes (LCP), do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), onde foram mantidos vivos em aquários aerados até serem processados para a obtenção cromossômica. Foram armazenados tecidos dos exemplares coletados, para extração de gDNA. Os experimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (número do processo CEUA 1926260315) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Brasil.

Os exemplares de *B. westermanni* foram identificados pela Prof^a. Dr^a. Carla Simone Pavanelli, e encontram-se depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), estado do Paraná, Brasil. Já os espécimes de *P. fur*, *P. microstoma* e *P. pohli* foram identificados pelo Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta e encontram-se depositados na Coleção Ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), estado do Paraná, Brasil (Tab. 1).

4.2. Metodologia Citogenética Clássica

4.2.1. Obtenção de cromossomos mitóticos

Os cromossomos mitóticos foram obtidos segundo o protocolo de Bertollo *et al.* (2015). Foi injetado em cada espécime, intra-abdominalmente, uma solução aquosa de Colchicina 0,025%, na proporção de 1mL /100g de peso, mantendo os peixes em aquário aerado por 50 minutos. Após, os

espécimes foram anestesiados com óleo de cravo (Griffiths, 2000) e sacrificados, e porções do rim foram retiradas. O material foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M), sendo transferido para cubas de vidro contendo cerca de 10 mL desta mesma solução. O material foi bem fragmentado, com o auxílio de pinças de dissecação, sendo completado este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, por meio de leves movimentos de aspiração e expiração do material, até se obter uma suspensão celular homogênea. Após, esta suspensão foi incubada a 37°C por 20 minutos. O material foi ressuspenso cuidadosamente com uma pipeta Pasteur, transferido para um tubo de centrífuga, e adicionou-se algumas gotas de fixador (metanol:ácido acético - 3:1). O material foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 500-800rpm, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 5-7mL de fixador, e o material foi novamente homogeneizado com a pipeta Pasteur, com este passo sendo repetido mais duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1mL de fixador, misturando bem o material, que foi acondicionado em tubos de plástico tipo Ependorff e guardado no refrigerador. Pingou-se 1-3 gotas da suspensão celular sobre uma lâmina limpa a 25-30°C, deixando-a secar ao ar, com posterior coloração com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), (pH 6,8), por 7 minutos.

4.2.2. Bandamento C

Seguiu-se o procedimento descrito por Sumner (1972). As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2N por 10 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar. Após, foram incubadas em solução aquosa de hidróxido de bário $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 5% a 60°C, por 1 minuto, e lavadas em água destilada, secando ao ar. Seguiu-se a incubação em solução salina de 2xSSC durante 30 minutos a 60°C, lavando com água destilada. Por fim, realizou-se a coloração com solução de iodeto de propídio (50 µg/mL) e 20 µL de anti-fading (Lui *et al.*, 2012).

4.2.3. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)

Seguiu-se o protocolo descrito por Howell & Black (1980). Sobre a lâmina contendo os cromossomos foram adicionadas duas gotas de solução aquosa de gelatina (1g/100mL de água destilada e 0,5mL de ácido fórmico) juntamente com quatro gotas de solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3) 50%, sendo incubada em estufa a 60°C por cerca de 8 minutos. Após, a lâmina foi lavada em água destilada e corada rapidamente por 30 segundos com Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato (pH 6,8).

4.3. Metodologia Citogenética Molecular

4.3.1. Bandamento CDD

Foi seguido o protocolo de Rabová *et al.* (2015). A lâmina foi desidratada em série alcóolica (70%, 90% e 100%) por 2 minutos cada e seca ao ar. Após, foi incubada em tampão McIlvaine (MgCl_2) por 10 minutos. Em seguida, a lâmina foi incubada, em câmara úmida, com 150 μL de solução de cromomicina A_3 (CMA_3), por 15 minutos em temperatura ambiente, seguida de lavagem com tampão McIlvaine. Após, incubou-se a lâmina em tampão McIlvaine com Metil Green, por 15 minutos em temperatura ambiente, seguida de rápida lavagem com tampão McIlvaine. Foi feita a coloração com DAPI, deixando agir por 20 minutos em temperatura ambiente, com lavagem final em tampão McIlvaine. Por fim, montou-se a lâmina com lamínula utilizando 100 μL de antifading. Até a análise, as lâminas foram mantidas no escuro, na geladeira, por cerca de uma semana.

4.3.2. Isolamento de DNAs repetitivos

Sequências de DNAr 18S e DNAr 5S foram amplificadas utilizando-se os clones de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* obtidos por Hatanaka & Galetti Jr. (2004) e os clones de DNAr 5S de *Leporinus elongatus* obtidos por Martins & Galetti Jr. (1999). Realizou-se o procedimento de Mini-preparação plasmidial a partir de colônias de *Escherichia coli* transformadas pela inserção dos genes de interesse acoplados ao plasmídio M13, armazenadas a -80°C (tópico 4.4.2). Para a

realização de sequenciamento nucleotídico, sequências de DNAr 5S foram amplificadas usando o gDNA de *B. westermanni* e o par de primers específicos (Pendás *et al.*, 1994).

Na amplificação das demais sequências repetitivas (snRNA U1 e U2, e histonas H1, H3 e H4), tanto para produção de sondas para FISH quanto para a realização do sequenciamento, foi utilizado o gDNA de cada espécie, e os respectivos primers de cada sequência (Tab. 2). As reações foram realizadas para um volume final de 25µl, contendo 100-200 ng de DNA genômico, 0,2µM de cada primer, 0,16 mM de dNTPs, 1U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1,5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), Tampão 10x e água destilada. As condições do ciclo de PCR são descritas a seguir: 1) rDNA 5S - 95°C/5 min, 30 ciclos de 95°C/30 seg, 56°C/45 seg, e 72°C/2 min, e etapa final de 72°C/7 min; 2) snRNA U1 – 95°C/5 min, 95°C/30 seg, 30 ciclos de 51,7°C/45 seg, 72°C/45 seg, com etapa final de 72°C/5 min; 3) snRNA U2 - 95°C/45 seg, 30 ciclos de 95°C/45 seg, 52°C/45 seg, 72°C/1 min e 20 seg, com etapa final de 72°C/7 min; 4) Histonas H1, H3 e H4 - 95 °C/5 min, 30 ciclos de 95 °C/30 seg, 52 °C/45 seg, 72 °C/1 min e 20 seg, e etapa final de 72 °C/7 min.

O DNA telomérico (TTAGGG)_n e a sequência (GATA)_n foram amplificados na ausência de DNA molde utilizando primers específicos (Tab. 2) e o seguinte mix de reação de PCR, para um volume final de 25µl: 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 µM de cada primer, 160 µM de dNTPs, 2U de Platinum® Taq DNA polimerase, Tampão 10x e água destilada. As condições do ciclo de PCR foram: 94°C/5 min, 9 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/30 seg, 72°C/1 min, 29 ciclos de 94°C/1 min, 60°C/30 seg, 72°C/90 seg, com etapa final de 72°C/5min.

4.3.3. Marcação das sondas

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, utilizando os compostos biotina 16-dUTP e digoxigenina 11-dUTP (Roche), segundo as orientações do fabricante. Após, a sonda foi precipitada com acetato de potássio e etanol *overnight* a -20°C. Posteriormente, o material foi centrifugado por 15 minutos a 13.000rpm, descartando-se o sobrenadante, deixando o DNA

marcado secar completamente em estufa a 37°C. As sondas de DNAr 18S, H1, H3 e H4 foram marcadas com biotina 16-dUTP, enquanto as sondas de DNAr 5S, snRNA U1 e U2, (TTAGGG)_n e (GATA)_n foram marcadas tanto com biotina 16-dUTP quanto com digoxigenina 11- dUTP.

4.3.4. Hibridização *in situ* fluorescente

A localização dos sítios dos DNAs repetitivos (DNAr 18S e 5S, snRNAs U1 e U2, histonas H1, H3 e H4, as sequências (GATA)_n e (TTAGGG)_n nos cromossomos foi obtida por Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Pinkel *et al.*, 1986). Também foram utilizados como sondas doze oligonucleotídeos enriquecidos com microsatélites: (C)₃₀, (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAG)₁₀, (CGG)₁₀, (CAT)₁₀, (GAA)₁₀, (GAC)₁₀, (GAG)₁₀, (TAC)₁₀. Esses oligonucleotídeos foram marcados diretamente com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese (Sigma, St. Louis, MO, USA).

4.3.4.1. Hibridização simples *in situ* fluorescente (Simple-FISH)

As lâminas foram incubadas em RNase (0,4% RNase/2xSSC) por 37°C/1 hora, em câmara úmida. Após a desnaturação realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C/4 min, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol (50% e 100%) por 5 minutos cada. O mix de hibridação consistiu de 12µL de sonda, 30µL de formamida (concentração final de 50%), 12µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6µL de 20xSSC, por lâmina. A hibridação foi feita em câmara úmida a 37°C/16h, e posteriormente lavadas 2xSSC (2 vezes) a 37°C/6min cada e posteriormente incubadas em 1xPBD (200mL de 20xSSC, 6mL de Triton 100, 10g de leite desnatado, 800mL de água destilada). Os sinais foram detectados com avidina-FITC ou anti-digoxigenina-rodamina, com etapa final de coloração com solução de antifading + DAPI (Vector, Burlingame, CA, EUA).

Especificamente em relação aos microsatélites, a FISH foi realizada segundo o protocolo de Kubat *et al.* (2008). As lâminas foram incubadas em RNase (0,4% RNase/2xSSC) por 37°C/1h, em câmara úmida. Após a desnaturação realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C/2 min e

30 seg, seguiu-se a desidratação em série alcoólica de etanol (50% e 100%) por 2 minutos cada. O mix de hibridação consistiu de 2µL de sonda a 100ng/µL, 12,5µL de formamida, 5µL de sulfato de dextrano 50% e 2,5µL de 20xSSC, por lâmina. A hibridação foi feita em câmara úmida a 37°C/16h, com lavagem final em 2xSSC e 1xSSC por 5 minutos cada. As lâminas foram então desidratadas em série alcoólica de etanol (50%, 70% e 100%) 5 minutos cada, e os cromossomos foram corados com solução de antifading + DAPI.

4.3.4.2. Hibridização dupla *in situ* fluorescente (Double-FISH)

As lâminas foram incubadas em RNase (0,4% RNase/2xSSC) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 minutos, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada. Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50µL da solução de hibridação permanecendo por 16 horas a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60°C, por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubadas com 90µL de tampão NFDM a 5%, por 15 minutos em câmara úmida e lavadas duas vezes com Tween 20. Para a detecção das sondas, foram colocados sobre as lâminas 100µL do mix contendo 94µL de NFDM, 1µL de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidin) conjugada e 5µL de anti-digoxigenina rodamina conjugada, permanecendo por 60 minutos a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas três vezes em Tween 20, durante cinco minutos cada. Em seguida, realizou-se a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, com banhos compostos por 5 minutos cada. Por fim, os cromossomos foram corados com solução de antifading + DAPI (Vector, Burlingame, CA, EUA).

4.3.5. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

4.3.5.1. Preparação das sondas

Para cada hibridização foi produzida uma sonda específica, utilizando-se 500 ng de gDNA de cada espécie, que foram marcados com Biotin-Nick-Translation Mix (Roche), para o gDNA de *B. westermanni*, e com Dig-Nick-Translation Mix (Roche), para os gDNAs das outras três espécies estudadas, segundo recomendações do fabricante. O DNA C₀t-1 (fração do gDNA enriquecido para sequências moderada- e altamente repetitivas) foi utilizado como bloqueador de sequências repetitivas comuns aos genomas das espécies, de acordo com o protocolo de Zwick *et al.* (1997). A sonda final produzida foi composta de 500 ng do gDNA marcado de cada espécie mais 13 µg de DNA C₀t-1 das respectivas espécies. Esse mix foi precipitado em etanol 100%, e os *pellets* foram secos e ressuspensos em tampão de hibridização (20 µL por lâmina) contendo formamida 50% + 2xSSC + SDS 10% + sulfato dextrano 10% + tampão Denhardt's pH7.0.

4.3.5.2. FISH para CGH

As hibridizações seguiram o protocolo de Symonová *et al.* (2015), com algumas modificações. Lâminas contendo cromossomos de *B. westermanni* foram envelhecidas (37°C/2h), seguindo-se os tratamentos com RNase (37°C/90min) e pepsina (37°C/3min). Após, seguiu-se a desnaturação dos cromossomos em formamida 75% 2xSSC, pH 7.0 (74°C/3min), seguida de série alcóolica (70%, 85% e 100% - 2 min cada). O mix de hibridização foi desnaturado (86°C/6 min, gelo/10 min) e as lâminas incubadas por 3 dias a 37°C. Após, as lâminas foram lavadas em formamida 50% 2xSSC pH 7.0 (44°C/10min) e três vezes no 1xSSC (44°C/7min), seguido de incubação em leite em pó 3%. Os sinais foram detectados com avidina-FITC (Sigma) e anti-digoxigenina-rodamina (Roche). Por fim, os cromossomos foram corados com solução de antifading + DAPI.

4.3.6. Análise dos resultados citogenéticos

Os resultados obtidos pela citogenética clássica foram analisados em microscópio óptico comum. As preparações de citogenética molecular foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados. As imagens selecionadas foram capturadas através do *software* DP2-BSW, com câmera (Olympus DP-72) acoplada a um microscópio Olympus BX51. As imagens capturadas foram analisadas e processadas utilizando o *software* Adobe® Photoshop CS5 Extended. Após a captura, os homólogos foram pareados e a morfologia cromossômica foi determinada seguindo a classificação proposta por Levan *et al.* (1964). O número fundamental (NF) foi determinado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços cromossômicos e os acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço (Matthey *et al.*, 1945).

4.4. Metodologia Molecular

4.4.1. Extração de DNA

O gDNA dos exemplares das espécies foi extraído segundo protocolo de por Sambrook *et al.* (2001). Pequenos pedaços do fígado foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido, e em seguida, adicionou-se 700 µL de solução de digestão (NaCl 0,4M; EDTA 0,1M pH 8,0; Tris-HCl 0,01M; Proteinase K – 100µg/mL e SDS 0,1%), e as amostras foram incubadas a 55°C/2h. Após, o DNA foi extraído fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), o material foi agitado suavemente por 20 minutos, com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, ao qual acrescentou-se NaCl 1M e 2 volumes de etanol 100% gelado. O material foi agitado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, descartando o sobrenadante. Em seguida, o DNA foi precipitado em 200 µL de álcool 70% gelado, e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante. A secagem do DNA foi realizada em estufa a 37°C, e depois, este foi ressuspendido em TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM). Por fim, o DNA foi quantificado em gel de agarose 1%, com auxílio do marcador de peso molecular Low

DNA Mass Ladder (Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA).

4.4.2. Purificação e Clonagem das sequências repetitivas

Os produtos de PCR das sequências DNAr 5S, snRNAU2 e histonas H1, H3 e H4 de *B. westermanni*, foram purificados utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare™, Chicago, Illinois, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, esses produtos foram ligados ao plasmídeo pTZ57R, utilizando-se o Kit “*InsT/Aclone PCR Product Cloning*” (Fermentas™, Waltham, Massachusetts, EUA), segundo as instruções do fabricante.

Foram colocados 10 µL do plasmídeo + inserto nos tubos onde se encontravam as bactérias competentes (*Escherichia coli* DH5α) previamente produzidas. Os tubos foram submetidos a um choque térmico a 42°C/90seg e transferidos para o gelo, onde permaneceram por mais 1 minuto. Em seguida, adicionou-se a cada tubo 800 µL de meio LB líquido a temperatura ambiente. Os tubos foram incubados a 37°C/1h, e depois centrifugados, por 2 min, a 5.000 rpm. Descartou-se 600 µL do meio líquido excedente e o produto da transformação foi ressuspensionado no restante do meio líquido, e espalhado em placas de Petri estéreis, contendo meio de cultura sólido, ampicilina (1 µL /mL de meio sólido), 50 µL de IPTG (200 mM) e 40 µL de X-Gal (0,2%). As placas foram incubadas em estufa a 37°C/16h e as colônias de coloração brancas, potencialmente portadoras do inserto de interesse nos plasmídios, foram selecionadas. Após, essas colônias foram transferidas para tubos de 15 mL contendo 4 mL de meio LB líquido acrescidos de ampicilina (100 mg/mL), e permaneceram em crescimento *overnight* sob agitação de 200 rpm a 37°C. Posteriormente, centrifugou-se a cultura bacteriana por 30seg em velocidade máxima, com o sobrenadante sendo descartado e o processo sendo repetido até acabar toda a cultura bacteriana.

Os plasmídeos bacterianos foram extraídos por meio de mini-preparação plasmidial. O “*pellet*” foi ressuspensionado em 200 µL do tampão de lise I (60 µL de RNase, 300 µL de Tris-HCl 1 M, 60 µL de EDTA 0,5 M, 2580 µL de H₂O) e misturado vigorosamente. Após, 200 µL do

tampão de lise II (600 µL de NaOH 1M, 300 µL de SDS 10%, 2100 µL de H₂O) foi adicionado, invertendo o tubo por 20 vezes. Após, adicionou-se 400 µL do tampão de lise III (1800 µL de acetato de potássio 5 M, 345 µL de ácido acético, 855 µL de H₂O) e o tubo foi invertido por mais 20 vezes. O tubo foi centrifugado por 4 min, em velocidade máxima, separando o sobrenadante dos resíduos sólidos, que foram descartados. O sobrenadante foi retirado e passado para uma minicoluna (acoplada a um tubo de 2 mL), que foi centrifugada por 1 min em velocidade máxima. O líquido no tubo coletor foi descartado e a minicoluna foi acoplada novamente ao tubo. Após, 400 µL do tampão de lavagem foi adicionado à minicoluna que foi centrifugada por 1 min em velocidade máxima. O líquido foi descartado e a centrifugação foi repetida por mais 30 seg em velocidade máxima. Após, um novo tubo foi acoplado à minicoluna, acrescentando-se 40 µL do tampão de eluição. Por fim, centrifugou-se por mais 30 seg, em velocidade máxima, para a recuperação do DNA. A minicoluna foi descartada e o tubo com o DNA purificado foi armazenado em freezer a -20°C.

4.4.3. Amplificação do gene citocromo C oxidase subunidade I (COI)

O gene mitocondrial da citocromo C oxidase subunidade I (COI) foi amplificado por PCR, utilizando o gDNA das espécies estudadas, em 5 indivíduos de *B. westermanni*, 5 de *P. microstoma* e 5 de *P. pohli*, e para o único espécime de *P. fur*, conforme protocolo descrito por Bellafronte *et al.* (2013), utilizando-se os primers FISH F1 e FISH R1 (Ward *et al.*, 2005). A reação de PCR, para um volume final de 25 µL, foi composta de 2,5 µL de tampão 10x (sem cloreto), 0,7 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de cada primer (10mM), 4,0 µL de dNTPs mix (1,25mM), 0,2 µL de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), 1,0 µL de gDNA (50 ng/µl) e 15,6 µL de água destilada ultrapura. As condições do ciclo de PCR foram: 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C/ 30 seg, 54°C/30 seg, 72°C/1min, e etapa final de 72°C/10 min. Após a amplificação, os fragmentos do gene COI foram purificados utilizando o Kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EUA), de acordo com as recomendações

do fabricante.

4.4.4. Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico dos clones obtidos das sequências repetitivas e dos produtos de PCR do gene COI foi realizado utilizando-se o kit “*DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing*” (Amersham Biosciences™ – ABI, Little Chalfont, Reino Unido), e o sequenciador *ABI-PRISM Genetic Analyzer* (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA).

4.4.5. Análise das sequências

Para identificação de possíveis homologias, as sequências foram submetidas a uma análise de identidade no banco de dados BLAST_n (Altschul *et al.*, 1990) através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (EUA), “*website*” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Adicionalmente, as sequências de DNAs repetitivos obtidas foram utilizadas na busca de identidade na base de dados de DNAs repetitivos RepBase (Girinst) (<http://www.girinst.org/censor/index.php>) utilizando a ferramenta CENSOR (Kohany *et al.*, 2006). Todas as sequências obtidas (DNAs repetitivos e COI) foram alinhadas, utilizando o algoritmo ClustalW, e editadas manualmente usando o *software* Geneious R7 v7.1.3 (Kearse *et al.*, 2012). A sequência do gene COI de *P. fur* foi alinhada com uma sequência disponível no NCBI para a espécie, pelo fato de possuímos apenas um exemplar para a análise. Todas as sequências obtidas (DNAs repetitivos e COI) serão depositadas no GenBank.

4.4.5.1. Análise dos dados do gene COI

Após a edição das foram estimadas as médias intra- e interespecíficas utilizando o modelo Kimura-2- parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) no *software* MEGA v5.2 (Tamura *et al.*, 2011). As unidades taxonômicas operacionais moleculares (*Molecular Operational Taxonomic Units* – MOTUs; Blaxter *et al.*, 2005; Galimberti *et al.*, 2012), foram delimitadas utilizando duas

abordagens: uma tradicional (distância – DNA *barcoding* – Hebert *et al.*, 2003) e outra baseada em coalescência (GMYC, Pons *et al.*, 2006, e bPTP, Zhang *et al.*, 2013).

Para a análise de distância, foi determinado o *threshold*, que representa o valor limite entre distâncias intraespecíficas e interespecíficas. Para tal, utilizamos o valor padronizado de 2% adotado para a identificação dos peixes Neotropicais (Pereira *et al.*, 2013), e um outro valor, calculado a partir do nosso conjunto de dados (ótimo *threshold* - OT), que foi estimado pela função “LocalMinima” do pacote SPIDER (*SPecies IDentity and Evolution in R*; Brown *et al.*, 2012) para a plataforma R (<http://www.R-project.org>). Posteriormente, estes valores foram utilizados pelo *software* jMOTU (Jones *et al.*, 2011) para a obtenção das MOTUs. Após, a topologia de *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) foi construída para representar graficamente as divergências intra- e interespecíficas, utilizando o modelo K2P e o método de *bootstrap* (1.000 réplicas) para suporte dos agrupamentos (Felsenstein, 1985).

Além da análise de distância, utilizamos outra abordagem, mais robusta estatisticamente e baseada em coalescência. Essa abordagem envolve dois métodos: o GMYC (*General mixed Yule Coalescent*), que utiliza uma árvore ultramétrica para analisar, baseado no comprimento dos ramos dessa árvore, a divergência nas taxas de ramificação entre os eventos de especiação e extinção (relações interespecíficas) e os eventos de coalescência (relações intraespecíficas) (Pons *et al.*, 2016). Assim, com o *software* jModelTest 3.7 (Posada, 2008), foi determinado o melhor modelo de substituição nucleotídica para as espécies em estudo, utilizando o critério de informação bayseana (BIC) (Lanfear *et al.*, 2012). Após, a árvore ultramétrica foi construída, utilizando s espécies *Megalonema argentinum* (Números GenBank: KU289066.1 e KU288957.1) e *Megalonema* sp. (Número GenBank: KT952414.1) como grupos externos, com o *software* BEAST v.2.2.1 (Bouckaert *et al.*, 2014), sob as seguintes condições: relógio molecular relaxado com uma distribuição de lognormal; taxa mutacional de 0,012 (ou 1,2% a cada 1 milhão de anos; Bermingham *et al.*, 1997), para calibrar nossa árvore e estimar os tempos de divergência entre as MOTUs; e o modelo de especiação *birth-death* (Costa-Silva *et al.*, 2015). Utilizamos quatro cadeias

independentes de Markov (MCMC) a partir de árvores aleatórias e corridas com 10 milhões de gerações, com parâmetros e árvores sendo salvas a cada 1.000 gerações. Para o *burn-in* foram descartadas 25% das topologias, e os arquivos de *log* e *trees* foram combinados pelo *software* LogCombiner v.1.8.0 (Drummond *et al.*, 2012). A mixagem apropriada dos dados foi verificada com o *software* Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond, 2007), com o tamanho efetivo da amostragem (ESS – *effective sample size*) igual a 200 ou mais sendo necessário para todos os parâmetros. De posse da árvore ultramétrica, o método GMYC foi realizado no pacote SPLITS (*SPecies LIimits by Threshold Statistics*; Monaghan *et al.*, 2009) do *software* R, utilizando o método de *threshold* único e parâmetro de intervalo padrão (intervalo = c(1,10)).

A análise bPTP (*A Bayesian Implementation Poisson Tree Processes*) utiliza uma árvore não-ultramétrica para obter a taxa de especiação diretamente do número de substituições. Assim o método assume que o número de substituições entre espécies é significativamente maior do que o número de substituições entre espécies. De maneira geral, GMYC e bPTP pretendem identificar as mudanças significativas no ritmo dos eventos de ramificação da árvore. Entretanto, GMYC usa o tempo para identificar pontos de transição de taxa de ramificação, enquanto PTP usa diretamente o número de substituições (Zhang *et al.*, 2013).

Para a análise do bPTP, uma árvore não-ultramétrica foi estimada no *software* de inferência bayseana MrBayes (Zhang *et al.*, 2013). A análise de delimitação de espécies foi realizada no servidor <https://species.h-its.org/ptp/>. Os parâmetros utilizados foram: 400.000 gerações de cadeias MCMC e *burn-in* de 0,1, considerando *M. argentinum* e *M. sp* como grupo externo.

4.6. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Espécies coletadas e informações de seus respectivos pontos de coleta.

	Localidade	Município	Bacia	Sexo		Número de Depósito	Latitude/Longitude
				♀	♂		
<i>Bergiaria westermanni</i>	Rio São Francisco	Piumhi (MG)	São Francisco	13	2	NUP 18792	S - 20° 22' 6,7"
						NUP 18793	O - 45° 59' 0,01"
<i>Pimelodus fur</i>	Rio São Francisco	Piumhi (MG)	São Francisco	0	1	MZUEL 19081	S - 20° 20' 21,1"
							O - 45° 58' 48,9"
<i>Pimelodus pohli</i>	Rio São Francisco	Vargem Bonita (MG)		9	8		S - 20° 19' 30,36"
			São Francisco			MZUEL 19072	O - 46° 22' 38,10"
						MZUEL 19076	
	Rio Piumhi	Piumhi (MG)		19	11	MZUEL 19080	S - 20° 21' 23,2"
							O - 45° 58' 54,6"
<i>Pimelodus microstoma</i>	Rio Mogi-Guaçu	Pirassununga (SP)	Alto Paraná	40	27	MZUEL 19069	
						MZUEL 19070	
						MZUEL 19071	S - 21° 55' 33,8"
						MZUEL 19073	O - 47° 22' 06,0"
						MZUEL 19074	

Tabela 2. Sequências de DNAs repetitivos amplificadas e seus respectivos *primers*.

Sequência	Primers Utilizados	Referência
rDNA 5S	5S A 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	(Pendás <i>et al.</i> , 1994)
	5S B 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA-3'	
snRNA U1	U1F 5'-CTTACCTGGCGTRGRGGWY-3'	(Cabral-de-Mello <i>et al.</i> , 2012)
	U1R 5'-CAKTCCRRCTACCAAAAATT-3'	
snRNA U2	U2F 5'-ATCGCTTCTCGGCCTTATG-3'	(Bueno <i>et al.</i> , 2013)
	U2R 5'-TCCCGGCGGTACTGCAATA-3'	
Telomérica	(TTAGGG) ₅	(Ijdo <i>et al.</i> , 1991)
	(CCCTAA) ₅	
(GATA) _n	(GATA) ₇	(Eppelen <i>et al.</i> , 1982)
	(TATC) ₇	
H1	5'-ATGGCAGAARYCGCMCCAGC-3'	(Ziemniczak, dados não publicados)
	5'-TACTTCTTCTGGGSGCTGC-3'	
H3	5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3'	(Colgan <i>et al.</i> , 1998)
	5'-ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC-3'	
H4	H4 F2s 5'-TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC-3'	(Pineau <i>et al.</i> , 2005).
	H4 F2er 5'-CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT-3'	

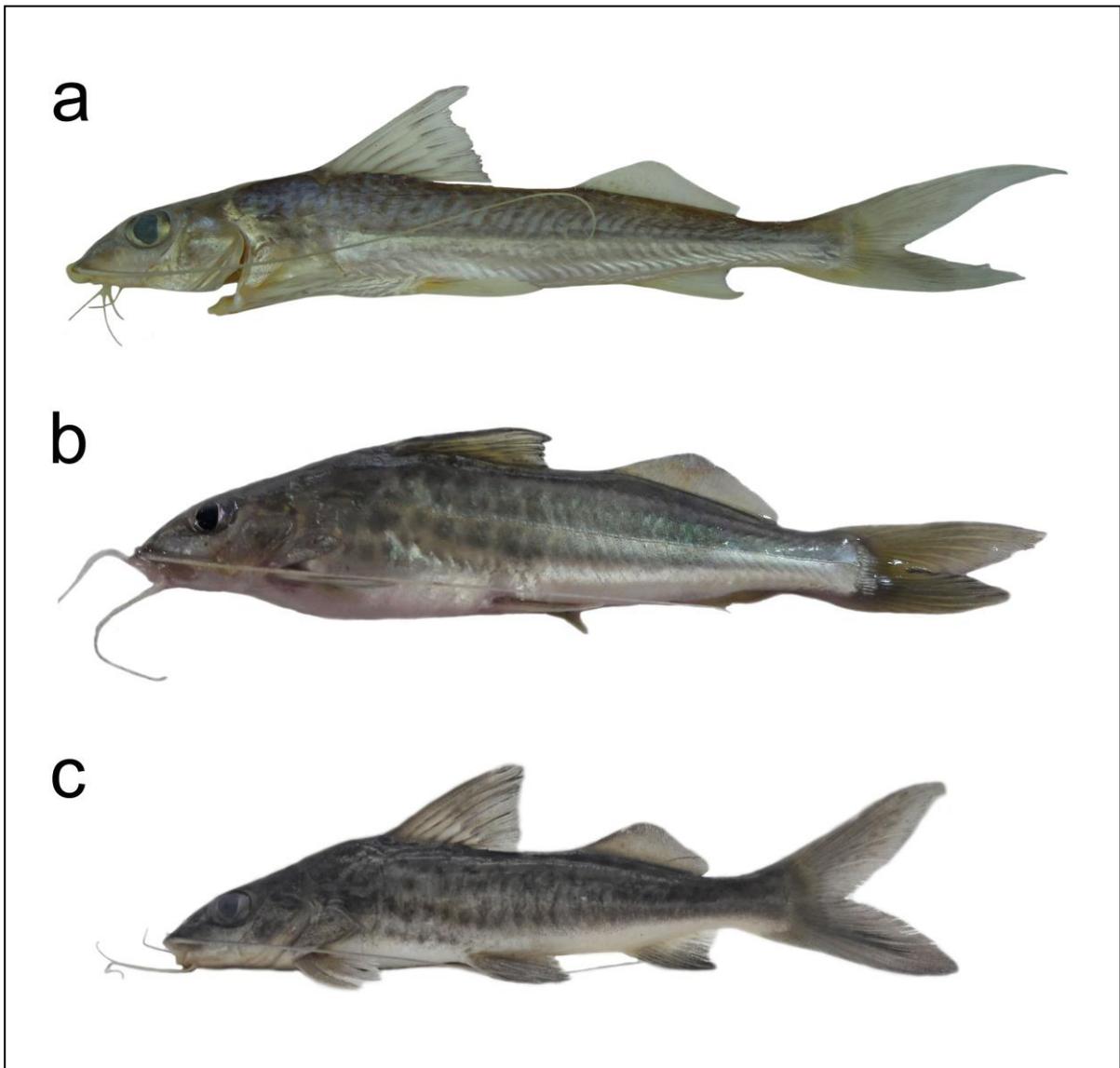


Figura 1. Fotos de exemplares de *Bergiaria westermanni* (a); *Pimelodus microstoma* (b) e *Pimelodus pohli* (c). **Fonte:** autoria própria.



Figura 2. Foto de exemplar de *Pimelodus fur*. **Fonte:** Stefani, 2010.

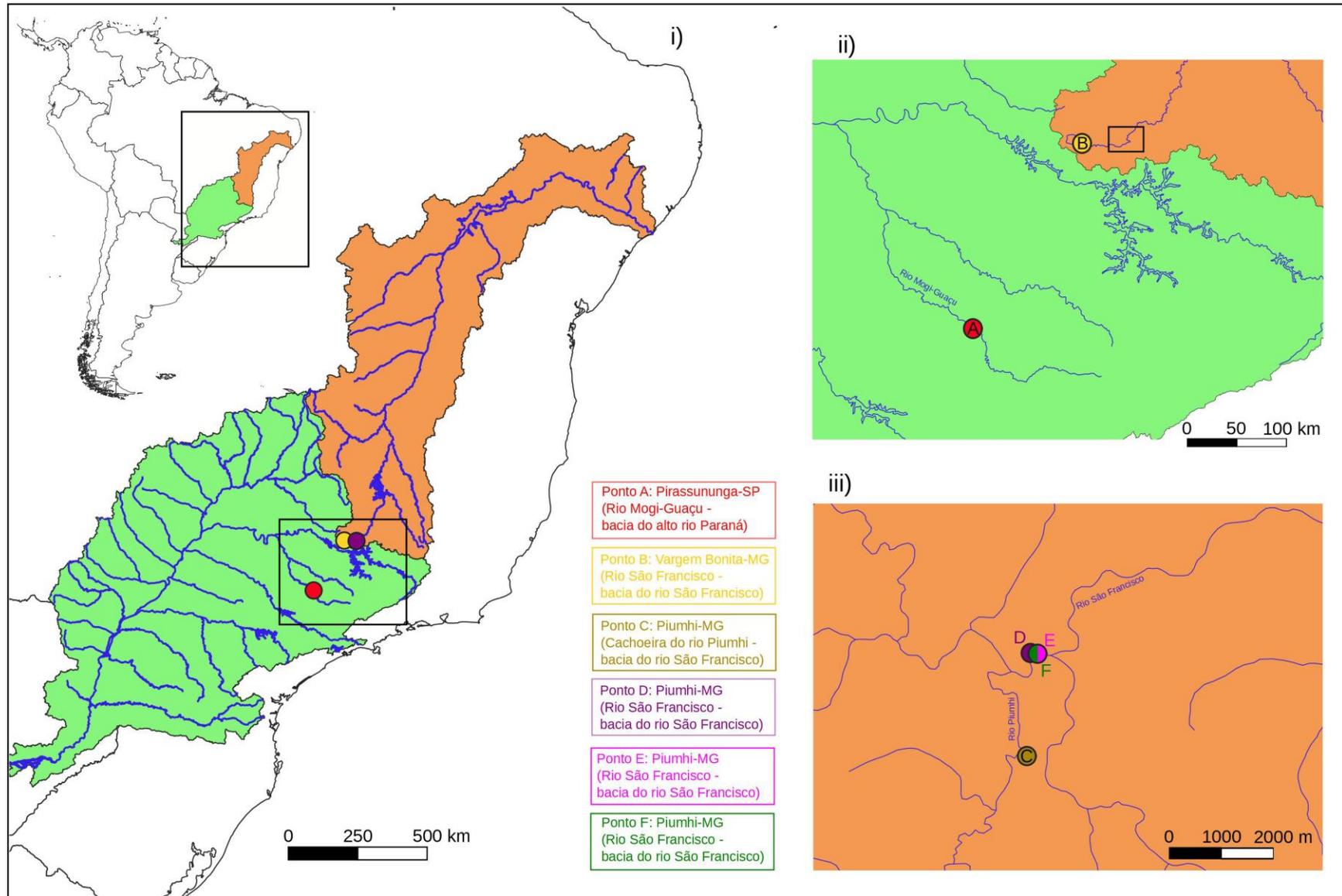


Figura 3. Mapa ilustrativo dos pontos de coleta das espécies de Pimelodidae analisadas.

5. REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO Jr., H.F. Peixes da bacia do Alto Rio Paraná. In: McCONNELL, R. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999. p. 374-400.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; THOMAZ, S.M.; HAHN, N.S. The upper Paraná River and its floodplain: main characteristics and perspectives for management and conservation. In: THOMAZ, S.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Ed). **The upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, 2004. p. 381-393.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; MEIER, K.; KARIMI-ASHTIYANI, R.; HOUBEN, A. Formation and expression of pseudogenes on the B chromosome of rye. **Plant Cell**, v. 25, n. 7, p. 2536-2544, 2013.

BARROS, A.V.; WOLSKI, M.A.V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? **Gene**, v. 608, p. 20-27, 2017.

BARBOSA, P.; DE OLIVEIRA, L.A.; PUCCI, M.B.; SANTOS, M.H.; MOREIRA-FILHO, O.; *et al.* Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Genetica**, v. 143, n. 1, p. 55-62, 2015.

BARBOSA, J.M.; SOARES, E.C.; CINTRA, I.H.A.; HERMANN, M.; ARAÚJO, A.R.R. *et al.* Perfil da ictiofauna da bacia do Rio São Francisco. **ActaFish**, v. 5, p. 70-90, 2017.

BELLAFRONTE, E.; MARIGUELA, T.C.; PEREIRA, L.H.G.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, O. DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin - Applying new data to clarify taxonomic problems. **Neotrop Ichthyol**, v. 11, n. 3, p. 497-506, 2013.

BERMINGHAM, E. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. **Molecular Systematics of Fishes**. Academic Press. 1997. p. 113-128.

BERTOLLO, L.A.C.; CIOFFI, M.B.; MOREIRA-FILHO, O. Direct chromosome preparation from Freshwater Teleost Fishes. In: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (Eds). **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. United States: CRC Press, 2015, p. 21-26.

BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. **Cytogenet Genome Res**, v. 132, n. 1-2, p. 71-78, 2011.

BLAXTER, M.; MANN, J.; CHAPMAN, T.; THOMAS, F.; WHITTON, C.; *et al.* Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. **Philos Trans R Soc of L B Biol**

Sci, v. 360, n. 1462, p. 1935-1943, 2005.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic aspects in species of the genus *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the river Paraná Basin. **Cytologia**, v. 67, p. 199-204, 2002.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the River Iguçu. **Hereditas**, v. 140, p. 201-209, 2004.

BOUCKAERT, R.; HELED, J.; KÜHNERT, D.; VAUGHAN, T.; WU, C.H.; *et al.* BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. **PLoS Computat Biol**, v. 10, p. e1003537, 2014.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco**. Brasília: Câmara dos Deputados/CODEVASF, 1984. 143 p.

BRITSKI, H.A.; LANGEANI, F. *Pimelodus paranensis* sp.n., um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes do alto Paraná, Brasil. **Rev Bras Zool**, v. 5, n. 3, p. 409-417, 1988.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce. In: CARVALHO, J.C.M. **Atlas de fauna brasileira**. São Paulo: Melhoramentos, 1991. p. 84-93.

BROWN, S.D.J.; COLLINS, R.A.; BOYER, S.; LEFORT, M.C.; MALUMBRES-OLARTE, J.; *et al.* Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA *barcoding*. **Mol Ecol Resour**, v. 12, p. 562–565, 2012.

BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M.S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Série Livros 23, 2007. 195 p.

BUCKUP, P.A. The Eastern Brazilian Shield. In: ALBERT, J.S.; REIS, R.E. **Historical Biogeography of Neotropical freshwater fishes**. Los Angeles: University of California Press, 2011. p. 203-210.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. **PLoS One**, v. 8, n. 6, 2013.

BURT, A.; TRIVERS, R. **Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University, 2006. 613 p.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; VALENTE, G.T., NAKAJIMA, R.T.; MARTINS, C. Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Res**, v. 20, n. 2, p. 279-292, 2012.

CAMACHO, J.P.M. Polymorphisms and geographic distribution. **Proceedings of First B Chromosome Conference**, Madrid, Spain, p. 2-4, 1993.

CAMACHO, J.P.M. B chromosomes. In: GREGORY, T.R. (Ed). **The evolution of genome**.

San Diego: Elsevier, 2005. p. 223-286.

CARCHILAN, M.; KUMKE, K.; MIKOLAJEWSKI, S.; HOUBEN, A. Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences. **Chromosoma**, v. 118, n. 5, p. 607, 2009.

CARVALHO, R.A.; DIAS, A.L. Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. **Genet Mol Res**, v. 4, n. 4, p. 663-667, 2005.

CARVALHO, R.A.; DIAS, A.L. Interindividual size heteromorphism of NOR and chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. **Braz Arch Biol Technol**, v. 50, n. 1, p. 141-146, 2007.

CARVALHO, R.A.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi River, Paraná, Brazil. **Cytologia**, v. 69, n. 4, p. 381-385, 2004.

CARVALHO, R. A.; MARTINS-SANTOS, I. C.; DIAS, A. L. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 1907-1932, 2008.

CARVALHO, R.A.; LAUDICINA, A.; GIULIANO-CAETANO, L.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. Cytogenetics analysis of the 18S, 5S rDNA and B chromosome of *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes, Pimelodidae). **Braz J Biol**, v. 70, n. 3, p. 631-636, 2010.

CARVALHO, R.A.; SANCHEZ, S., SWARÇA, A.C., FENOCCHIO, A.S., MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. Chromosomal analyses in *Megalonema platanum* (Siluriformes: Pimelodidae), an endangered species from South American rivers. **Neotrop Ichthyol**, v. 9, p. 177-182, 2011.

CARVALHO, P.C.; de OLIVEIRA, E.A.; BERTOLLO, L.A.C.; YANO, C.F.; OLIVEIRA, C.; DECRU, E.; *et al.* First chromosomal analysis in Hepsetidae (Actinopterygii, Characiformes): insights into relationship between African and Neotropical fish groups. **Front Genet**, v. 8, p. 203, 2017.

CARVALHO, D.C.; BEHEREGARAY, L.B. Conservation genetics of the threatened catfish *Conorhynchus conirostris* (Siluriformes: *incertae sedis*), an evolutionary relict endemic to the São Francisco River Basin, Brazil. **Conserv Genet**, v. 19, n. 5, p. 1223-1230, 2018.

CBHSF. Comitê da Bacia Hidrográfica do São Francisco. Disponível em: <<http://cbhsaofrancisco.org.br/2017/a-bacia/>>. Acesso em 03 out. de 2018.

CHARLESWORTH, B.; SNLEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.

CIOFFI, M.B.; KEJNOVSKY, E.; BERTOLLO, L.A.C. The Chromosomal Distribution of Microsatellite Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus*, Focusing on the Sex Chromosomes. **Cytogenet Genome Res**, v. 132, p. 289-296, 2011.

CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C. Chromosomal distribution and evolution of repetitive

DNAs in fish. In: **Repetitive DNA**. Karger Publishers. 2012. p. 197-221.

CLARK, F.E.; CONTE, M.A.; FERREIRA-BRAVO, I.A.; POLETTO, A.B.; MARTINS, C.; KOCHER, T.D. Dynamic Sequence Evolution of a Sex-Associated B Chromosome in Lake Malawi Cichlid Fish. **J Hered**, v. 108, n. 1, p. 53-62, 2017.

COLGAN, D.; MCLAUCHLAN, A.; WILSON, G.; LIVINGSTON, S. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Aust J Zool**, v. 46, p. 419-437, 1998.

COSTA, G.W.W.F.; CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C.; MOLINA, W.F. Unusual Dispersion of Histone Repeats on the Whole Chromosomal Complement and Their Colocalization with Ribosomal Genes in *Rachycentron canadum* (Rachycentridae, Perciformes). **Cytogen Genome Res**, v. 144, n. 1, p. 62-67, 2014.

COSTA-SILVA, G.J.; RODRIGUEZ, M.S.; ROXO, F.F.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex Neotropical hyperdiverse group. **PloS One**, v. 10, p. e0135075, 2015.

DANIEL, S.N.; PENITENTE, M.; SILVA, D.M.; HASHIMOTO, D.T.; FERREIRA, D.C.; *et al.* Organization and chromosomal distribution of histone genes and transposable rex elements in the genome of *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenet Genome Res**, v. 146, n. 4, p. 311-318, 2015.

de FREITAS, N.L.; AL-RIKABI, A.B.; BERTOLLO, L.A.C.; EZAZ, T.; YANO, C. F.; *et al.* Early stages of XY sex chromosomes differentiation in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) revealed by DNA repeats accumulation. **Current Genomics**, v. 19, n. 3, p. 216-226, 2018.

de MORAES, R.L.R.; BERTOLLO, L.A.C.; MARINHO, M.M.F.; YANO, C.F.; HATANAKA, T.; *et al.* Evolutionary relationships and cytotaxonomy considerations in the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 6, p. 536-546, 2017.

DIAS, A.L.; FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). **Rev Bras Genet**, v. 16, p. 585-600, 1993.

DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 **Mol Biol Evol**, v. 29, p. 1969-1973, 2012.

EIRÍN-LÓPEZ, J.M.; RUIZ, M.F.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A.M.; MARTÍNEZ, A.; SÁNCHEZ, L.; MÉNDEZ, J. Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with “orphon” features. **J Mol Evol**, v. 58, p. 131-144, 2004.

EPPLEN, J.T.; MC CARREY, JR.; SUTOU, S.; OHNO, S.; Base sequence of a cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proc Natl Acad Sci**, v. 79, p. 3798-3802, 1982.

EPPLEN, J.F.; EPPLEN-HAUPT, A. Aspects of tandemly organized, repetitive sequences in chromosomal DNA. In: SOBTI, R.C.; OBE, G.; ATHWAL, R.S. (Eds.) **Some aspects of chromosome structure and functions**. Índia: Narosab Publishing House, 2002. 238 p. 1-10.

FANTINATTI, B.E.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Genetica**, v. 139, n. 10, p. 1273-1282, 2011.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from Brazilian Amazon region. **Cytobios**, v. 69, n. 276, p. 41-46, 1992.

FERRARIS Jr., C. J. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types**. Auckland, New Zealand: Magnolia Press, 2007. 628 p.

FERREIRA, M.; BRESSANE, K.C.O.; MORESCO, A.R.C.; MOREIRA-FILHO, O.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; GARCIA, C. Comparative application of direct sequencing, PCR-RFLP, and cytogenetic markers in the genetic characterization of *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) species: Possible implications for fish conservation. **Genet Mol Res**, v. 13, p. 4529-4544, 2014.

FRICKE, R.; ESCHEMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. California Academy of Sciences, 2019. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/speciesbyfamily.asp#Pimelodidae>>. Acesso em 20 de jan. de 2019.

FROESE, R.; PAULY, D. 2018. **FishBase**. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/home.htm>>. Acesso em. 20 dez. de 2018.

GALIMBERTI, A.; SPADA, M.; RUSSO, D.; MUCEDDA, M.; AGNELLI, P.; *et al.* Integrated Operational Taxonomic Units (IOTUs) in Echolocating Bats: A bridge between Molecular and Traditional Taxonomy. **PloS One**, v. 7, p. e40122, 2012.

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

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from Rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. **Neotrop Ichthyol**, v. 3, n. 2, p. 285-290, 2005.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes: Pimelodidae) of the São Francisco river: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. **Genet Mol Biol**, v. 31, n. 1, p. 261-264, 2008.

GETLEKHA, N.; MOLINA, W.F.; CIOFFI, M.B; YANO, C.F.; MANEECHOT, N.; *et al.* Repetitive DNAs highlight the role of chromosomal fusions in the karyotype evolution of *Dascyllus* species (Pomacentridae, Perciformes). **Genetica**, v. 144, n. 2, p. 203-211, 2016.

GIRARDI, S.C.; PAVANELLI, C.S.; MARGARIDO, V.P. Contributions to the systematic of Pimelodidae (Osteichthyes, Siluriformes): basic and molecular cytogenetics on seven species of

Pimelodus from three Brazilian hydrographic systems. **Neotrop Ichthyol**, v. 16, n. 2, 2018.

GOUVEIA, J.G.; WOLF, I.R.; VILAS-BOAS, L.A.; HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T.; DIAS, A.L. Repetitive DNA in the catfish genome: rDNA, microsatellites, and Tc1-mariner transposon sequences in *Imparfinis* species (Siluriformes, Heptapteridae). **J Hered**, v. 108, n. 6, p. 650-657, 2017.

GRANDE, L.; EASTMAN, J.T. A review of Antarctic ichthyofaunas in the light of new fossil discoveries. **Paleontology**, v. 29, n. 1, p. 113-137, 1986.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 134, p. 64-71, 2011.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; PRADO, F.D.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Cytogenet Genome Res**, v. 139, n. 2, p. 102-106, 2012.

HATANAKA, T.; GALETTI JR., P.M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 122, p. 239-244, 2004.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 270, p. 313-321, 2003.

HEBERT, P.D.N.; STOECKLE, M.Y.; ZEMLAK, T.S.; FRANCIS, C.M. Identification of birds through DNA barcodes. **PloS Biol**, v. 2, p. e312, 2004.

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

IJDO, J.W.; WELLS, R.A.; BALDINI, A.; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 17, p. 4780, 1991.

JESUS, C.M.; GALETTI JR.; P.M.; VALENTINI, S.R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, n. 1, p. 25-32, 2003.

JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R.S. **Heterochromatin**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 1-147.

JONES, N. New species with B chromosomes discovered since 1980. **The Nucleus**, v. 60, n. 3, p. 263-281, 2017.

JONES, K.W.; REES, H. **B chromosomes**. London: Academic Press, 1982. 266 p.

JONES, R.N.; GONZALEZ-SANCHEZ, M.; GONZALEZ-GARCIA, M.; VEJA, J.M.; PUERTAS, M.J. Chromosomes with a life of their own. **Cytogenet Genome Res**, v. 120, p. 265-

280 2008.

JONES, M.; GHOORAH, A.; BLAXTER, M. JMOTU and Taxonator: turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. e19259, 2011.

KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O.P.; SUDAR, D.; RUTOVITZ, D.; GRAY, J.W.; *et al.* Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. **Science**, v. 258, p. 818-821, 1992.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop *software* platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KIMURA, M.A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KOHANY, O.; GENTLES, A.J.; HANKUS, L.; JURKA, J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 474, 2006.

KUBAT, Z.K.Z.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v. 51, p. 350-356, 2008.

LANFEAR, R.; CALCOTT, B.; HO, S.Y.; GUINDON, S. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. **Mol Biol Evol**, v. 29, p. 1695–1701, 2012.

LANGEANI, F.; CASTRO, R.M.C.; OYAKAWA, O.T.; SHIBATTA, O.A.; PAVANELLI, C.S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, p. 181-197, 2007.

LATRUBESSE, E.; STEVAUX, J.C.; SINHA, R. Tropical rivers. **Geomorphology**, v. 70, p. 187–206, 2005.

LEACH, C.R.; HOUBEN, A.; BRUCE, F.; PISTRICK, K.; DEMIDOV, D.; TIMMIS, J.N. Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. **Genetics**, v. 171, n. 1, p. 269-278, 2005.

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

LIMA-FILHO, P.A.; CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C.; MOLINA, W.F. Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). **J Exp Mar Biol Ecol**, v. 434, p. 63-70, 2012.

LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V.P. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotech Histochem**, v. 87, p. 1-6, 2012.

LUNDBERG, J.G.; LITTMANN, M.W. Pimelodidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr., C.J. (Eds.). **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 432–446.

MA, W.; GABRIEL, T.S.; MARTIS, M.M.; GURSINSKY, T.; SCHUBERT, V.; *et al.* Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with in vitro slicer activities similar to its A chromosome paralogue. **New Phytologist**, v. 213, n. 2, p. 916-928, 2017.

MALIMPENSA, G.C.; TRALDI, J.B.; TOYAMA, D.; HENRIQUE-SILVA, F.; VICARI, M.R.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal Mapping of Repeat DNA in *Bergiaria westermanni* (Pimelodidae, Siluriformes): Localization of 45S rDNA in B Chromosomes. **Cytogenet Genome Res**, v. 154, n. 2, p. 99-106, 2018.

MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). **Genet Mol Biol**, v. 31, n. 1, p. 235-238, 2008.

MARQUES, M.B.A.; MOREIRA-FILHO, O.; GARCIA, C.; MARGARIDO, V.P. Cytogenetic analyses of two endemic fish species from the São Francisco River basin: *Conorhynchus conirostris* and *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes). **Genet Mol Biol**, v. 31, n. 1, p. 215-221, 2008.

MARQUES, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; KLEMME, S.; BLATTNER, F.R.; NIWA, K.; GUERRA, M.; HOUBEN, A. B chromosomes of rye are highly conserved and accompanied the development of early agriculture. **Ann Bot**, v. 112, n. 3, p. 527-534, 2013.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: **Fish Cytogenetics**. New York: Science Publisher, 2007. p. 421-432.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anastomidae, Characiformes). **Chromosome Res**, v. 8, p. 363-367, 1999.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. Conservative distribution of 5S rRNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anastomidae) chromosomes. **Chromosome Res**, v. 8, n. 4, p. 353-355, 2000.

MARTINS, C.; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. **Focus Genome Res**, v. 289, p. 318, 2004.

MATTHEY, R. L' evolution de la formule chromosomiale chez les vertebrees. **Experientia**, v. 1, p. 50-56 e 78-86, 1945.

MATOSO, D.A.; VAL, V.M.F.A.; SILVA, M.; MORAES-NETO, A.; ALMEIDA, C.; *et al.* Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodidae): a reappraisal the existence of sex chromosome system in the species. **Fish Biol Fisheries**, v. 21, p. 497-508, 2011.

McCONNELL, R.; LOWE-McCONNELL, R. H. **Ecological studies in tropical fish communities**. Cambridge: University Press, 1987. 382 p.

MESS, G.F. Auchenipteridae and Pimelodidae. **Zoologische Verhandelingen**, v. 132, p. 115-246, 1974.

MESTRINER, C.A.; GALETTI Jr., P.M.; VALENTINI, S.R.; RUIZ, I.R.; ABEL, L.D.; *et al.* Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, n. 1, p. 1-9, 2000.

MEYNE J.; BAKER, R.J.; HOBART, H.H.; HSU, T.C.; RYDER, O.A.; *et al.* Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, v. 99, p. 3–10, 1990.

MIAO, V.P.; COVERT, S.F.; VANETTEN, H.D. (1991) A fungal gene antibiotic resistance on a dispensable (“B”) chromosome. **Science**, v. 254, n. 5039, p.1773-1776, 1991.

MILANI, D.; RAMOS, É.; LORETO, V.; MARTÍ, D.A.; CARDOSO, A.L.; *et al.* The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*. **BMC Genetics**, v. 18, n. 1, p. 81, 2017.

MONAGHAN, M.T.; WILD, R.; ELLIOT, M.; FUJISAWA, T.; BALKE, M.; *et al.* Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Systematic Biology**, v. 58, p. 298–311, 2009.

MORAES NETO, A.; SILVA, M.D.; MATOSO, D.A.; VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.D.; *et al.* Karyotype variability in Neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes). **Neotrop Ichthyol**, v. 9, n. 1, p. 97-105, 2011.

NAVARRO-DOMÍNGUEZ, B.; RUIZ-RUANO, F.J.; CABRERO, J.; CORRAL, J.M.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; *et al.* Protein-coding genes in B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45200, 2017.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 5 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, New Jersey, 2016. 707 p.

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

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

PANSONATO-ALVES, J.C.; HILSDORF, A.W.S.; UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.A.; OLIVEIRA, C. FORESTI, F. Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 141, p. 133-142, 2013b.

PENDÁS, A.M.P.; FREIJE, J.P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet Genome Res**, v. 67, n. 1, p. 31-36, 1994.

PEREIRA, L.H; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA *barcoding* accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, v. 14, p. 20, 2013.

PINEAU, P.; HENRY, M.; SUSPÈNE, R.; MARCHIO, A.; DETTAI, A.; *et al.*: A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Mol Biol Evol**, v. 22, p. 582-588, 2005.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

POLETO, A. B.; FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, 2010.

PONS, J.; BARRACLOUGH, T.G.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.; DURAN, D.P.; *et al.* Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology**, v. 55, p. 595–609, 2006.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Mol Biol Evol**, v. 25, p. 1253-1256, 2008.

PUCCI, M.B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; *et al.*: Chromosomal spreading of microsatellites and (TTAGGG)_n sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi* genomes (Characiformes: Crenuchidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 149, n. 3, p. 182-190, 2016.

RABOVÁ, M, VÖLKER, M, PELIKÁNOVÁ, Š, RÁB, P. Sequential Chromosome Banding in Fishes. In: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (Eds). **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. United States: CRC Press, 2015. p. 92-102.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. Tracer v1.4. 2007. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.

RAMIREZ-GIL, H.; FELDBERG, E., ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L. Karyological, biochemical, and physiological aspects of *Callophysus macropterus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Solimões and Negro Rivers (Central Amazon). **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 11, p. 1449-1458, 1998.

RAMOS, É.; CARDOSO, A.L.; BROWN, J.; MARQUES, D.F.; FANTINATTI, B.E.; *et al.* The repetitive DNA element BncDNA, enriched in the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*, transcribes a potentially noncoding RNA. **Chromosoma**, v. 126, n. 2, p. 313-323, 2017.

RIBEIRO, F.R.V.; LUCENA, C.A.S. A new species of *Pimelodus* La Cépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio São Francisco drainage, Brazil. **Neotrop Ichthyol**, v. 4, n. 4, p. 411-418, 2006.

RIBEIRO, F.R.V.; LUCENA, C.A.S. *Pimelodus microstoma* Steindachner, 1877, a valid species of pimelodid catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the upper rio Paraná drainage. **Neotrop Ichthyol**, v. 5, n. 1, p. 75-78, 2007.

RIBEIRO, F.R.V.; LUCENA, C.A.S.; LUCINDA, P.H.F. Three new *Pimelodus* species (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio Tocantins drainage, Brazil. **Neotrop Ichthyol**, v. 6, n. 3,

p. 455-464, 2008.

RIBEIRO, F.R.V.; LUCENA, C.A.S. *Pimelodus heraldoi* Azpelicueta, 2001, a junior synonym of *Pimelodus microstoma* Steindachner, 1877 (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotrop Ichthyol**, v. 8, n. 2, p. 277-281, 2010.

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

ROSA, K. O.; ZIEMNICZAK, K., DE BARROS, A. V., NOGAROTO, V., ALMEIDA, M. C.; *et al.* Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews Fish Biol**, v. 22, p. 739-749, 2012.

RUIZ-ESTÉVEZ, M.; LÓPEZ-LEON, M.D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M. B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36600, 2012.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Laboratory Press, 2001.

SANCHEZ, S.; SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S. Cytogenetic Studies and Evolutive Considerations in Species of the *Calophysus* Group (Siluriformes, Pimelodinae). **Cytologia**, v. 75, n. 3, p. 223-227, 2010.

SANCHEZ, S.; SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S. Cytogenetics analyses among populations of the fish *Iheringichthys labrosus* (Kröyer, 1874)(Siluriformes, Pimelodidae). Karyotype analysis, C-banding and AgRONS distribution. **Braz J Biol**, v. 74, n. 1, p. 212-216, 2014.

SATO, Y.; GODINHO, H.P. Peixes da bacia do rio São Francisco. In: LOWE-McCONNEL, R.H. (Ed.). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999. p. 401 – 413.

SATO, Y.; GODINHO, H.P. Migratory fishes of the São Francisco river. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. **Migratory fishes South America: Biology**. Fisheries and Conservation Status. IDRC publications, 2004. 380. p.

SCACCHETTI, P.C.; UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.; *et al.* Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei, Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes. **Cytogenet Genome Res**, v. 146, n. 2, p. 136-143, 2015.

SCHEMBERGER, M.O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; SCHÜHLI, G.S.; *et al.* Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, v. 139, n. 11-12, p. 1499-1508, 2011.

SCHNEIDER, C.H.; GROSS, M.C.; TERCENIO, M.L.; de TAVARES, É.S.G.M.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genome (Pisces, Cichlidae). **Comp Cytogenetics**, v. 9, n. 4, p. 595, 2015.

SCZEPANSKI, T.S.; VICARI, M.R.; DE ALMEIDA, M.C.; NOGAROTO, V.; ARTONI, R.F. Chromosomal organization of repetitive DNA in *Sorubim lima* (Teleostei; Pimelodidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 141, n. 4, p. 309-316, 2013.

SILVA, I.L.; VIEIRA, G.G.; FARINASSO, M.; CARLOS, R.J. **Determinação da extensão do rio São Francisco**. Anais da XI SBSR. Belo Horizonte. 2003. p. 393-400.

SILVA, D.M.Z.A.; PANSONATO-ALVES, J. C., UTSUNOMIA, R., DANIEL, S. N., HASHIMOTO, D.T.; *et al.* Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**, v. 141, p. 329-336, 2013.

SILVA, D.M.Z.A.; PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ- RUANO, F.J.; *et al.*: Delimiting the origin of a B chromosome by fish mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PloS One**, v. 9, p. e94896, 2014.

SILVA, D.M.Z.A.; DANIEL, S.N.; CAMACHO, J.P.M.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F.J.; *et al.*: Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Mol Genet Genomics**, v. 291, p. 1407-1418, 2016.

SLIJEPCEVIC, P. Telomers and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma**, v. 107, p. 136-140, 1998.

SOUZA, A.C.P.; NAGAMACHI, C.Y.; RISSINO, J.D.; JÚNIOR, J.R.C.; BARROS, R.M.S.; PICZARKA, J.C. Descrição cariotípica de *Pimelodus cf. Maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae). **Anais do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. Manaus, AM, p.90, 2000.

SOUZA, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Banding chromosome pattern of two species of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from Paraná river basin of Brazil. **Folia Biologica**, v. 52, n. 3-4, p. 165-169, 2004.

STEFANI, P.M. **Ecologia trófica e ecomorfologia de peixes em um trecho do alto rio São Francisco impactado pela transposição do rio Piumhi, com ênfase nas espécies *Pimelodus fur* Lütken, 1874 e *Leporinus reinhardtii* Lütken, 1875**. 2010. 185 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res**, v. 75, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A.T. **Chromosomes – organization and function**. Malden, Blackwell Publishing, 2003. 275 p.

SWARÇA, A.L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetic characterization through chromosomal banding of *Pinirampus pinirampu* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi river basin PR/Brazil. **Caryologia**, v. 52, n. 1-2, p. 31-35, 1999.

SWARÇA, A.L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L.; CESTARI, M.M. AgNO₃, CMA₃ e FISH em duas populações de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces, Pimelodidae). **Anais do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**, Manaus – AM, p. 94, 2000.

SWARÇA, A.C.; GIULIANO-CAETANO, L.; VANZELA, A.L.L.; DIAS, A.L. Heteromorphism of rDNA size in *Pirinampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) detected by *in situ* hybridization. **Cytologia**, 66: 275 – 278, 2001.

SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M.; BERTOLLO, L.A.C.; DIAS, A. L. First report of a sex chromosome system in a Sorubiminae fish, *Steindachneridion* sp. (Pimelodidae), with an uncommon large Y chromosome. Mitotic and Meiotic analysis. **Cytogenet and Genome Res**, v. 112, n. 3-4, p. 325-328, 2006.

SWARÇA, A.C.; SANCHEZ, S.; DIAS, A.N.; FENOCCHIO, A.S. Cytogenetics of the Porthole Shovelnose Catfish *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae), a widespread species in South American rivers. **Comp Cytogenet**, v. 7, n. 2, p. 103-110 2013.

SWARÇA, A.C.; DIAS, A.L.; FENOCCHIO, A.S. Cytogenetic studies in the redbtail catfish, *Phractocephalus hemiliopterus* (Bloch & Schneider, 1801) (Siluriformes, Pimelodidae) a giant fish from Amazon basin. **Comp Cytogenet**, v. 11, p. 119, 2017.

SWARÇA, A.C.; ORSI, M.L.; TAKAGUI, F.H.; DIAS, A.L.; DERGAM, J.A.; FENOCCHIO, A.S. First chromosome data on *Steindachneridion doceanum* (Siluriformes: Pimelodidae): a critically endangered catfish endemic of the Doce River basin, Brazil. **Neotrop Ichthyol**, v. 16, n. 4, 2018.

SYMONOVÁ, R.; FLAJŠHANS, M.; SEMBER, A.; HAVELKA, M.; GELA, D.; *et al.* Molecular cytogenetics in artificial hybrid and highly polyploid sturgeons: an evolutionary story narrated by repetitive sequences. **Cytogenet Genome Res**, v. 141, n. 2-3, p. 153-162, 2013.

SYMONOVÁ, R.; SEMBER, A.; MAJTÁNOVÁ, Z.; RÁB, P. Characterization of fish genomes by GISH and CGH. In: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (eds). **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. United States: CRC Press, 2015. p. 118–131.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**, v. 10, p. 2731-2739, 2011.

TEIXEIRA, W.G.; FERREIRA, I.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; *et al.* Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenet Genome Res**, v. 125, n. 3, p. 224-234, 2009.

TERENCIO, M.L.; SCHNEIDER, C.H.; GROSS, M.C.; DO CARMO, E.J.; NOGAROTO, V.; *et al.* Repetitive sequences: the hidden diversity of heterochromatin in prochilodontid fish. **Comp Cytogenet**, v. 9, n. 4, p. 465, 2015.

TRALDI, J.B.; VICARI, M.R.; BLANCO, D.R.; MARTINEZ, J.F.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. **Comp Cytogenet**, v. 6, n. 2, p. 115, 2012.

TRALDI, J.B.; BLANCO, D.R.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). **J Genet**, v. 92, n. 1, p. 127-130, 2013.

TRALDI, J.B.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.F.; BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosome analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisi* (Characiformes, Parodontidae): an extensive chromosomal polymorphism of 45S and 5S ribosomal DNAs. **Zebrafish**, v. 13, n. 1, p. 19-25, 2016.

TRECO, F.R.; DIAS, A.L. Karyotypes of two species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae). **Folia Biol (Kraków)**, v. 57, n. 1-2, p. 43-48, 2009.

TRIFONOV, V.A.; DEMENTYEVA, P.V.; LARKIN, D.M.; O'BRIEN, P.C.; PERELMAN, P.L.; *et al.* Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BMC Biol**, v. 11, p. 90, 2013.

UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J.C.; SCACCHETTI, P.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Scattered organization of the histone multigene family and transposable elements in *Synbranchus*. **Genet Mol Biol**, v. 37, n. 1, p. 30-36, 2014.

UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; ARAYA-JAIME, C.; PANSONATO-ALVES, J.C.; SCACCHETTI, P.C. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PloS One**, v. 11, p. e0150573, 2016.

UTSUNOMIA, R.; MELO, S.; SCACCHETTI, P.C.; OLIVEIRA, C.; MACHADO, M.A.; *et al.* Particular chromosomal distribution of microsatellites in five species of the genus *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes). **Zebrafish**, p. 1-6, 2018.

VALADKHAN, S. snRNAs as the catalysis of pre-mRNA splicing. **Curr Op Chem Biol**, v. 9, p. 603-608, 2005.

VASCONCELOS, C. de; MARTINS-SANTOS, I.C. Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). **Hereditas**, v. 132, n. 2, p. 103-109, 2000.

VALENTE, G.T.; CONTE, M.A.; FANTINATTI, B.E.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; CARVALHO, R.F.; *et al.* Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. **Mol Biol Evol**, v. 31, p. 2061-2072, 2014.

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeiroensis*. **Cytogenet Genome Res**, v. 122, n. 1, p. 67-72, 2008.

VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R.B.; CESTARI, M.M.; CIOFFI, M.B.; *et al.* Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **J Fish Biol**, v. 76, n. 5, p. 1094-1116, 2010.

VISSOTO, P.C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). **Chromosome Sci**, v. 3, p. 9-13, 1999.

WARD, R.D.; ZEML AK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. DNA *barcoding* Australia's fish species. **Philos Trans R Soc B**, v. 360, p. 1847-1857, 2005.

XU, D.; MOLINA, W.F.; YANO, C.F.; ZHANG, Y.; DE OLIVEIRA, E.A.; *et al.* Comparative Cytogenetics in three Sciaenid species (Teleostei, Perciformes): evidence of interspecific chromosomal diversification. **Molecular Cytogenetics**, v. 10, n. 1, p. 37, 2017.

YOSHIDA, K.; TERAJ, Y.; MIZOIRI, S.; AIBARA, M.; NISHIHARA, H.; *et al.* B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. **PloS One**, v. 7, p. e1002203, 2011.

YANO, C. F.; POLTRONIERI, J.; BERTOLLO, L.A.C.; ARTONI, R.F.; LIEHR, T.; CIOFFI, M.B. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triporthus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. 1-7, 2014.

YANO, C.F.; BERTOLLO, L.A.C.; REBORDINOS, L.; MERLO, M.A.; LIEHR, T.; *et al.* Evolutionary Dynamics of rDNAs and U2 Small Nuclear DNAs in *Triporthus* (Characiformes, Triporthidae): High Variability and Particular Syntenic Organization. **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 146-154, 2017a.

YANO, C.F.; BERTOLLO, L.A.C.; EZAZ, T.; TRIFONOV, V.; SEMBER, A.; *et al.* Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triporthus* (Characiformes, Triporthidae). **Heredity**, v. 118, n. 3, p. 276, 2017b.

ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869-2876, 2013.

ZIEMNICZAK, K.; TRALDI, J.B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. *In situ* Localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n Repeated DNAs and W Sex Chromosome Differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenet Genome Res**, v. 144, n. 4, 325-332, 2015.

ZWICK, M. S., HANSON, R. E., MCKNIGHT, T. D., ISLAM-FARIDI, M. N., STELLY, D. M.; *et al.* A rapid procedure for the isolation of Cot-1 DNA from plants. **Genome**, v. 40, p. 138-142, 1997.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados na forma de quatro capítulos, os quais se encontram elaborados no formato de artigos científicos:

CAPÍTULO 1:

Mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em *Bergiaria westermanni* (Pimelodidae, Siluriformes): localização do rDNA 45S nos cromossomos B.

CAPÍTULO 2:

Contribuições para a compreensão da diversificação cromossômica em Pimelodidae (Siluriformes): mapeamento citogenético comparativo de DNAs repetitivos em duas espécies de *Pimelodus*.

CAPÍTULO 3:

Similaridades e diferenciações genômicas entre espécies de Pimelodidae (Siluriformes) inferidas pelo mapeamento cromossômico de repetições microssatélites.

CAPÍTULO 4:

Investigações cromossômicas e moleculares e integrativas como suporte à delimitação de espécies de Pimelodidae (Siluriformes).

**Mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em
Bergiaria westermanni (Pimelodidae, Siluriformes):
localização do rDNA 45S nos cromossomos B.**

Artigo publicado na revista **Cytogenet Genome Res.**

Malimpensa, G. C.; Traldi, J. B.; Toyama, D.; Henrique-Silva, F.; Vicari, M. R.; Moreira-Filho, O.
Chromosomal Mapping of Repeat DNA in *Bergiaria westermanni* (Pimelodidae, Siluriformes):
Localization of 45S rDNA in B Chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 154:99-106, 2018. doi:
10.1159/000487652

Resumo

A ocorrência de DNAs repetitivos nos autossomos e cromossomos B de *Bergiaria westermanni* foi examinada por meio de técnicas de citogenética clássica e molecular. Essa espécie exibiu $2n = 56$ cromossomos, com uma variação numérica intra- e interindividual de cromossomos B heterocromáticos (de 0 a 4). O rDNA 5S foi localizado nos pares 1 e 5, e as sondas para as histonas (H1, H3 e H4) e o *small nuclear* RNA U2 foram sintênicos com o rDNA 5S no par 5. As sequências de histonas também foram localizadas no par cromossômico 14. A sequência $(GATA)_n$ mostrou-se dispersa pelos autossomos e cromossomos B, com clusters (acumulação de microssatélites) em algumas regiões cromossômicas. A sonda telomérica revelou a ausência de rearranjos cromossômicos no genoma de *B. westermanni*. O rDNA 45S foi detectado na região terminal do par 24; esses sítios correspondem a um bloco heterocromático rico em GC. Adicionalmente, três dos quatro cromossomos B continham cópias do rDNA 45S. A impregnação com nitrato de prata nos núcleos interfásicos permitiu a evidência indireta da expressão dos genes rRNA nos cromossomos B, indicando a provável origem desses elementos. Esse trabalho mostra a plasticidade na localização cromossômica de DNAs repetitivos em *B. westermanni* e apresenta uma discussão sobre a diversificação genômica.

Palavras-chave: Bagres neotropicais, Bandamento Cromossômico, Citogenética de Peixes, FISH,

Histonas,

rDNA,

snRNA

U2

Abstract

The occurrence of repetitive DNA in autosomes and B chromosomes of *Bergiaria westermanni* was examined using conventional and molecular cytogenetic techniques. This species exhibited $2n = 56$ chromosomes, with intra- and interindividual variation in the number of heterochromatic B chromosomes (from 0 to 4). The 5S rDNA was localized in pairs 1 and 5, and histone probes (H1, H3, and H4) and U2 *small nuclear* RNA were syntenic with 5S rDNA in pair 5. Histone sequences were also located in chromosome pair 14. The (GATA)_n sequence was dispersed throughout the autosomes and B chromosomes, with clusters (microsatellite accumulation) in some chromosome regions. The telomeric probe revealed no signs of chromosomal rearrangements in the genome of *B. westermanni*. The 45S rDNA sites were detected in the terminal region of pair 27; these sites corresponded to a GC-rich heterochromatin block. In addition, 3 of the 4 B chromosomes also contained 45S rDNA copies. Silver nitrate staining in interphase nuclei provided indirect evidence of the expression of these rRNA genes in B chromosomes, indicating the probable origin of these elements. This report shows plasticity in the chromosomal localization of repeat DNA in *B. westermanni* and features a discussion of genomic diversification.

Keywords: Chromosome banding, FISH, Fish cytogenetics, Histones, Neotropical catfish, rDNA, U2 snRNA

6.1.1. Introdução

O genoma eucarioto é organizado em diferentes classes de DNA (Martins, 2007). Em adição aos DNA não repetitivo, algumas seqüências são repetidas no completo cromossômico (Sumner, 2003). Tais DNAs repetitivos incluem famílias multigênicas, repetições in tandem e repetições dispersas, conhecidas como transposons e retrotransposons (Sumner, 2003).

Outra característica do genoma eucarioto é a ocorrência de cromossomos B em algumas espécies. Cromossomos B são elementos adicionais aos cromossomos A e estão presentes nos genomas de algumas populações / espécies. Eles provavelmente se originam dos cromossomos A e seguem seus próprios caminhos evolutivos (Camacho, 1993). Estes cromossomos B são considerados não essenciais para a reprodução, desenvolvimento, e sobrevivência dos organismos. Eles mostram uma variabilidade intra- e interindividual em morfologia e número, são geralmente compostos de heterocromatina, e não segregam de acordo com as leis de Mendel (Jones & Rees, 1982).

Os cromossomos B são compostos em sua maioria por diferentes classes de DNAs repetitivos, como o DNA ribossômico, centromérico, e DNA satélite, bem como elementos transponíveis (Camacho, 2005). O proto-oncogene KIT receptor de tirosina quinase (C-Kit) foi mapeado nos cromossomos B de *Vulpes vulpes* e *Nyctereutes procyonoides* (Graphodatsky *et al.*, 2005), e seqüências de DNA organelar foram detectadas nos cromossomos B de *Secale cereale* (Marques *et al.*, 2013). Recentemente, análises genômicas revelaram a presença de genes em cromossomos B (para uma revisão, ver Banei-Moghaddam *et al.*, 2015). Em peixes Neotropicais, seqüências de DNAr 18S foram localizadas *in situ* nos cromossomos B de *Astatotilapia latifasciata* (Poletto *et al.*, 2010; Fantinatti *et al.*, 2011), genes DNAr 18S e histona H1 foram demonstrados nos cromossomos B de espécies de *Astyanax* (Silva *et al.*, 2014, 2016), e as seqüências de DNAr 18S e histona H3 foram detectadas nos cromossomos B de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Dantas *et al.*, 2007; Utsunomia *et al.*, 2016). No gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, seqüências de DNAr 45S dos cromossomos B podem, inclusive, estarem ativas (Ruiz-Estévez *et al.*, 2012). Além disso, Valente

et al. (2017) propôs que os cromossomos B contêm sequências transcricionalmente ativas, que podem modular expressão gênica dos cromossomos A.

O gênero *Bergiaria* é um membro da família Pimelodidae (Siluriformes), um dos mais diversos grupos de peixes Neotropicais. Estudos citogenéticos em representantes desta família demonstraram a predominância de um número diploide ($2n$) de 56 cromossomos (Oliveira & Gosztanyi, 2000; Swarça *et al.*, 2017). Seus cariótipos são caracterizados por uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva nos cromossomos (Carvalho & Dias, 2005; Garcia & Moreira-Filho, 2005), por possuírem geralmente um único par de cromossomos portadores das regiões organizadoras do nucléolo (RONs) (Dias & Foresti, 1993; Borin & Martins Santos, 2002; Treco e Dias, 2009; Swarça *et al.* 2013), bem como a ocorrência de cromossomos B (Dias & Foresti, 1993; Vissoto *et al.*, 1999; Borin & Martins Santos, 2004; Carvalho *et al.*, 2004).

A caracterização e a localização de sequências repetitivas têm sido raramente realizadas em representantes de Pimelodidae e se limitam ao mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos (Garcia & Moreira-Filho, 2008; Carvalho *et al.*, 2010). Nesse contexto, o presente estudo empregou o mapeamento cromossômico de sequências repetitivas nos cromossomos de *Bergiaria westermanni*, enfocando a presença ou a ausência de rDNAs, *small nuclear RNAs* (snRNAs), histonas, e sítios das sequências $(TTAGGG)_n$ e $(GATA)_n$ nos cromossomos B.

6.1.2. Materiais e Métodos

Quinze indivíduos de *B. westermanni* (2 machos e 13 fêmeas) do rio São Francisco, cidade de Piumhi, estado de Minas Gerais, Brasil (GPS: 20° 20' 19,8" S; 45° 58' 52,3" O) foram examinados. Os indivíduos foram depositados no Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil (vouchers NUP 18792–18793).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de porções do rim anterior de acordo com Bertollo *et al.* (2015). Os cromossomos foram corados com solução de Giemsa a 5% (pH 6,8). A morfologia cromossômica foi determinada seguindo Levan *et al.* (1964). O número de braços cromossômicos

(número fundamental, NF) foi determinado de acordo com Matthey (1945), considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtlocêntricos (st) como portadores de dois braços cromossômicos e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço. Regiões heterocromáticas foram visualizadas pela técnica de bandamento C (Sumner, 1972), usando a coloração com iodeto propídio (Lui *et al.*, 2012). As NORs foram identificadas por impregnação com nitrato prata (Ag) (Howell & Black, 1980). As regiões específicas para GC e AT foram detectadas usando a coloração fluorescente de cromomicina A₃ / distamicina / DAPI (bandamento CDD) (Rábová *et al.*, 2015). As seqüências das famílias multigênicas DNAr 5S, snRNA U2 e histonas H1, H3 e H4 foram sintetizadas por PCR usando DNA genômico de *B. westermanni*, com os mix de reação descritos na Tabela S1 (para todos os materiais suplementares, consulte www.karger.com/doi/10.1159/000487652). As condições dos ciclos foram as seguintes: (1) DNAr 5S: 95°C / 5min, 30 ciclos de 95°C / 30s, 56°C / 45s e 72°C / 2min, com um estágio final de 72°C/7 min; (2) snRNA U2: 95°C/45s, 30 ciclos de 95°C/45s, 52°C/45s, 72°C/1min e 20s, com uma etapa final de 72°C/7min; e (3) histonas H1, H3 e H4: 95°C/5min, 30 ciclos de 95°C/ 30s, 52°C / 45s, 72°C / 1min e 20s, com um estágio final de 72°C / 7min. Após as reações de amplificação, os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação de PCR GenElute™ (Sigma-Aldrich) e sequenciados usando o sequenciador ABI-PRISM (Carlsbad, CA) As seqüências foram editadas e analisadas usando o *software* Geneious 7.1.3 (Kearse *et al.*, 2012); suas identidades foram confirmadas usando a ferramenta BLAST_n (NCBI).

Adicionalmente às seqüências de snRNA U2 e histonas, seqüências de DNA para o DNAr 18S, DNAr 5S, (TTAGGG)_n e (GATA)_n foram obtidas para os experimentos de FISH. Os DNAs ribossomais 18S e 5S foram amplificados de acordo com Hatanaka & Galetti Jr. (2004) e Martins & Galetti Jr. (1999), respectivamente. A seqüência dos telômeros (TTAGGG)_n foi amplificada utilizando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo *et al.*, 1991), e a seqüência (GATA)_n usando os primers (GATA)₇ e (TATC)₇ (Traldi *et al.*, 2013). As sondas foram marcadas por *nick translation*. Biotina-16-dUTP (Biotin-Nick Translation Mix; Roche Applied Science, Alemanha)

foi usada para marcar DNAr 18S, (TTAGGG)_n, (GATA)_n, e as sequências H1, H3, e H4, enquanto que as sondas DNAr 5S e snRNA U2 foram marcadas tanto com biotina-16-dUTP quanto com digoxigenina-11-dUTP (Dig-Nick Translation Mix; Roche Applied Science), de acordo com as instruções do fabricante. A FISH seguiu o protocolo de Pinkel *et al.* (1986), sob condições de alta estringência [77%; 200 ng de cada sonda, formamida a 50%, sulfato de dextrano a 10% e 2×SSC (pH 7,0), 16h a 37°C]. Os sinais foram detectados usando avidina-FITC (Sigma-Aldrich, EUA), para os DNAr 18S e 5S, (TTAGGG)_n, (GATA)_n, H1, H3 e H4 (sinais verdes) e anti-digoxigenina Rodamina (Roche Applied Science) para snRNA U2 e DNAr 5S (sinais vermelhos). O número de nucléolos presentes nos núcleos interfásicos foi examinado por impregnação com nitrato de prata e FISH com sonda de DNAr 18S. Os cromossomos foram analisados por meio de um microscópio de epifluorescência (Olympus BX51). As imagens selecionadas foram capturadas com uma câmera (Olympus DP-72) acoplada ao microscópio e com o *software* DP2-BSW. As imagens capturadas foram analisadas e processadas usando o *software* Adobe® Photoshop CS5 Extended.

6.1.3. Resultados

Os indivíduos de *B. westermanni* apresentaram um $2n = 56$ cromossomos A e uma variação intra- e interindividual no número de cromossomos B (de 0 a 4), sendo 03 Bs, o número mais frequente encontrado (Fig. 1A; Tab. 1). A fórmula cariotípica foi $28m + 14sm + 10st + 4a$, $NF = 108$ (Fig. 1A). Blocos de heterocromatina foram localizados nas regiões centroméricas/pericentroméricas de todos os pares cromossômicos e na região terminal de alguns autossomos; os cromossomos B foram totalmente heterocromáticos (Fig. 1B). Ag-RON simples foi localizada na região terminal do braço q do par 27, correspondente aos blocos heterocromáticos C-positivos (Fig. 1B, box). O bandamento CDD mostrou um bloco GC-rico na região terminal do braço q do par 27, correspondente a Ag-RON (Fig. 2A). Os cromossomos B não apresentaram sinais positivos para o bandamento CDD (Fig. 2A).

A sequência (GATA)_n mostrou-se dispersa nos cromossomos de *B. westermanni*, com

acúmulo preferencial nas porções terminais dos cromossomos A e nas regiões intersticiais dos cromossomos B (Fig. 2B). A sequência (TTAGGG)_n foi observada somente nas regiões teloméricas dos cromossomos A e B (Fig. 2C). Os sítios de DNAr 18S foram detectados no par 27, correspondentes as Ag-RONs (Fig. 3), bem como em até 3 cromossomos B (Fig. 3, box A). A FISH com a sonda de DNAr 5S revelou sinais nas regiões intersticiais dos pares 1 (braço q) e 5 (braço q) (Fig. 3). Adicionalmente, as sequências do snRNA U2, e das histonas H1, H3 e H4, também se localizaram no cromossomo 5 (sintênicos com o rDNA 5S) (Fig. 3, box B). Sítios das histonas H1, H3 e H4 também foram demonstrados no par cromossômico 14 (Fig. 3, box C). A FISH com o DNAr 18S e a impregnação com nitrato de prata nos núcleos interfásicos, mostrou a presença de 1 – 5 nucléolos (Fig. 4, Tabela S2).

As análises de identidade das sequências DNAr 5S, snRNA U2, e histonas H1, H3 e H4, na ferramenta BLAST_n, retornaram os seguintes resultados: sequência do gene DNAr 5S de *B. westermanni* (179 pb) (GenBank Nos. MG450337–MG450344), identidade média de 95% com o rRNA 5S de *Amphichthys cryptocentrus* (GenBank No. GU645598.1); sequência parcial do gene snRNA U2 de *B. westermanni* (426 pb) (GenBank No. MG450336), identidade média de 83% com o snRNA U2 de *Plectorhinchus mediterraneus* (GenBank No. JN850658.1); sequência parcial do gene H1 de *B. westermanni* (121 pb) (GenBank No. MG450334), identidade média de 93% com o H1 de *Astyanax paranae* (GenBank No. KJ129662.1); sequência parcial do gene H3 de *B. westermanni* (174 pb) (GenBank No. MG450335), identidade média de 93% com o H3 de *Ictalurus punctatus* (GenBank No. XM_017462646.1); e sequência parcial do gene H4 de *B. westermanni* (160 pb) (GenBank No. MG450345), identidade média de 96% com o H4 de *Oncorhynchus mykiss* (GenBank No. X02916.1) (Tabela S3).

6.1.4. Discussão

A estrutura cariotípica de *B. westermanni* encontrada neste estudo é idêntica à descrita por Dias & Foresti (1993). No entanto, nossos dados mostraram uma variação intra- e interindividual no

número de cromossomos B, de 0 a 4, sendo 03, o número mais frequentemente encontrado, enquanto Dias & Foresti (1993) descreveu até 05 cromossomos B, com maior frequência para 02 Bs. Os pequenos blocos de heterocromatina observados nos cromossomos A de *B. westermanni* são uma característica comum dos cromossomos de pimelodídeos (Tresco & Dias, 2009; Prado *et al.*, 2012; Swarça *et al.*, 2013). Cromossomos B heterocromáticos, como visualizados aqui, já foram relatados em outras espécies de Pimelodidae (Borin & Martins-Santos, 2004; Carvalho & Dias, 2005).

A presença de apenas um par portador da RON é a condição mais comum entre os pimelodídeos (Borin & Martins-Santos, 2002; Tresco & Dias, 2009; Carvalho *et al.*, 2010; Swarça *et al.*, 2013), e a correspondência entre os sítios CDD e RONs, observada neste estudo, já foi encontrada no genoma de outras espécies desta família (Garcia & Moreira Filho, 2005; Swarça *et al.*, 2005, 2013; Tresco *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2011). A localização dos sítios (TTAGGG)_n apenas nas regiões teloméricas indica a ausência completa ou um pequeno número de rearranjos cromossômicos do tipo translocação/fusão. Porém, a possibilidade de perda desta sequência após a ocorrência de tais rearranjos não pode ser descartada (Nanda *et al.*, 1995; Barros *et al.*, 2017).

A maioria dos estudos na área sugere que os cromossomos B surgem dos cromossomos A (Camacho *et al.*, 2000; Moreira Filho *et al.*, 2004; Houben *et al.*, 2014) e compartilham sequências homólogas com pelo menos um cromossomo A (Jesus *et al.*, 2003; Vicari *et al.*, 2011; Martis *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). Em nosso estudo, demonstramos que os cromossomos B de *B. westermanni* compartilham sequências de DNAr 45S e o microssatélite (GATA)_n com os autossomos. O par cromossômico 27 carrega esses dois tipos de sequência, sugerindo que os cromossomos B se originaram deste par. Porém, também é possível que essas sequências tenham sido incorporadas após a origem de um cromossomo B, como proposto por Valente *et al.* (2014). Neste modelo, sequências de DNA dos cromossomos A, são transferidas para os cromossomos B por recombinação não homóloga, por transcrição reversa, pela invasão de elementos transponíveis e pela duplicação de sequências de cópia única por *drive* na invasão dos elementos transponíveis

(Clark *et al.*, 2017).

Cromossomos B univalentes sofrem rápida degeneração gênica devido à invasão de elementos transponíveis, e por suas cópias parálogas de DNA que rapidamente se diversificam. Por causa disso, cromossomos B altamente diferenciados têm pouco ou nenhum sítios de reconhecimento com os cromossomos A. Quando sinais visíveis são detectados, eles geralmente correspondem a regiões que contêm seqüências repetitivas (Vicari *et al.*, 2015). Estas seqüências repetitivas podem variar em identidade e quantidade entre indivíduos da mesma população (Clark *et al.*, 2017). Essa rápida dinâmica evolutiva explica a variação em tamanho e composição de cromossomos B de *B. westermanni*, bem como o tamanho dos cistrons de DNAr.

O número máximo de cromossomos B mantidos por indivíduos de uma população é resultado do equilíbrio entre seu acúmulo nas células e os efeitos deletérios que eles podem exercer em seus hospedeiros (Camacho *et al.*, 2000). Os elementos B do genoma de *B. westermanni* foram encontrados sendo relativamente pequenos, com pouca variação no tamanho e morfologia. Os cromossomos B foram descritos como sendo univalentes, e sua manutenção em populações depende de um mecanismo de “drive” (Jones *et al.*, 2008). Três dos 4 cromossomos B observados neste estudo compartilham seqüências rDNA e (GATA)_n, bem como morfologia similar, e possivelmente sofreram um aumento na sua frequência por causa deste drive. O mecanismo de drive pode ocorrer durante, antes ou depois da meiose e levar ao acúmulo destes cromossomos nas células (Jones, 1991; Burt & Trivers, 2006). A falta de seqüências de DNAr permitiu identificação de um segundo tipo de cromossomo B nas células de *B. westermanni*. A dinâmica evolutiva de um cromossomo B segue os estágios de emergência nos genomas e um intenso período de invasão e acumulação, seguido por um longo período de neutralização, que pode levar a uma casual extinção ou a regeneração e emergência como uma nova variante (Camacho *et al.*, 2000). Assim, a análise dos B cromossomos de *B. westermanni* permitiram que algumas inferências fossem elaboradas sobre a ocorrência de cópias cromossômicas variantes como uma provável rota de fuga das “forças de neutralização” desses cromossomos no genoma do hospedeiro.

Alguns estudos sugerem que os cromossomos B influenciam na determinação sexual (Burt & Trivers, 2006; Camacho *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2014). No nosso estudo, machos e fêmeas apresentaram alta frequência de cromossomos B, não exibindo nenhuma relação com o sexo. A sequência (GATA)_n, descoberta por Epplen *et al.* (1982), está presente nos genomas de algumas espécies (Singh *et al.*, 1984; Jones & Singh, 1985; Srivastava *et al.*, 2008; Traldi *et al.*, 2013; Ziemniczak *et al.*, 2014; Pucci *et al.*, 2016). Essa sequência está envolvida na determinação do sexo (Singh *et al.*, 1984; Jones and Singh, 1985), atuando, por exemplo, na descondensação da cromatina para expressão gênica em estágios específicos de desenvolvimento (Singh *et al.*, 1994; Viger *et al.*, 1998; Priyadarshini *et al.*, 2003). Os cromossomos B de *B. westermanni* apresentam cópias repetitivas da sequência (GATA)_n, entretanto, o efeito da descondensação da cromatina nos cromossomos B heterocromáticos requer uma investigação adicional.

A localização *in situ* das sequências DNAr 5S, snRNA U2 e histonas (H1, H3 e H4) demonstrou a presença de sítios sintênicos no par cromossômico 5. A sintenia do RNAr 5S e do snRNA U2 é observada em outros eucariotos (Cross & Rebordinos, 2005; Manchado *et al.*, 2006; Scacchetti *et al.*, 2015; Yano *et al.*, 2017). A localização do RNAr 5S, do snRNA U2 e família multigênica das histonas no mesmo braço cromossômico verificada em nosso estudo, está de acordo com a tendência de clusterização de genes de housekeeping, que são genes altamente expressos e necessários para as funções celulares basais, proposta para o genoma humano (Lercher *et al.*, 2002). No gafanhoto *Abracris flavolineata*, sítios de snRNA U2 foram observados em cromossomos supranumerários (Bueno *et al.*, 2013). Sequências de histonas foram encontradas nos cromossomos B de *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2010), *A. paranae* (Silva *et al.*, 2014) e *M. sanctaefilomenae* (Utsunomia *et al.*, 2016). Em nossas análises, as sequências rDNA 5S, snRNA U2, e histonas não foram encontradas nos cromossomos B de *B. westermanni*.

A presença de cópias funcionais de genes em cromossomos B é uma questão que tem sido amplamente discutida na área da Biologia Cromossômica. Alguns estudos provaram a existência de genes funcionais em cromossomos B (Leach *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2011; Ruíz-Estévez *et al.*,

2012; Banaei- Moghaddam *et al.*, 2015), e a presença de famílias multigênicas nesses cromossomos também foi relatada (para uma revisão, ver Valente *et al.*, 2017). Além da presença de genes, foi proposto que fatores de transcrição, miRNAs e ncRNAs, incluindo lncRNAs, de cromossomos B, podem promover modificações na expressão de genes dos cromossomos A (Valente *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, encontramos evidências indiretas da expressão gênica do DNAr 45S nos cromossomos B por meio de análises de Ag-RON e FISH em núcleos interfásicos. Não foram visualizados sítios Ag-RON nesses cromossomos, mas foi demonstrada a presença de um número maior de nucléolos marcados positivamente nos núcleos interfásicos, sugerindo que o DNAr 45S possa estar ativo, descartando a hipótese de que esses sítios são pseudogenes. A falta de sinais Ag-RON nos cromossomos B durante a metáfase mitótica pode ser explicada pelo pequeno tamanho desses sítios nesses cromossomos ou pelo limite de resolução da técnica Ag-RON. Situação semelhante foi observada no gafanhoto *E. plorans*, cujo genoma tem cromossomos B inteiramente heterocromáticos, mas funcionalmente ativos, uma vez que o rDNA presente nesses cromossomos é transcrito ativamente para formar o seu nucléolo (Ruíz-Estévez *et al.*, 2012). Entretanto, a expressão do DNAr 45S nos cromossomo B em *B. westermanni* requer maiores investigações.

Para concluir, nossas análises mostraram a sintenia das sequências RNAr 45S, snRNA U2 e histonas no par cromossômico 5, e uma variação intra- e interindividual de cromossomos B, que carregam sítios de rDNA 45S, bem como a evidência indireta da expressão desses genes em *B. westermanni*.

6.1.5. Agradecimentos

Os autores são gratos à Profa. Dra. Carla Simone Pavanelli pela identificação taxonômica dos espécimes; ao ICM-Bio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (licença número 10538-1) pela autorização de coleta dos espécimes; e aos técnicos, Luis Henrique da Silva, Pedro Luis Gallo e Antônio Donizete da Silva pela ajuda com a coleta e suporte técnico. Este estudo

foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de nível superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná).

6.1.6. Referências

BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; MARTIS, M.M.; MACAS, J.; GUNDLACH, H.; HIMMELBACH, A.; *et al*: Genes on B chromosomes: old questions revisited with new tools. **Biochim Biophys Acta**, v. 1849, p. 64-70, 2015.

BARROS, A.V.; WOLSKI, M.A.V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? **Gene**, v. 608, p. 20-27, 2017.

BERTOLLO, L.A.C.; CIOFFI, M.B.; MOREIRA-FILHO, O. Direct chromosome preparation from Freshwater Teleost Fishes. In: Ozouf-Costaz, C.; Pisano, E.; Foresti, F.; Almeida-Toledo, L.F. (Eds). **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. United States: CRC Press, 2015, p. 21-26.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic aspects in species of the genus *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the river Paraná Basin. **Cytologia**, v. 67, p. 199-204, 2002.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the River Iguaçú. **Hereditas**, v. 140, p. 201-209, 2004.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. **PloS One**, v. 8, p. e66532, 2013.

BURT, A.; TRIVERS, R. **Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University, 2006, 613 p.

CAMACHO, J.P.M. Polymorphisms and geographic distribution. **Proceedings of First B Chromosome Conference**, Madrid, Spain, p. 2-4, 1993.

CAMACHO, J.P.M.; SHARBEL, T.F.; BEUKEBOOM, L.W. B-chromosome evolution. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 355, p. 163-178, 2000.

CAMACHO, J.P.M. B chromosomes. In: GREGORY, T.R. (Ed). **The evolution of genome**. San Diego: Elsevier, 2005, p. 223-286.

CAMACHO, J.P.M.; SCHMID, M.; CABRERO, J. B chromosomes and sex in animals. **Sex Dev**, v. 5, p. 155-166, 2011.

CARVALHO, R.A.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi River, Paraná, Brazil. **Cytologia**, v. 69, n. 4, p. 381-385, 2004.

CARVALHO, R.A.; DIAS, A.L. Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. **Genet Mol Res**, v. 4, n. 4, p. 663-667, 2005.

CARVALHO, R.A.; LAUDICINA, A.; GIULIANO-CAETANO, L.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. Cytogenetics analysis of the 18S, 5S rDNA and B chromosome of *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes, Pimelodidae). **Braz J Biol**, v. 70, n. 3, p. 631-636, 2010.

CARVALHO, R.A.; SANCHEZ, S.; SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. Chromosomal analyses in *Megalonema platanum* from South American rivers. **Neotrop Ichthyol**, v. 9, n. 1, p. 177-182, 2011.

CLARK, F.E.; CONTE, M.A.; FERREIRA-BRAVO, I.A.; POLETTO, A.B.; MARTINS, C.; KOCHER, T.D. Dynamic Sequence Evolution of a Sex-Associated B Chromosome in Lake Malawi Cichlid Fish. **J Hered**, v. 108, n. 1, p. 53-62, 2017.

COLGAN, D.; MCLAUCHLAN, A.; WILSON, G.; LIVINGSTON, S. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Aust J Zool**, v. 46, p. 419-437, 1998.

CROSS, I.; REBORDINOS, L. 5S rDNA and U2 snRNA are linked in the genome of *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas* oysters: does the (CT)_n.(GA)_n microsatellite stabilize this novel linkage of large tandem arrays?. **Genome**, v. 48, n. 6, p. 1116-1119, 2005.

DANTAS, E.S.O.; VICARI, M.R.; SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; ARTONI, R.F. Cytotaxonomy and karyotype evolution in *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Teleostei, Characidae). **Nucleus**, v. 50, n. 3, p. 505-518, 2007.

DIAS, A.L.; FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). **Rev Bras Genet**, v. 16, p. 585-600, 1993.

EPPLEN, J.T.; MC CARREY, JR.; SUTOU, S.; OHNO, S.; Base sequence of a cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proc Natl Acad Sci**, v. 79, p. 3798-3802, 1982.

FANTINATTI, B.E.A.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; CABRAL-DE-MELLO, D. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Genetica**, v. 139, n. 10, p. 1273-1282, 2011.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. **Neotrop Ichthyol**, v. 3, n. 2, p. 285-290, 2005.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes: Pimelodidae) of the São Francisco river: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. **Genet Mol Biol**, v. 31, n. 1, (suppl) p. 261-264, 2008.

GRAPHODATSKY, A.S.; KUKKOVA, A.V.; YUDKIN, D.V.; TRIFONOV, V.A.; VOROBIEVA, N.V.; *et al*: The proto-oncogene C-KIT maps to canid B chromosome. **Chromosome Res**, v. 13, p. 113-122, 2005.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; FORESTI, F.; PORTO-Foresti, F. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 134, p. 64-71, 2011.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P.M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in

the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 122, p. 239-244, 2004.

HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; KLEMME, S.; TIMMIS, J.N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, p. 467-478, 2013.

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

IJDO, J.W.; WELLS, R.A.; BALDINI, A.; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 17, p. 4780, 1991.

JESUS, C.M.; GALETTI Jr.; P.M.; VALENTINI, S.R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, n. 1, p. 25-32, 2003.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; *et al*: Geneious Basic: an integrated and extendable desktop *software* platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

JONES, K.W.; REES, H. **B chromosomes**. London: Academic Press, 1982. 266 p.

JONES, K.W.; SINGH, L. Snakes and the evolution of sex chromosomes. **Trends Genet**, v. 1, p. 55-61, 1985.

JONES, R.N. B-chromosome drive. **Am Nat**, v. 137, p. 430-442, 1991.

JONES, R.N.; GONZALEZ-SANCHEZ, M.; GONZALEZ-GARCIA, M.; VEJA, J.M.; PUERTAS, M.J. Chromosomes with a life of their own. **Cytogenet Genome Res**, v. 120, p. 265-280 2008.

LEACH, C.R.; HOUBEN, A.; BRUCE, F.; PISTRICK, K.; DEMIDOV, D.; TIMMIS, J.N. Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. **Genetics**, v. 171, n. 1, p. 269-278, 2005.

LERCHER, M.J.; URRUTIA, A.O.; HURST, L.D. Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. **Nat Genet**, v. 31, n. 2, p. 180, 2002.

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

LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V.P. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotech Histochem**, v. 87, p. 1-6, 2012.

MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; *et al*: Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. **Genome**, v. 49, n. 1, p. 79-86, 2006.

MARQUES, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; KLEMME, S.; BLATTNER, F.R.; NIWA, K.; GUERRA, M.; HOUBEN, A. B chromosomes of rye are highly conserved and accompanied the development of early agriculture. **Ann Bot**, v. 25, n. 7, p. 2536-2544, 2013.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: **Fish Cytogenetics**. New York: Science Publisher, 2007. p. 421-432.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res**, v. 8, p. 363-367, 1999.

MARTIS, M.M.; KLEMME, S.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; BLATTNER, F.R.; MACAS, J.; *et al*: Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. **Proc Natl Acad Sci**, v. 109, p. 13343–13346, 2012.

MATTHEY, R. L' evolution de la formule chromosomiale chez les vertebrees. **Experientia**, v. 1, p. 50-56 e 78-86, 1945.

MOREIRA FILHO, O.; GALETTI JR, P.M.; BERTOLLO, L.A.C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenet Genome Res**, v. 106, p. 230-234, 2004.

NANDA, I.; SCHNEIDER-RASP, S.; WINKING, H.; SCHIMID, M. Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. **Chromosome Res**, v. 3, p. 399-409, 1995.

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

PENDÁS, A.M.; MORAN, P.; FREIJE, J.P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet Cell Genet**, v. 67, p. 31–36, 1994.

PINEAU, P.; HENRY, M.; SUSPÈNE, R.; MARCHIO, A.; DETTAI, A.; *et al.*: A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Mol Biol Evol**, v. 22, p. 582-588, 2005.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

POLETTI, A.B.; FERREIRA, I.A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.

PRADO, F.D.; NUNES, T.L.; SENHORINI, J.A.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Cytogenetic characterization of F1, F2 and backcross hybrids of the Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Pimelodidae, Siluriformes). **Genetic Mol Biol**, v. 35, n. 1, p. 57-64, 2012.

PRIYADARSHINI, P.; MURTHY, B.S.; NAGARAJU, J.; SINGH, L. GATA-binding protein expressed predominantly in the pupal ovary of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochem**

Mol Biol, v. 33, p. 185–195, 2003.

PUCCI, M.B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; *et al*: Chromosomal spreading of microsatellites and (TTAGGG)_n sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi* genomes (Characiformes: Crenuchidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 149, n. 3, p. 182-190, 2016.

RÁBOVÁ, M.; VÖLKER, M.; PELIKÁNOVÁ, Š.; RÁB, P. Sequential Chromosome Banding in Fishes. In: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (Eds). **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. United States, CRC Press, 2015. p. 92-102.

RUIZ-ESTÉVEZ, M.; LÓPEZ-LÉON, M.D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M. B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e36600, 2012.

SCACCHETTI, P.C.; UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.; *et al*: Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei, Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes. **Cytogenet Genome Res**, v. 146, n. 2, p. 136-143, 2015.

SILVA, D.M.Z.A.; PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ- RUANO, F.J.; *et al*: Delimiting the origin of a B chromosome by fish mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PloS One**, v. 9, p. e94896, 2014.

SILVA, D.M.Z.A.; DANIEL, S.N.; CAMACHO, J.P.M.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F.J.; *et al*: Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Mol Genet Genomics**, v. 291, p. 1407-1418, 2016.

SINGH, L.; PHILLIPS, C.; JONES, K.W. The conserved nucleotide sequences of Bkm, which define Sxr in the mouse, are transcribed. **Cell**, v. 36, p. 111-120, 1984.

SINGH, L.; WADHWA, R.; NAIDU, S.; NAGARAJ, R.; GANESAN, M. Sex- and tissue-specific Bkm (GATA)-binding protein in the germ cells of heterogametic sex. **J Biol Chem**, v. 269, p. 25321–25327, 1994.

SRIVASTAVA, J.; PREMI, S.; KUMAR, S.; ALI, S. Organization and differential expression of the GACA/GATA tagged somatic and spermatozoa transcriptomes in Buffalo *Bubalus bubalis*. **BMC Genomics**, v. 9, n. 132, p. 1-17, 2008.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res**, v. 75, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A.T. **Chromosomes – organization and function**. Malden, Blackwell Publishing 2003. 275 p.

SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M.; DIAS, A.L. Karyotype divergence among populations of giant catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Pimelodidae) indicates higher species diversity. **Ichthyol Explor Freshw**, v. 16, n. 4, p. 325-330, 2005.

SWARÇA, A.C.; SANCHEZ, S.; DIAS, A.N.; FENOCCHIO, A.S. Cytogenetics of the Porthole Shovelnose Catfish *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae), a widespread species in South American rivers. **Comp Cytogenet**, v. 7, n. 2, p. 103-110 2013.

SWARÇA, A.C.; DIAS, A.L.; FENOCCHIO, A.S. Cytogenetic studies in the redbtail catfish, *Phractocephalus hemiliopterus* (Bloch & Schneider, 1801) (Siluriformes, Pimelodidae) a giant fish from Amazon basin. **Comp Cytogenet**, v. 11, p. 119, 2017.

TERUEL, M.; CABRERO, J.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J.P.M. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. **Chromosoma**, v. 119, n. 2, p. 217-225, 2010.

TRALDI, J.B.; BLANCO, D.R.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). **J Genet**, v. 92, n. 1, p. 127-130, 2013.

TRECO, F.R.; MALABARBA, L.R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. **Neotrop Ichthyol**, v. 6, p. 87-92, 2008.

TRECO, F.R.; DIAS, A.L. Karyotypes of two species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae). **Folia Biol (Kraków)**, v. 57, n. 1-2, p. 43-48, 2009.

UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; ARAYA-JAIME, C.; PANSONATO-ALVES, J.C.; SCACCHETTI, P.C. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PloS One**, v. 11, p. e0150573, 2016.

VALENTE, G.T.; CONTE, M.A.; FANTINATTI, B.E.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; CARVALHO, R.F.; *et al*: Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. **Mol Biol Evol**, v. 31, p. 2061-2072, 2014.

VALENTE, GT, NAKAJIMA, RT, FANTINATTI, BE, MARQUES, DF, ALMEIDA, RO, SIMÕES, RP, MARTINS, C. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. **Chromosoma**, v. 126, n. 1, p. 73-81, 2017.

VICARI, M.R.; PISTUNE, H.F.M.; CASTRO, J.P.; ALMEIDA, M.C.; BERTOLLO, L.A.C.; *et al*: New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v. 139, p. 1073-1081, 2011.

VICARI, M.R.; PANSONATO-ALVES, J.C.; FORESTI, F. Microdissection and Chromosome Painting. In: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (Eds). **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. United States: CRC Press, 2015. p. 144-165.

VIGER, R.S.; MERTINEIT, C.; TRASLER, J.M.; NEMER, M. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the MIS promoter. **Development**, v. 125, n. 14, p. 2665-2675, 1998.

VISSOTO, P.C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). **Chromosome Sci**, v. 3, p. 9-13, 1999.

YANO, C.F.; BERTOLLO, L.A.C.; REBORDINOS, L.; MERLO, M.A.; LIEHR, T.; *et al*: Evolutionary Dynamics of rDNAs and U2 Small Nuclear DNAs in *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae): High Variability and Particular Syntenic Organization. **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 146-154, 2017.

YOSHIDA, K.; TERAII, Y.; MIZOIRI, S.; AIBARA, M.; NISHIHARA, H.; *et al*: B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. **PloS One**, v. 7, p. e1002203, 2011.

ZIEMNICZAK, K.; TRALDI, J.B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. *In situ* Localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n Repeated DNAs and W Sex Chromosome Differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenet Genome Res**, v. 144, n. 4, 325-332, 2015.

6.1.7. Figuras e Tabelas

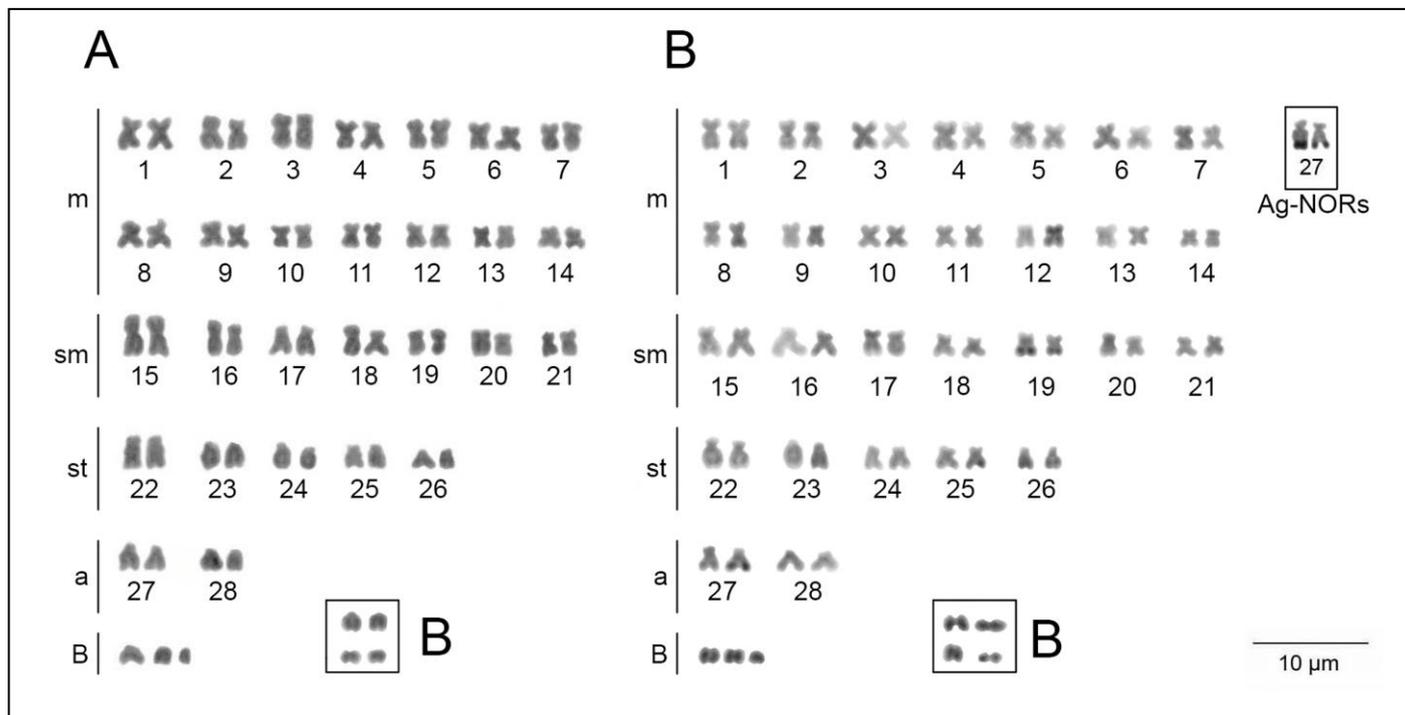


Figura 1. Cariótipos de *B. westermanni* após a coloração convencional com Giemsa (A) e bandamento C (B). Os cromossomos portadores das Ag-ROs estão em destaque no box superior direito.

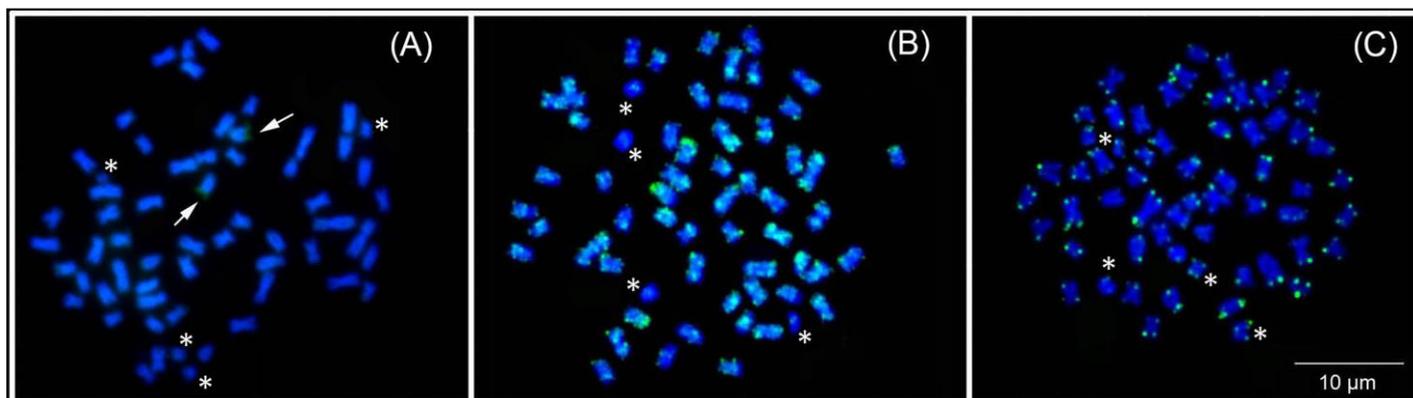


Figura 2. Metáfases de *B. westermanni* após a coloração CDD (A) e FISH com as sondas $(GATA)_n$ (B) e $(TTAGGG)_n$ (C). As setas indicam os cromossomos portadores da RON, e os asteriscos indicam os cromossomos B.

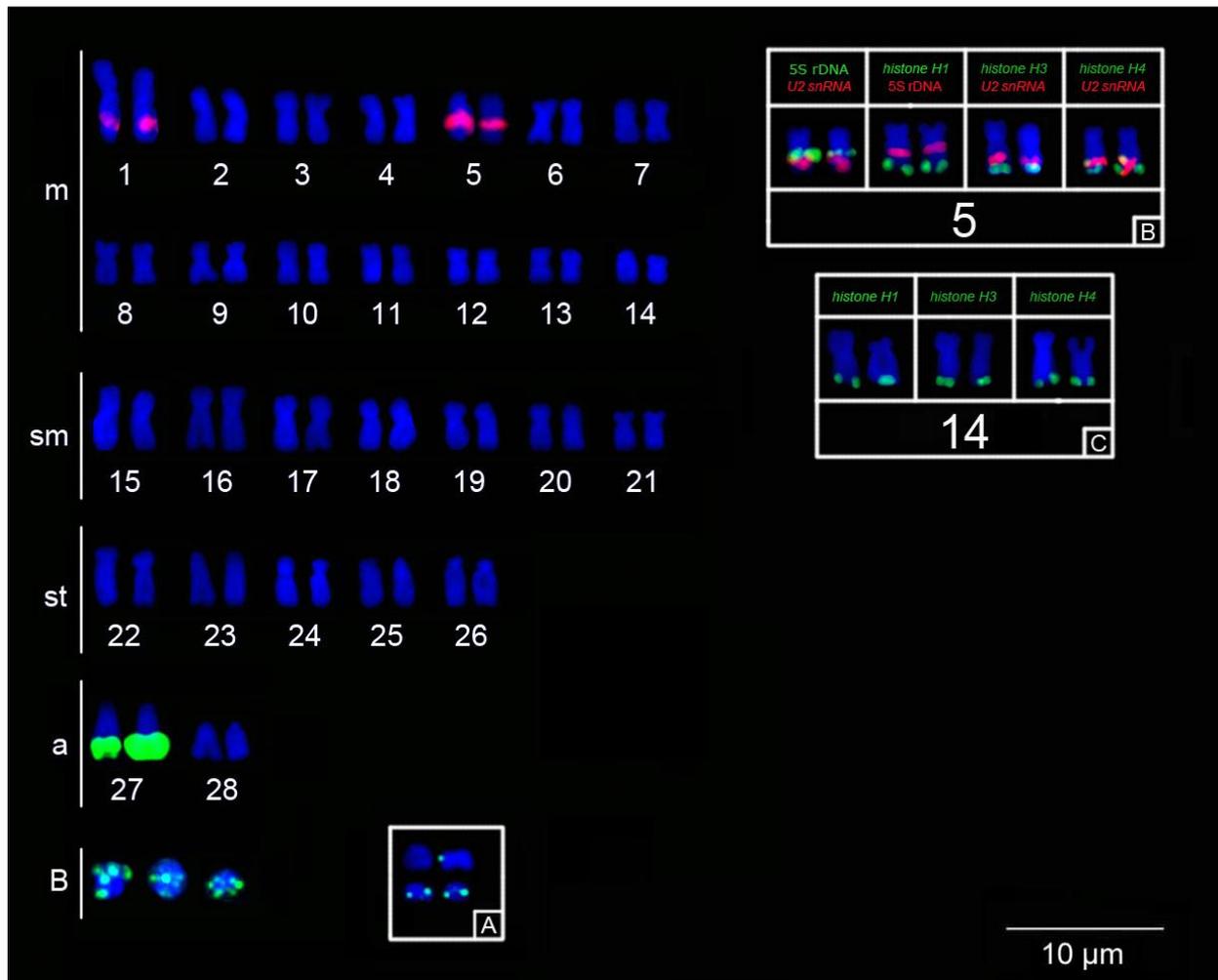


Figura 3. Cariótipo de *B. westermanni* após FISH com as sondas de rDNA 5S (sinais vermelhos) e rDNA 18S (sinais verdes). **Box A** – Sinais de rDNA 18S estão presentes em apenas 3 dos 4 cromossomos B. **Box B** – Colocalização das sequências rDNA 5S, snRNA U2, e histonas no par cromossômico 5. **Box C** – Localização das sequências de histonas par cromossômico 14.

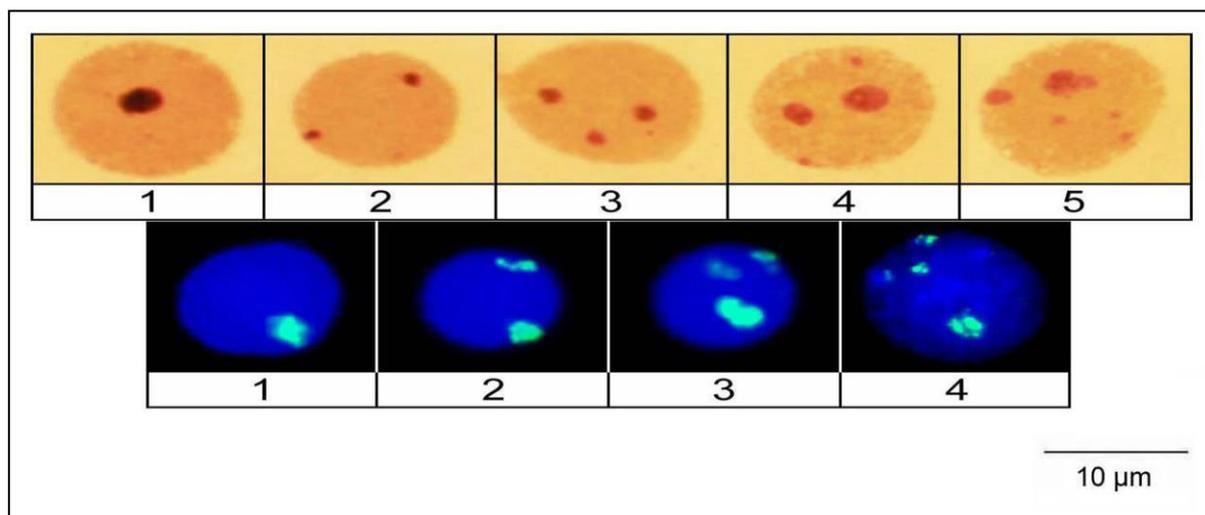


Figura 4. Número de nucléolos por núcleos evidenciados pela impregnação com nitrato de prata e FISH com rDNA 18S.

Tabela 1. População de *Bergiaria westermanni* evidenciando o número de metáfases analisadas com a presença de cromossomos B em cada espécime

Espécime	Sexo	Número de metáfases analisadas					Total de Metáfases Analisadas
		0 B	1 B	2 B	3 B	4 B	
21247	♀	1	1	6	27	3	38
21248	♀	-	2	12	21	2	37
21249	♀	2	18	4	-	1	25
21250	♀	-	1	5	7	6	19
21449	♀	-	-	-	3	1	4
21451	♀	-	1	-	-	1	2
21452	♀	-	-	-	4	5	9
21453	♀	-	1	3	4	2	10
21454	♀	-	1	3	4	-	8
21455	♂	-	3	-	5	1	9
21456	♀	-	-	3	4	-	7
21463	♂	-	-	2	1	-	3
21464	♀	-	-	-	-	1	1
21468	♀	-	-	-	3	-	3
21469	♀	-	-	2	3	13	18
Total		3	28	40	86	36	193
% B		1,6	14,5	20,7	44,6	18,6	100

Material Suplementar

Tabela S1. Protocolo para as reações de PCR e concentração dos mix.

Reação do mix	Primer Forward/Reverse	Vol (µl)	DNA (ng)	MgCl ₂ (mM)	Primer (µM)	dNTP (mM)	Taq Pol* (U/µl)
5S rDNA	5'- TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3' (Pendás <i>et al.</i> , 1994)	25	100	1,5	0,2	0,16	1
U2 snRNA	5'- ATCGCTTCTCGGCCTTATG -3' 3'- TCCCGGCGGTACTGCAATA -5' (Bueno <i>et al.</i> , 2013)	25	100	1,5	0,04	0,8	1
H1	5'-ATGGCAGAARYCGCMCCAGC-3' 5'-TACTTCTTCTTGGGSGCTGC-3' (Ziemniczak, unpublished data)	25	100	1,5	0,2	0,16	1
H3	5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3' 5'-ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC-3' (Colgan <i>et al.</i> , 1998)	25	100	1,5	0,2	0,16	1
H4	5'-TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC-3' 5'-CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT-3' (Pineau <i>et al.</i> , 2005)	25	100	1,5	0,2	0,16	1

Tabela S2. Frequência de nucléolos por núcleos em 783 núcleos de 4 indivíduos analisados com a técnica de impregnação com nitrato de prata.

Espécime	Sexo	Número de nucléolos por núcleo analisado					Total de núcleos analisados
		1	2	3	4	5	
21247	♀	108	61	7	-	-	176
21248	♀	94	77	19	4	2	196
21249	♀	113	96	24	2	2	237
21250	♀	102	69	3	-	-	174
	Total	417	303	53	6	4	783
	%	53,2	38,7	6,8	0,8	0,5	100%

Tabela S3. Dados das sequências rDNA 5S, snRNA U2 e histonas de *Bergiaria westermanni*.

Sequência parcial (<i>B. westermanni</i>)	Tamanho (pares de bases)	Número de acesso GenBank	Similaridade da sequência	
5S rDNA	179	MG450337 MG450338 MG450339 MG450340	MG450341 MG450342 MG450343 MG450344	95% - <i>Amphichthys cryptocentrus</i> isolate A2.I.2 5S ribosomal RNA gene, complete sequence; and non-transcribed spacer genomic sequence (No. acesso GenBank GU645598.1)
U2 snRNA	426	MG450336	83% - <i>Plectorhinchus mediterraneus</i> clone 7 U2 snRNA gene, partial sequence; intergenic spacer 1 and U5 snRNA gene, complete sequence; and intergenic spacer 2, partial sequence (No. acesso GenBank JN850658.1)	
Histone H1	121	MG450334	93% - <i>Astyanax paranae</i> voucher LBP13340 histone H1 gene, partial cds (No. acesso GenBank KJ129662.1)	
Histone H3	174	MG450335	91% - PREDICTED: <i>Ictalurus punctatus</i> histone H3-like (LOC108261894), partial mRNA (No. acesso GenBank XM_017462646.1)	

**Contribuições para a compreensão da diversificação
cromossômica em Pimelodidae (Siluriformes):
mapeamento citogenético comparativo de DNAs
repetitivos em duas espécies de *Pimelodus*.**

Resumo

Pimelodidae é uma família especiosa de Siluriformes, e *Pimelodus* é o gênero mais diversificado desta família. Porém, poucas são suas espécies com caracterizações cromossômicas detalhadas, geralmente restritas a caracterização a análises clássicas e a localização *in situ* dos genes de rDNAs. Este estudo analisou de forma comparativa duas espécies de *Pimelodus*: *P. microstoma* e *P. pohli* com foco na diversificação cromossômica proporcionada pela distribuição de diversas classes de DNAs repetitivos. Ambas as espécies apresentaram 56 cromossomos, com blocos heterocromáticos centroméricos e terminais. A região organizadora de nucléolo/rDNA 45S foi localizada unicamente no par 24 para as duas espécies analisadas, enquanto que o rDNA 5S foi evidenciado nos pares 1, 17 e 18 de *P. pohli* e apenas no par 8 de *P. microstoma*, evidenciando localização sintênica com o snRNA U2. Por sua vez, o snRNA U1 exibiu sítios terminais no primeiro par subtelocêntrico de *P. pohli* e *P. microstoma*. As histonas H3 e H4 mostraram-se co-localizadas nos pares 21 e 22 em *P. pohli*, e nos pares 19 e 23 em *P. microstoma*, com variações na posição dos sítios entre as espécies. Os resultados evidenciam que diferentes famílias multigênicas atuaram na diversificação cromossômica de Pimelodidae, com dispersões diferenciais no cariótipo dando suporte aos rearranjos estruturais, tais como inversões pericêntricas e/ou translocações que alteraram as fórmulas cromossômicas deste grupo de peixes.

Palavras chave: dispersão cromossômica, evolução cariotípica, famílias multigênicas, peixes

Abstract

Pimelodidae is a speciose Siluriformes family, in which the *Pimelodus* genus is the most diversified one. However, few species presents a more detailed analysis concerning chromosomal features, usually restricted to classical chromosomal characterization and *in situ* localization of rDNA genes. This study focused on the comparative cytogenetics of two *Pimelodus* species: *P. microstoma* and *P. pohli* with emphasis on the distribution of several gene families. Both species presented 56 chromosomes, with centromeric and terminal heterochromatic blocks. The nucleolus organizing region/45S rDNA was located only in the pair 24 for the two species, while the 5S rDNA was evidenced in pairs 01, 17 and 18 of *P. pohli*, and only in the pair 08 of *P. microstoma*, showing sinteny with the U2 snRNA. On the other hand, the U1 snRNA exhibited terminal sites in the first subtelocentric pair of *P. pohli* and *P. microstoma*. The H3 and H4 histones were co-located in pairs 21 and 22 of *P. pohli*, and in pairs 19 and 23 of *P. microstoma*, with variations in the position of the sites between the species. The overall data show that several multigenic families acted on the chromosomal diversification of Pimelodidae, with differential dispesion on the karyotypes suporting structural rearrangements such as pericentric inversions and/or translocations that had changed the chromosome formulas of this fish group.

Keywords: Chromosomal dispersion, fish, karyotype evolution, multigenic families

6.2.1. Introdução

Os DNAs repetitivos compõem grande parte do genoma dos eucariotos (Martins, 2007) e incluem repetições *in tandem*, (DNAs satélites, minissatélites, microssatélites e famílias multigênicas, como os DNAs ribossomais - DNAr -, genes de histonas e *small nuclear* RNAs - snRNAs), e sequências dispersas ao longo do genoma, como os transposons e retrotransposons (Charlesworth *et al.*, 1994; Sumner, 2003). Tais sequências repetitivas são consideradas excelentes marcadores citogenéticos, pois auxiliam na compreensão da estrutura e organização do genoma (Barbosa *et al.*, 2015), na detecção de rearranjos cariotípicos (Rosa *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2017), e na compreensão da evolução de cromossomos sexuais (Schemberger *et al.*, 2011; Traldi *et al.*, 2013) e cromossomos B (Polleto *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2016; Malimpensa *et al.*, 2018).

Pimelodidae é composta por 114 espécies válidas incluídas em 32 gêneros (Nelson, 2016; Fricke *et al.*, 2019), que se distribuem por toda a América Central e América do Sul (Nelson, 2016), sendo *Pimelodus* o gênero mais diverso, compreendendo 34 espécies válidas (Fricke *et al.*, 2019). Apesar do elevado número de representantes, dados citogenéticos estão disponíveis somente para 34 deles, sendo 13 destes registros para *Pimelodus* (Girardi *et al.*, 2018).

A família demonstra a predominância de número diploide ($2n$) igual a 56 cromossomos, com variações de 50, 54 e 58 cromossomos (Ramirez-Gil *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2010; Swarça *et al.*, 1999; 2001; Vasconcelos & Martins-Santos, 2000) até $2n = 60$, constatado em *Conrohynchus conirostris (incertae sedis)* (Marques *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2018). A presença de pouca quantidade de heterocromatina é característica comum no grupo (Garcia & Moreira-Filho, 2005; Ferreira *et al.*, 2014; Swarça *et al.*, 2017; 2018), apesar da ocorrência de grandes blocos nos cromossomos de *C. conirostris (incertae sedis)* (Marques *et al.*, 2008). A ocorrência de apenas um único par cromossômico portador das regiões organizadoras de nucléolo (RONs), também é frequente nas espécies da família (Dias & Foresti, 1993; Treco & Dias, 2009; Carvalho *et al.*, 2011; Swarça *et al.*, 2017; 2018).

Dados citogenéticos moleculares em Pimelodidae são escassos, e em sua maioria, mostram o mapeamento físico dos genes 45S e 5S DNAr (ver revisão em Girardi *et al.*, 2018; Malimpensa *et al.*, 2018; Swarça *et al.*, 2018). Além destes, a localização *in situ* genes de histona, snRNAs, elementos transponíveis, microssatélites e telomérica (TTAGGG)_n, evidenciaram reposicionamentos cromossômicos e diversificação em contraposição ao 2n = 56 (Vanzela *et al.*, 2002; Matoso *et al.*, 2011; Hashimoto *et al.*, 2012; Sczepanski *et al.*, 2013; Malimpensa *et al.*, 2018).

Neste estudo foi realizada uma análise citogenética comparativa para compreensão de mecanismos da diversificação cromossômica com base na movimentação das famílias multigênicas nos cromossomos de duas espécies de *Pimelodus*.

6.2.2. Materiais e Métodos

Foram analisados citogeneticamente exemplares de duas espécies de *Pimelodus*: *Pimelodus microstoma* (40 fêmeas e 27 machos), da bacia do Alto Rio Paraná; e *Pimelodus pohli* (28 fêmeas e 20 machos), da bacia do Rio São Francisco (Tab.1). As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICM-Bio - licença N°10538-1). Os experimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (número do processo CEUA 1926260315) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Brasil. Os exemplares das espécies foram depositados na Coleção Ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), estado do Paraná, Brasil (Tab. 1).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de porções do rim anterior dos animais, de acordo com Bertollo *et al.* (2015). Os cromossomos foram corados com solução de Giemsa 5% (pH 6,8) para definição do 2n e fórmulas cariotípicas. A morfologia cromossômica foi determinada segundo a classificação de Levan *et al.* (1964). O número fundamental (NF) foi determinado de acordo com Matthey *et al.* (1945), considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelo-cêntricos (st) como portadores de dois braços cromossômicos e os acrocêntricos (a) como

portadores de apenas um braço cromossômico. As regiões heterocromáticas foram evidenciadas por meio do bandamento-C (Sumner, 1972), com etapa final de coloração com iodeto de propídio (Lui *et al.*, 2012). A detecção das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) seguiu a técnica de impregnação por nitrato de prata (Howell & Black, 1980).

As sequências dos DNA ribossomais 45S e 5S foram amplificadas por PCR (*Polymerase chain reaction*), a partir de clones descritos por Hatanaka & Galetti Jr. (2004) e Martins & Galetti Jr. (2001), respectivamente. As sequências das famílias multigênicas foram amplificadas por PCR com primers descritos em: H3 (Colgan *et al.*, 1998), H4 (Pineau *et al.*, 2005), snRNA U1 (Cabral-de-Mello *et al.*, 2012) e snRNA U2 (Bueno *et al.*, 2013). As reações de amplificação seguiram o descrito por Pucci *et al.* (2018).

Para a localização *in situ* as sequências repetitivas foram marcadas por *nick translation*. O DNAr 45S e a histona H3 foram marcados com Biotina-16-dUTP (Biotin-Nick Translation Mix; Roche Applied Science, Mannheim, Germany), enquanto a histona H4 e as sequências snRNA U1 e U2, foram marcados com Digoxigenina 11-dUTP (Dig Nick Translation Mix; Roche Applied Science, Mannheim, Germany), segundo as recomendações do fabricante. O DNAr 5S foi marcado tanto com Biotina-16-dUTP quanto com Digoxigenina 11-dUTP. As hibridizações *in situ* fluorescentes (FISH) (Pinkel *et al.*, 1986), foram realizadas sob as seguintes condições de estringência: 200ng de cada sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato dextrano, 2xSSC pH 7,0, por 16h à 37°C. Os sinais foram detectados utilizando avidina-FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para as sondas de DNAs ribossomais 45S e 5S, e histona H3 (sinais verdes); e anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) para as sondas de rDNA 5S, snRNAs U1 e U2, e histona H4 (sinais vermelhos). As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51). As imagens selecionadas foram capturadas através do *software* DP2-BSW, com câmera (Olympus DP-72) acoplada ao microscópio, e posteriormente analisadas e organizadas em cariótipos. Idiogramas representativos da organização cariotípica de *P. microstoma* e *P. pohli* foram organizados utilizando o *software* Adobe®

Photoshop CS5 Extended.

6.2.3. Resultados

P. pohli e *P. microstoma* apresentam o mesmo número diplóide, $2n=56$, porém com fórmulas cariotípicas distintas: $22m+20sm+8st+6a$ e $NF = 106$ para *P. microstoma* (Fig. 1A) e $20m+18sm+12st+6a$ e $NF = 106$ para *P. pohli* (Fig. 1C). Não foram observados cromossomos B e heteromorfismo de cromossomos sexuais. O bandamento C evidenciou padrão semelhante de distribuição da heterocromatina entre as espécies, com a presença de blocos heterocromáticos localizados preferencialmente nas regiões centroméricas e terminais dos cromossomos (Figs. 1B e 1D). A impregnação com nitrato de prata mostrou a ocorrência de RONS simples, heterocromática, localizada na região terminal do braço longo (braço q) do par 24, em ambas as espécies (Fig. 1 - boxes).

Foram constatados sítios de DNAr 45S terminais e ativos apenas no braço q do par 24 em *P. pohli* e *P. microstoma* (Figs. 2A e 2B). Entretanto, sítios múltiplos de DNAr 5S ocorrem na região subterminal do braço q do par 01, e no braço p dos pares 17 e 18 em *P. pohli* (Fig. 2A), enquanto que em *P. microstoma*, esses sítios localizam-se apenas na região intersticial do braço curto (p) do par 08 (Fig. 2B). Adicionalmente, foi evidenciada a sintenia desses sítios com a sequência snRNA U2 no par 18 em *P. pohli* (Fig. 2A – box), e no par 08 em *P. microstoma* (Fig. 2B – box). O mapeamento da sequência snRNA evidenciou sítios simples no braço p, do par 20 de *P. pohli* (Fig. 2A – box), e do par 22 de *P. microstoma* (Fig. 2B – box). Em *P. pohli*, os sítios das histonas H3 e H4 encontram-se localizados na porção terminal do braço q dos pares 21 e 22 (Fig. 2A – box) e do braço q do par 19 e braço p do par 23 em *P. microstoma* (Fig. 2B – box). Uma visão geral da localização dessas distintas classes de DNAs repetitivos encontra-se no ideograma apresentado na Fig. 3.

6.2.4. Discussão

Este estudo evidenciou $2n = 56$ cromossomos em *P. microstoma* e *P. pohli*, com variação nas fórmulas cariotípicas e na localização cromossômica de algumas famílias multigênicas. Apenas cinco, das 34 espécies caracterizadas citogeneticamente na família, exibem variações no número diploide, que podem ser consequência de rearranjos cromossômicos Robertsonianos, como fusões e fissões cêntricas (Carvalho *et al.*, 2011; Girardi *et al.*, 2018). Em *Pimelodus*, a conservação do $2n=56$, com predominância de cromossomos meta- e submetacêntricos, é ainda mais evidente, dado que somente *P. fur* apresentou $2n=54$ cromossomos (ver revisão Girardi *et al.*, 2018). A localização dos blocos de heterocromatina e dos sítios Ag-RONs também foi similar nos cromossomos das espécies, demonstrando a conservação desses traços durante a diversificação cariotípica das mesmas. Entretanto, mesmo com $2n$ e número fundamental (NF = 106) idênticos entre as espécies analisadas, variações nas fórmulas cariotípicas foram evidenciadas, com $22m+20sm+8st+6a$ para *P. microstoma*, e $20m+18sm+12st+6a$ para *P. pohli*, sustentando o potencial da macroestrutura cariotípica como um marcador citotaxonômico para Pimelodidae (Moraes-Neto *et al.*, 2011). Tais variações sugerem a ocorrência de inversões cêntricas e/ou translocações associadas à evolução cromossômica desse grupo (Swarça *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2014). De fato, tais rearranjos já foram considerados os mais frequentes associados à alterações da fórmula cariotípica (Carvalho *et al.*, 2010; Moraes-Neto *et al.*, 2011), exercendo papel fundamental na diversificação cromossômica de Pimelodidae (Garcia & Moreira-Filho, 2005).

Pouca heterocromatina foi evidenciada nos cromossomos das duas espécies analisadas, com blocos heterocromáticos localizados preferencialmente nas regiões cromossômicas centroméricas e terminais, sendo tal padrão, congruente com o observado na família (Carvalho *et al.*, 2011; Girardi *et al.*, 2018; Swarça *et al.*, 2017; 2018). Além disso, a associação entre os sítios Ag-RONs e a heterocromatina, como demonstrado neste estudo, é frequente no genoma de quase todas as espécies da família (Vissoto *et al.*, 1999; Matoso *et al.*, 2011; Girardi *et al.*, 2018; Malimpensa *et al.*, 2018; Swarça *et al.*, 2018), permitindo inferir que essas características se mantiveram

conservadas durante a evolução cariotípica de Pimelodidae (Sánchez *et al.*, 2010).

Sítios Ag-RONs terminais no braço q de apenas um par cromossômico, geralmente subtelocêntrico, como verificado neste trabalho, é o arranjo comumente encontrado em Pimelodidae, sendo predominante em *Pimelodus* (Garcia & Moreira-Filho, 2005; Treco & Dias, 2009; Carvalho *et al.*, 2010; 2011; Swarça *et al.*, 2013; 2017; 2018). Entretanto, sítios Ag-RONs no braço p são mais frequentes em espécies não pertencentes ao gênero *Pimelodus* (Ramirez-Gil *et al.*, 1996; Borin & Martins-Santos, 2002; Sánchez *et al.*, 2010; Sczepanski *et al.*, 2013; Swarça *et al.*, 2013), incluindo aquelas consideradas basais em Pimelodidae (Girardi *et al.*, 2018), como nos gêneros *Phractocephalus* (Swarça *et al.*, 2017) e *Steindachneridion* (Moraes-Neto *et al.*, 2011; Swarça *et al.*, 2018). Neste contexto, sítios Ag-RONs p localizados podem ser considerados uma característica ancestral em Pimelodidae, enquanto que Ag-RONs situadas no braço q, como se observa em *Pimelodus* (Girardi *et al.*, 2018), corresponderia a uma condição derivada, destacando a importância citotaxonômica desse marcador (Carvalho *et al.*, 2010).

P. pohli e *P. microstoma* compartilham a localização do sítio Ag-RON/DNAr 45S na região terminal do braço curto de um único par cromossômico, subtelocêntrico. Esse padrão de localização é igualmente verificado na maioria das espécies de *Pimelodus*, exceto *P. fur*, *P. maculatus* e *Pimelodus* sp., que apresentam este sítio em cromossomos sm (ver revisão em Girardi *et al.*, 2018). Entretanto, em gêneros diferentes de *Pimelodus*, o sítio do DNAr 45S prevalece na região terminal de cromossomos, com a morfologia variável, ou seja, sm, st ou a (Girardi *et al.*, 2018). A condição de um único sítio de localização terminal para o DNAr 45S é característica comum em Pimelodidae, apesar da variação na localização e tipos cromossômicos destas marcações evidenciarem rearranjos cromossômicos no grupo. Em contrapartida ao conservadorismo cromossômico observado para o DNAr 45S, os sítios do DNAr 5S variaram em número e localização. *P. microstoma* exibiu somente um par cromossômico portador dessas sequências no cariótipo, condição esta predominante em Pimelodidae (Girardi *et al.*, 2018). Entretanto, sítios múltiplos de DNAr 5S ocorrem em *P. pohli* localizados na região subterminal ou proximal de 03 pares cromossômicos, dando destaque à

importante diferenciação citogenômica que ocorreu entre *P. pohli* e *P. microstoma*. De fato, sítios múltiplos do DNAr 5S são predominantes no grupo (Garcia & Moreira-Filho, 2008; Girardi *et al.*, 2018), permitindo inferir que alguns rearranjos associados à essas sequências, ocorreram durante o processo de evolução cariotípica dos Pimelodidae (Girardi *et al.*, 2018).

Do ponto de vista da posição do DNAr 5S nos braços cromossômicos, observamos variação entre as espécies analisadas. Enquanto *P. microstoma* apresentou sítios apenas no braço p, *P. pohli* exibiu marcações tanto no braço q (par 1) quanto no braço p (pares 17 e 18). A presença de sítios restritos ao braço q dos cromossomos é predominante em *Pimelodus* (Girardi *et al.*, 2018), mas também pode ser encontrada em outras espécies de Pimelodidae, como em *Bergiaria westermanni* (Malimpensa *et al.*, 2018) e *Iheringichtys labrosus* (Carvalho & Dias, 2007; Carvalho *et al.*, 2010). Entretanto, nos outros gêneros da família, como *Pseudoplatystoma* e *Sorubim*, e os basais *Phractocephalus* e *Steindachneridion*, os sítios do DNAr 5S são encontrados apenas no braço p (Girardi *et al.*, 2018), sendo um indicativo de que esta seja a condição ancestral para a família.

A localização dos genes de DNAr 45S e 5S em pares distintos, como constatado neste trabalho, é o arranjo comumente encontrado em peixes, sugerindo que essa possa ser a condição basal no grupo (Martins & Galetti Jr., 1999; 2001). Apesar disso, casos de sintenia entre essas sequências podem ser verificados em diversas espécies de peixes neotropicais (Vicari *et al.*, 2006; Mariotto *et al.*, 2011; Ziemniczak *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014; Traldi *et al.*, 2013; 2016). Nas espécies *P. britskii* e *P. maculatus* o DNAr 5S foi localizado sintênico ao DNAr 45S (Moraes-Neto *et al.*, 2011; Girardi *et al.*, 2018), indicando ser uma condição derivada nestas duas espécies estritamente relacionadas (Girardi *et al.*, 2018). Todas as variações na localização dos DNAs ribossomais em Pimelodidae coincidem com reposicionamentos cromossômicos que alteraram a forma dos cromossomos, evidenciando a importância dessas famílias gênicas como marcadores para o grupo.

Contrariamente aos DNAs ribossomais, que vêm sendo extensivamente mapeadas nos cromossomos de peixes, outras sequências repetitivas, tais como os elementos transponíveis, os

genes de histonas e os snRNAs, ainda são pobremente exploradas (Utsunomia *et al.*, 2014).

Nossos dados mostram o compartilhamento do snRNA U1 no primeiro par st em *P. pohli* e *P. microstoma*. A condição de sítio único do snRNA U1 também ocorre em diversas espécies de ciclídios (Cabral-de-Mello *et al.*, 2012), apesar de sítios múltiplos serem comumente observados (García-Souto *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015). Por outro lado, a ocorrência de em um único sítio é a condição mais comumente encontrada para o snRNA U2 entre os peixes (Utsunomia *et al.*, 2014; Scacchetti *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015; Yano *et al.*, 2017; Pucci *et al.*, 2018), e em diversas vezes, em sintenia com o DNAr 5S (Manchado *et al.*, 2006; Scacchetti *et al.*, 2015; Yano *et al.*, 2017), condição esta também verificada em pares cromossômicos distintos entre as duas espécies ora analisadas, assim como em *B. westermanni* (Malimpensa *et al.*, 2018). Contudo, a condição dispersa para o gene snRNA U2 também é observada em vários grupos de peixes, como em Batrachoidiformes, Perciformes, *Abudelfuf*, *Gymnotus*, *Pantodon* (Úbeda-Manzanaro *et al.*, 2010; Merlo *et al.*, 2012; Getlekha *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017). A variabilidade na localização cromossômica dos sítios dos snRNA indica que múltiplos eventos de transposição entre cromossomos não-homólogos possam ter ocorrido ao longo da evolução dessas espécies, levando a movimentação destes blocos cromossômicos ou a dispersão dos snRNAs para mais de um par cromossômico (García-Souto *et al.*, 2015), hipótese congruente com o sugerido por Marz *et al.* (2008), de que as sequências snRNAs se comportam como elementos transponíveis em metazoários.

Ainda que os DNA ribossomais possam apresentar condições de ligação com outras famílias multigênicas (Martins & Galetti Jr., 2001), nenhuma das espécies aqui analisadas, evidenciou essa ocorrência em relação às histonas. No entanto, blocos sintênicos das histonas com os DNAs ribossomais 45S e 5S é verificada em outras espécies de peixes (Hashimoto *et al.*, 2011; 2012; Silva *et al.*, 2013; 2014; 2015; Pansonato-Alves *et al.*, 2013a,b; Malimpensa *et al.*, 2018). Para os Pimelodidae, dados a respeito do mapeamento físico das histonas estão disponíveis apenas para o gene H1 em espécies de *Pseudoplatystoma* (Hashimoto *et al.*, 2012), e para os genes H1, H3 e H4 em *B. westermanni* (Malimpensa *et al.*, 2018). Nesta última foi demonstrada a ocorrência de um

bloco sintênico relacionado as três famílias gênicas (DNAr 5S, snRNA U2 e cluster histônico H1/H3/H4) no braço q de um par m, além de cluster histônico em mais um par cromossômico (Malimpensa *et al.*, 2018). Nossos dados evidenciam ausência de sintenia das histonas H3 e H4 em relação a outras famílias multigênicas, e, embora um par portador do cluster H3/H4 possa ser comparável entre *P. pohli* e *P. microstoma*, a sua posição diferenciada em *P. microstoma* evidencia rearranjos do tipo inversão pericêntrica e/ou translocação ocorridos na diversificação cromossômica dessas duas espécies.

Em conjunto, os dados cromossômicos ora obtidos mostram-se em parte congruentes com as propostas de conservadorismo para diversas características citogenéticas em Pimelodidae, como o $2n$, o NF, e a localização da heterocromatina nos cromossomos. Em contrapartida, as extensas variações nas fórmulas cariotípicas assim como na distribuição diferenciada de várias famílias gênicas ao longo do cariótipo destacam a diversificação genômica entre as espécies, assim como os rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo de sua história evolutiva.

6.2.5. Referências

BARBOSA, P.; de OLIVEIRA, L.A.; PUCCI, M.B.; SANTOS, M.H.; MOREIRA-FILHO, O.; *et al.* Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Genetica**, v. 143, n. 1, p. 55-62, 2015.

BARROS, A.V.; WOLSKI, M.A.V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? **Gene**, v. 608, p. 20-27, 2017.

BERTOLLO, L.A.C.; CIOFFI, M.B.; MOREIRA-FILHO, O. Direct chromosome preparation from Freshwater Teleost Fishes. In: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (Eds). **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. United States: CRC Press, 2015, p. 21-26.

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic aspects in species of the genus *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the river Paraná Basin. **Cytologia**, v. 67, p. 199-204, 2002.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. **PloS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; VALENTE, G.T.; NAKAJIMA, R.T.; MARTINS, C. Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Res**, v. 20, n. 2, p. 279-292, 2012.

CARVALHO, R.A.; DIAS, A.L. Interindividual size heteromorphism of NOR and chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. **Braz Arch Biol Technol**, v. 50, n. 1, p. 141-146, 2007.

CARVALHO, R.A.; LAUDICINA, A.; GIULIANO-CAETANO, L.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. Cytogenetics analysis of the 18S, 5S rDNA and B chromosome of *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes, Pimelodidae). **Braz J Biol**, v. 70, n. 3, p. 631-636, 2010.

CARVALHO, R.A.; SANCHEZ, S., SWARÇA, A.C., FENOCCHIO, A.S., MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. Chromosomal analyses in *Megalonema platanum* (Siluriformes: Pimelodidae), an endangered species from South American rivers. **Neotrop Ichthyol**, v. 9, p. 177-182, 2011.

CARVALHO, D.C.; BEHEREGARAY, L.B. Conservation genetics of the threatened catfish *Conorhynchus conirostris* (Siluriformes: incertae sedis), an evolutionary relict endemic to the São Francisco River Basin, Brazil. **Conserv Genet**, v. 19, n. 5, p. 1223-1230, 2018.

CHARLESWORTH, B.; SNLEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.

COLGAN, D.; MCLAUCHLAN, A.; WILSON, G.; LIVINGSTON, S. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Aust J Zool**, v. 46, p. 419-437, 1998.

DIAS, A.L.; FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae

(Siluroidei). **Rev Bras Genet**, v. 16, p. 585-600, 1993.

FERREIRA, M.; BRESSANE, K.C.O.; MORESCO, A.R.C.; MOREIRA-FILHO, O.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; GARCIA, C. Comparative application of direct sequencing, PCR-RFLP, and cytogenetic markers in the genetic characterization of *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) species: Possible implications for fish conservation. **Genet Mol Res**, v. 13, p. 4529-4544, 2014.

FRICKE, R.; ESCHEMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. California Academy of Sciences, 2019. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/speciesbyfamily.asp#Pimelodidae>>. Acesso em 20 de jan. de 2019.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. **Neotrop Ichthyol**, v. 3, n. 2, p. 285-290, 2005.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes: Pimelodidae) of the São Francisco river: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. **Genet Mol Biol**, v. 31, n. 1, p. 261-264, 2008.

GARCÍA-SOUTO, D.; TRONCOSO, T.; PÉREZ, M.; PASANTES, J.J. Molecular cytogenetic analysis of the european hake *Merluccius merluccius* (Merlucciidae, Gadiformes): U1 and U2 snRNA gene clusters map to the same location. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0146150, 2015.

GETLEKHA, N.; MOLINA, W.F.; CIOFFI, M.B.; YANO, C.F.; MANEECHOT, N.; *et al.* Repetitive DNAs highlight the role of chromosomal fusions in the karyotype evolution of *Dascyllus* species (Pomacentridae, Perciformes). **Genetica**, v. 144, n. 2, p. 203-211, 2016.

GIRARDI, S.C.; PAVANELLI, C.S.; MARGARIDO, V.P. Contributions to the systematic of Pimelodidae (Osteichthyes, Siluriformes): basic and molecular cytogenetics on seven species of *Pimelodus* from three Brazilian hydrographic systems. **Neotrop Ichthyol**, v. 16, n. 2, 2018.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 134, p. 64-71, 2011.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; PRADO, F.D.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Cytogenet Genome Res**, v. 139, n. 2, p. 102-106, 2012.

HATANAKA, T.; GALETTI JR., P.M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 122, p. 239-244, 2004.

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

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

LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V.P. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotech Histochem**, v. 87, p. 1-6, 2012.

MALIMPENSA, G.C.; TRALDI, J.B.; TOYAMA, D.; HENRIQUE-SILVA, F.; VICARI, M.R.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal Mapping of Repeat DNA in *Bergiaria westermanni* (Pimelodidae, Siluriformes): Localization of 45S rDNA in B Chromosomes. **Cytogenet and Genome Res**, v. 154, n. 2, p. 99-106, 2018.

MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; *et al*: Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. **Genome**, v. 49, n. 1, p. 79-86, 2006.

MARQUES, M.B.A.; MOREIRA-FILHO, O.; GARCIA, C.; MARGARIDO, V.P. Cytogenetic analyses of two endemic fish species from the São Francisco River basin: *Conorhynchus conirostris* and *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes). **Genet Mol Biol**, v. 31, n. 1, p. 215-221, 2008.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: **Fish Cytogenetics**. New York: Science Publisher, 2007. p. 421-432.

MARTINS, C; GALETTI Jr., P.M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v. 44, n. 5, p. 903-910, 2001.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comp Cytogenet**, v. 5, p. 289-300, 2011.

MARZ, M.; KIRSTEN, T.; STADLER, P. Evolution of spliceosomal snRNA genes in metazoan animals. **J Mol Evol**, v. 67, p. 594-607, 2008.

MATTHEY, R. L' evolution de la formule chromosomiale chez les vertebrees. **Experientia**, v. 1, p. 50-56 e 78-86, 1945.

MATOSO, D.A.; VAL, V.M.F.A.; SILVA, M.; MORAES-NETO, A.; ALMEIDA, C.; *et al*. Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodidae): a reappraisal the existence of sex chromosome system in the species. **Fish Biol Fisheries**, v. 21, p. 497-508, 2011.

MERLO, M.A.; CROSS, I.; PALAZÓN, J.L.; ÚBEDA-MANZANARO, M.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Evidence for 5S rDNA Horizontal Transfer in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. **BMC Evol Biol**, v. 12, n. 1, p. 201, 2012.

MORAES NETO, A.; SILVA, M.D.; MATOSO, D.A.; VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.D.; *et al*. Karyotype variability in Neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes). **Neotrop Ichthyol**, v. 9, n. 1, p. 97-105, 2011.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 5 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, New Jersey, 2016. 707 p.

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

PANSONATO-ALVES, J.C.; HILSDORF, A.W.S.; UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.A.; OLIVEIRA, C. FORESTI, F. Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 141, p. 133-142, 2013b.

PINEAU, P.; HENRY, M.; SUSPÈNE, R.; MARCHIO, A.; DETTAI, A.; *et al.*: A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Mol Biol Evol**, v. 22, p. 582-588, 2005.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

POLETO, A. B.; FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, 2010.

PUCCI, M.B.; NOGAROTO, V.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Dispersion of transposable elements and multigene families: Microstructural variation in *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) genomes. **Genet Mol Biol**, n. AHEAD, 2018.

RAMIREZ-GIL, H.; FELDBERG, E., ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L. Karyological, biochemical, and physiological aspects of *Callophysus macropterus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Solimões and Negro Rivers (Central Amazon). **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 11, p. 1449-1458, 1998.

ROSA, K.O.; ZIEMNICZAK, K., DE BARROS, A.V., NOGAROTO, V., ALMEIDA, M. C.; *et al.* Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Rev Fish Biol Fish**, v. 22, p. 739-749, 2012.

SCZEPANSKI, T.S.; VICARI, M.R.; DE ALMEIDA, M.C.; NOGAROTO, V.; ARTONI, R.F. Chromosomal organization of repetitive DNA in *Sorubim lima* (Teleostei; Pimelodidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 141, n. 4, p. 309-316, 2013.

SANCHEZ, S.; SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S. Cytogenetic Studies and Evolutive Considerations in Species of the *Calophysus* Group (Siluriformes, Pimelodinae). **Cytologia**, v. 75, n. 3, p. 223-227, 2010.

SANCHEZ, S.; SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S. Cytogenetics analyses among populations of the fish *Iheringichthys labrosus* (Kröyer, 1874) (Siluriformes, Pimelodidae). Karyotype analysis, C-banding and AgRONS distribution. **Braz J Biol**, v. 74, n. 1, p. 212-216, 2014.

SCACCHETTI, P.C.; UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.; *et al.*: Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei, Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes. **Cytogenet Genome Res**, v. 146, n. 2, p. 136-143, 2015.

SCHEMBERGER, M.O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; SCHÜHLI, G.S.; *et al.*: Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, v. 139, n. 11-12, p. 1499-1508, 2011.

SILVA, D.M.Z.A.; PANSONATO-ALVES, J. C., UTSUNOMIA, R., DANIEL, S. N., HASHIMOTO, D.T.; *et al.*: Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**, v. 141, p. 329-336, 2013.

SILVA, D.M.Z.A.; PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ- RUANO, F.J.; *et al.*: Delimiting the origin of a B chromosome by fish mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PloS One**, v. 9, p. e94896, 2014.

SILVA, D.M.Z.A.; UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. **Cytogenet Genome Res**, v. 146, n. 2, p. 144-152, 2015.

SILVA, D.M.Z.A.; DANIEL, S.N.; CAMACHO, J.P.M.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F.J.; *et al.*: Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Mol Genet Genomics**, v. 291, p. 1407-1418, 2016.

SOUZA, A.C.P.; NAGAMACHI, C.Y.; RISSINO, J.D.; JÚNIOR, J.R.C.; BARROS, R.M.S.; PICZARKA, J.C. Descrição cariotípica de *Pimelodus cf. Maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae). **Anais do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. Manaus, AM, p.90, 2000.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res**, v. 75, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A.T. **Chromosomes – organization and function**. Malden, Blackwell Publishing 2003. 275 p.

SWARÇA, A.L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetic characterization through chromosomic banding of *Pirinampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi river basin PR/Brazil. **Caryologia**, v. 52, n. 1-2, p. 31-35, 1999.

SWARÇA, A.L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L.; CESTARI, M.M. AgNO₃, CMA₃ e FISH em duas populações de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces, Pimelodidae). **Anais do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**, Manaus – AM, p. 94, 2000.

SWARÇA, A. C.; GIULIANO-CAETANO, L.; VANZELA, A. L. L.; DIAS, A. L. Heteromorphism of rDNA size in *Pirinampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) detected by in situ hybridization. **Cytologia**, 66: 275 – 278, 2001.

SWARÇA, A.C.; SANCHEZ, S.; DIAS, A.N.; FENOCCHIO, A.S. Cytogenetics of the Porthole Shovelnose Catfish *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae), a widespread species in South American rivers. **Comp Cytogenet**, v. 7, n. 2, p. 103-110 2013.

SWARÇA, A.C.; DIAS, A.L.; FENOCCHIO, A.S. Cytogenetic studies in the redbtail catfish, *Phractocephalus hemioliopterus* (Bloch & Schneider, 1801) (Siluriformes, Pimelodidae) a giant fish from Amazon basin. **Comp Cytogenet**, v. 11, p. 119, 2017.

SWARÇA, A.C.; ORSI, M.L.; TAKAGUI, F.H.; DIAS, A.L.; DERGAM, J.A.; FENOCCHIO, A.S. First chromosome data on *Steindachneridion doceanum* (Siluriformes: Pimelodidae): a critically endangered catfish endemic of the Doce River basin, Brazil. **Neotrop Ichthyol**, v. 16, n. 4, 2018.

TRALDI, J.B.; BLANCO, D.R.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). **J Genet**, v. 92, n. 1, p. 127-130, 2013.

TRALDI, J.B.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.F.; BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosome analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisii* (Characiformes, Parodontidae): an extensive chromosomal polymorphism of 45S and 5S ribosomal DNAs. **Zebrafish**, v. 13, n. 1, p. 19-25, 2016.

TRECO, F.R.; DIAS, A.L. Karyotypes of two species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae). **Folia Biol (Kraków)**, v. 57, n. 1-2, p. 43-48, 2009.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZÓN, J.L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**, v. 138, p. 787-794, 2010.

UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J. C., SCACCHETTI, P. C., OLIVEIRA, C., & FORESTI, F. Scattered organization of the histone multigene family and transposable elements in *Synbranchus*. **Genet Mol Biol**, v. 37, n. 1, p. 30-36, 2014.

VANZELA, A.L.L.; SWARÇA, A.C.; DIAS, A L.; STOLF, R.; RUAS, P.M.; *et al.* Differential distribution of (GA)₉₊C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. **Cytologia**, v. 67, n. 1, p. 9-13, 2002.

VASCONCELOS, C. de; MARTINS-SANTOS, I.C. Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). **Hereditas**, v. 132, n. 2, p. 103-109, 2000.

VICARI, M.R.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 114, p. 163-168, 2006.

VISSOTO, P.C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). **Chromosome Sci**, v. 3, p. 9-13, 1999.

XU, D.; MOLINA, W.F.; YANO, C.F.; ZHANG, Y.; DE OLIVEIRA, E.A.; *et al.* Comparative cytogenetics in three Sciaenid species (Teleostei, Perciformes): evidence of interspecific chromosomal diversification. **Molecular Cytogenetics**, v. 10, n. 1, p. 37, 2017.

YANO, C.F.; BERTOLLO, L.A.C.; REBORDINOS, L.; MERLO, M.A.; LIEHR, T.; *et al.* Evolutionary Dynamics of rDNAs and U2 Small Nuclear DNAs in *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae): High Variability and Particular Syntenic Organization. **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 146-154, 2017.

ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A.V.; ROSA, K.O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; *et al.* Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Ital J Zool**, v. 79, p. 1-10, 2012.

6.2.7. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Dados das amostras e números de depósito das espécies analisadas.

Espécie	Localidade	Município	Bacia	Sexo		Número de Depósito	Latitude/Longitude
				♀	♂		
<i>Pimelodus pohli</i>	Rio São Francisco	Vargem Bonita (MG)	São Francisco	9	8	MZUEL 19072 MZUEL 19076 MZUEL 19080	S - 20° 19' 30,36" O - 46° 22' 38,10"
	Rio Piumhi	Piumhi (MG)		19	11		S - 20° 21' 23,2" O - 45° 58' 54,6"
<i>Pimelodus microstoma</i>	Rio Mogi-Guaçu	Pirassununga (SP)	Alto Paraná	40	27	MZUEL 19069 MZUEL 19070 MZUEL 19071 MZUEL 19073 MZUEL 19074	S - 21° 55' 33,8" O - 47° 22' 06,0"

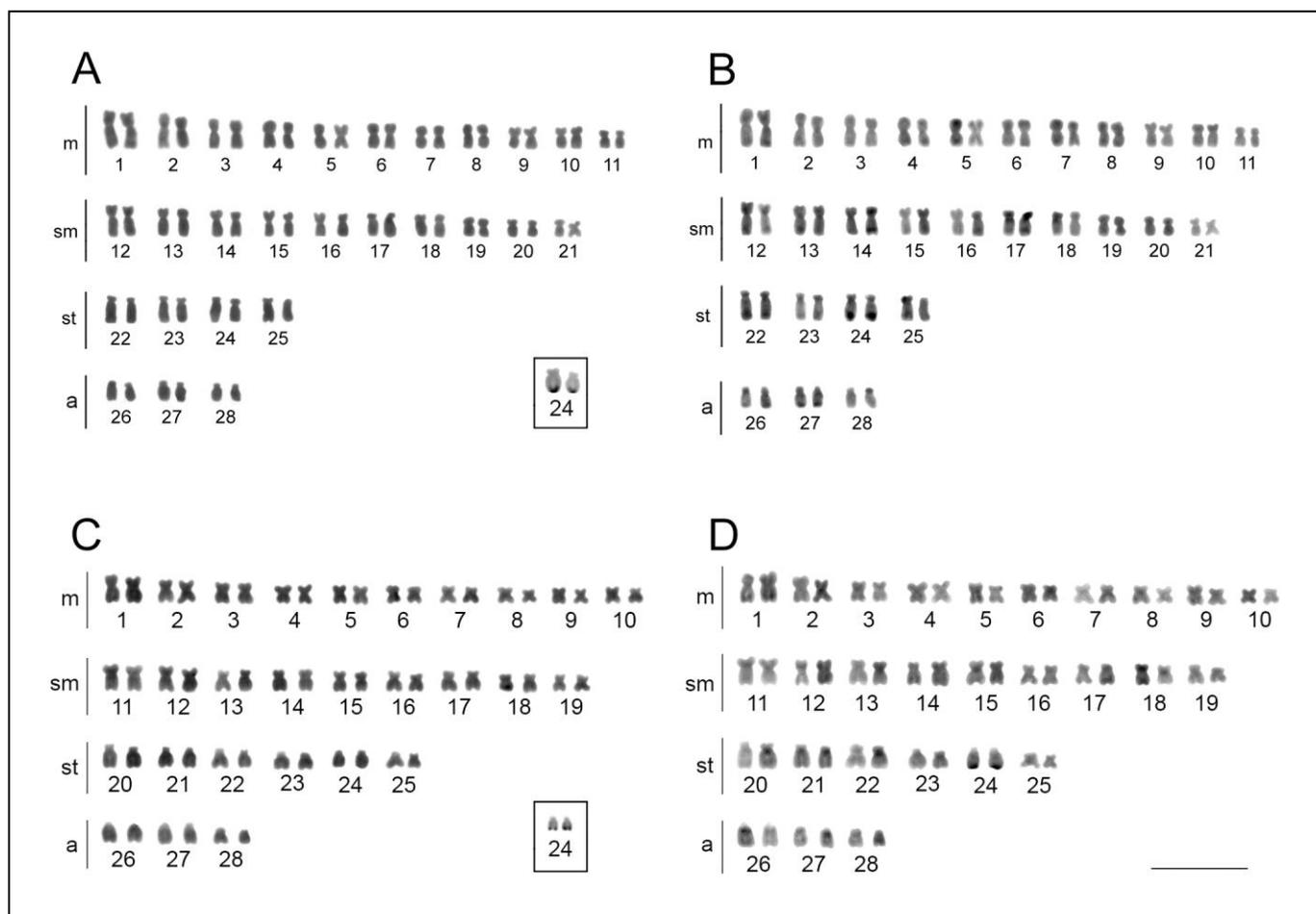


Figura 1. Cariótipos de *Pimelodus microstoma* (A e B) e *Pimelodus pohli* (C e D), evidenciando a coloração convencional com Giemsa (A e C) e o bandamento C (B e D), respectivamente. Cromossomos portadores dos sítios Ag-RONs estão destacados nos *boxes*. Barra = 5μm.

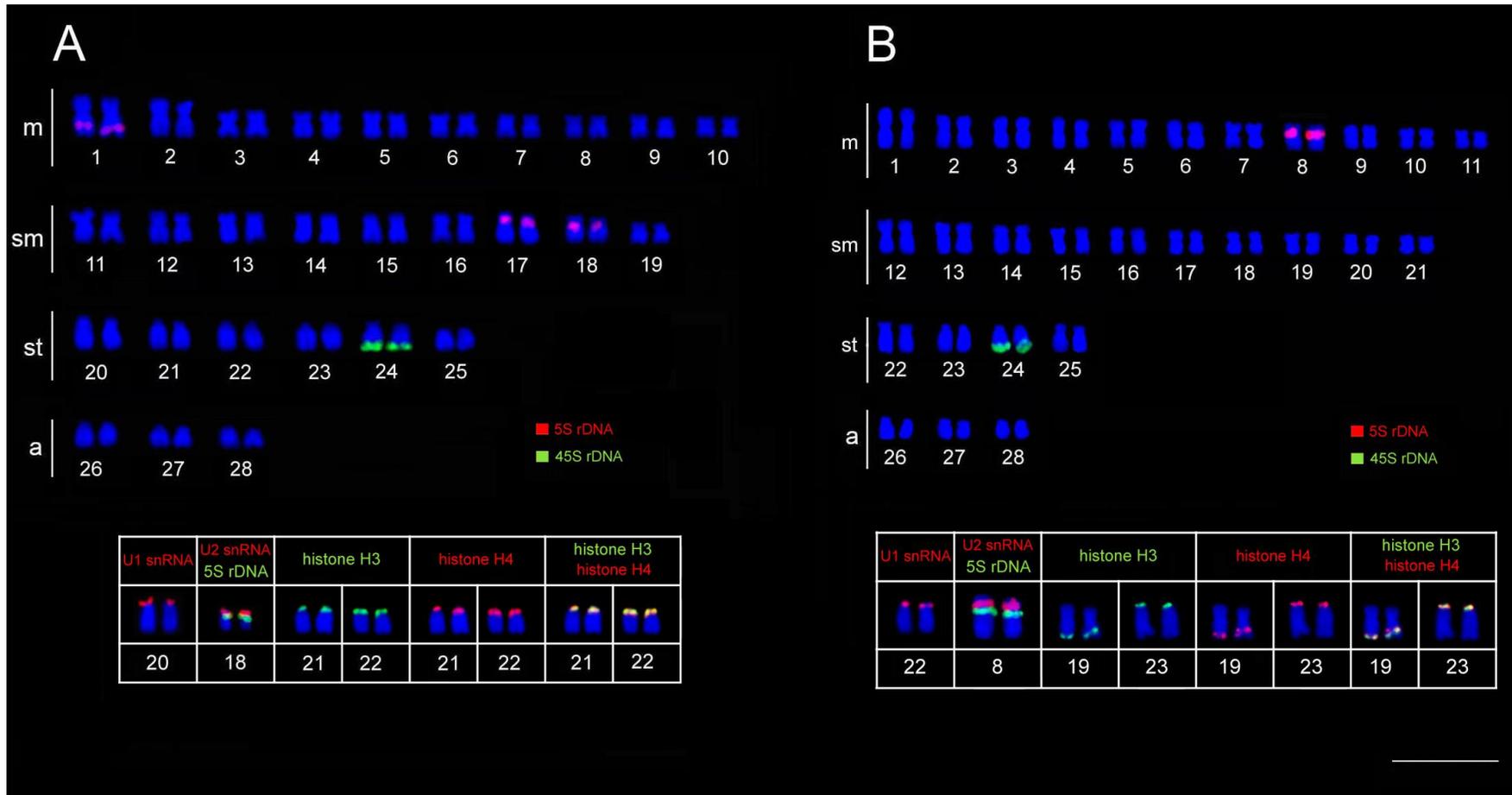


Figura 2. Cariótipos de *Pimelodus pohli* (A) e *Pimelodus microstoma* (B) submetidos à FISH com sondas de rDNA 45S (sinal verde) e rDNA 5S (sinal vermelho). Os resultados com as sondas snRNAs U1 e U2, e histonas H3 e H4 estão destacados nos *boxes*. Barra = 5 μm.

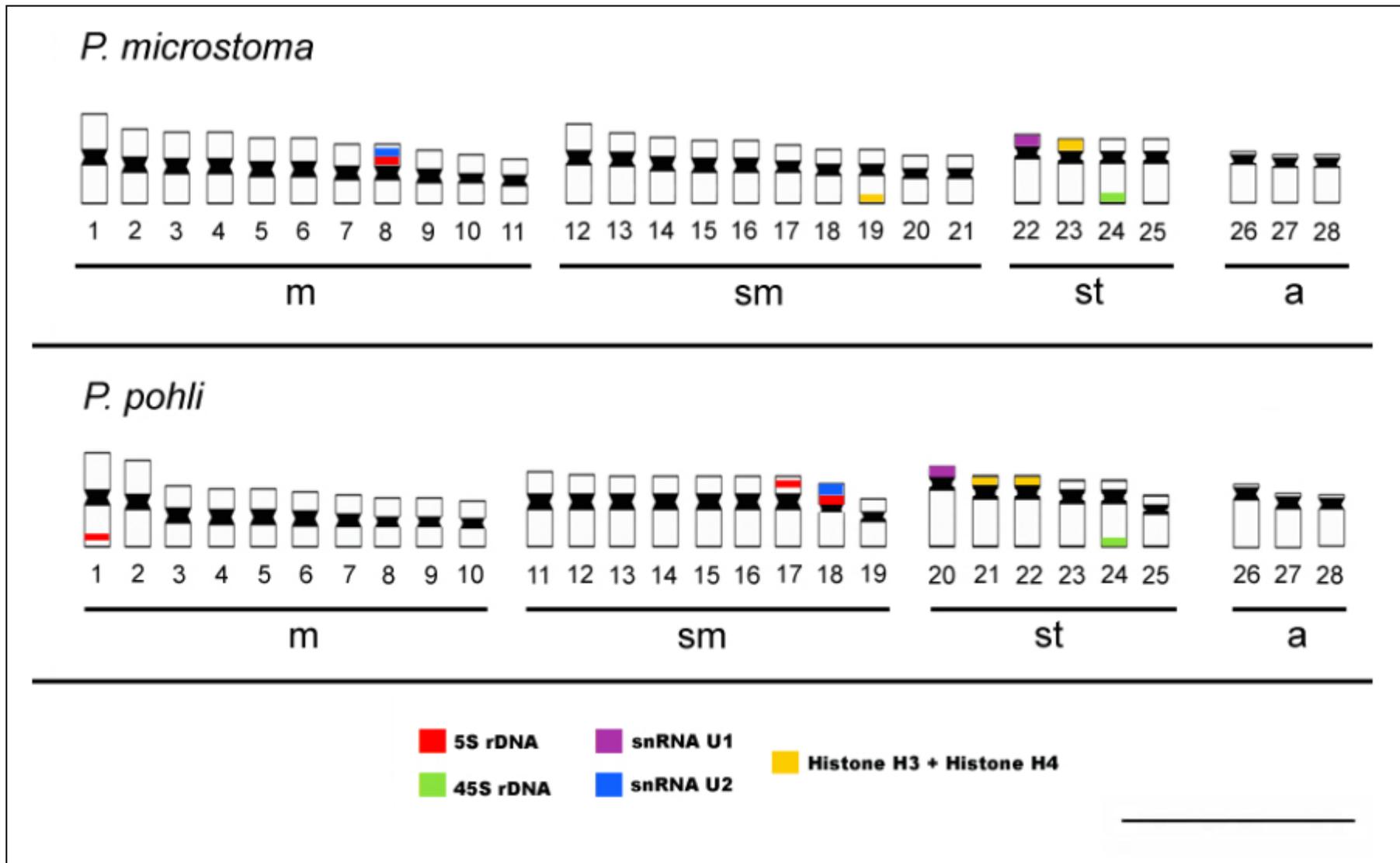


Figura 3. Idiograma das espécies de *Pimelodus* estudadas com os dados obtidos com o mapeamento dos DNAs repetitivos. Barra = 5 μ m.

Similaridades e diferenciações genômicas entre espécies de Pimelodidae (Siluriformes) inferidas pelo mapeamento cromossômico de repetições microssatélites.

Resumo

Pimelodidae compreende uma grande diversidade de peixes neotropicais, sendo composta por 114 espécies válidas. Entretanto, os dados citogenéticos disponíveis se limitam a poucos representantes da família, e restringem-se apenas a caracterização cromossômica clássica, carecendo de informações sobre as sequências repetitivas, dentre elas, os microssatélites ou sequências simples repetidas (SSRs). As SSRs são sequências curtas de DNA, repetidas *in tandem* ao longo do genoma, compostas por 1-6 pb e altamente polimórficas. Nesse contexto, com o objetivo de contribuir para a melhor caracterização e compreensão do conteúdo genômico de Pimelodidae, o presente trabalho mapeou, por meio de hibridizações *in situ* fluorescente (FISH), treze repetições microssatélites nos cromossomos das espécies *Bergiaria westermanni*, *Pimelodus pohli*, ambas provenientes da bacia do rio São Francisco, e *Pimelodus microstoma*, da bacia do alto rio Paraná. Os microssatélites apresentaram padrão de distribuição semelhante entre as espécies, acumulando-se preferencialmente nas regiões terminais e subterminais, mas alguns exibindo *clusters* mais proeminentes em cromossomos específicos. Particularmente, os cromossomos B de *B. westermanni* exibiram marcações uniformes para todos os microssatélites testados, incluindo a sequência (GATA)_n, a qual se mostrou dispersa pelo cariótipo das três espécies, com a ocorrência de um cluster bem conspícuo nos telômeros de um par cromossômico metacêntrico de *P. microstoma*. Apesar dos resultados evidenciarem uma conservação geral do conteúdo e distribuição de diversas classes de microssatélites, a ocorrência de *clusters* espécie-específicos demonstram que as SSRs também apresentam papel relevante na diversificação do genoma entre os Pimelodidae.

Palavras-Chave: FISH, (GATA)_n, microssatélites, Pimelodidae

Abstract

Pimelodidae comprises a large variety of Neotropical fishes, being composed by 114 species. However, cytogenetic data are limited to a few representatives of the family, and are mainly restricted to a classical chromosomal characterization. Simple repeated sequences (SSRs) are DNA sequences repeated *in tandem* in the genome, composed by 1-6 bp and highly polymorphic. In this context, with the aim to contribute to a better characterization of the genomic content of Pimelodidae species, the present work mapped, 13 microsatellite repeats were mapped by FISH on the chromosomes of *Bergiaria westermanni*, *Pimelodus pohli*, both from the São Francisco River basin, and *Pimelodus microstoma*, from the Upper Paraná River basin. Microsatellites showed a similar distribution pattern among species, with a preferentially accumulation in the terminal and subterminal chromosomal regions, but some of them exhibiting more prominent clusters on specific chromosomes. The B chromosomes of *B. westermanni* exhibited uniform markings for all microsatellites tested, including the (GATA)_n sequence which was also dispersed by the karyotype of three species, except for a very conspicuous cluster in the telomeres of a metacentric chromosome pair of *P. microstoma*. In spite of the results have evidenced a general conservation in the genomic content and distribution of several microsatellites, the occurrence of a species-specific clusters demonstrates that SSRs also contribute for the genome diversification among Pimelodidae species.

Key-words: FISH, (GATA)_n, microsatellites, Pimelodidae

6.3.1. Introdução

Grande parte do genoma eucarioto é composta por DNAs repetitivos (Martins, 2007), que podem ter distribuição dispersa, como os elementos transponíveis (*transposable elements* – TEs), que se dividem em transposons e retrotransposons, ou podem estar repetidos *in tandem*, como os DNAs satélites (satDNAs), minissatélites e microsatélites, e as famílias multigênicas (Charlesworth *et al.*, 1994; Sumner, 2003).

Os microsatélites ou sequências simples repetidas (*Simple Sequence Repeats* - SSRs) são sequências de DNA repetidas *in tandem*, de 5 a 100 vezes por loco, e compostas por 1 – 6 pb (Epplen & Epplen-Haupt, 2002; Martins, 2007). Envolvidos com a estrutura cromossômica e até mesmo com o controle da expressão gênica (Pucci *et al.*, 2016), os SSRs estão frequentemente associados com regiões de heterocromatina, como telômeros e centrômeros, e cromossomos B e sexuais (Martins, 2007; Scacchetti *et al.*, 2015; Utsunomia *et al.*, 2018). Dentre as sequências repetitivas, os SSRs são os mais polimórficos (Tóth *et al.*, 2000), o que os caracteriza como importantes marcadores cromossômicos, sendo amplamente utilizados em estudos sobre a evolução do genoma de diversos organismos (Schneider *et al.*, 2015), incluindo peixes (Terencio *et al.*, 2015; Yano *et al.*, 2014; Scacchetti *et al.*, 2015; Pucci *et al.*, 2016; Gouveia *et al.*, 2017; de Moraes *et al.*, 2017; Hatanaka *et al.*, 2018; Utsunomia *et al.*, 2018).

O satDNA Bkm (*Banded Krait Minor*), isolado do cromossomo W de fêmeas de *Elaphe radiata* e altamente conservado em eucariotos, é composto em sua maioria pelo microsatélite (GATA)_n (Epplen *et al.*, 1982; Traldi *et al.*, 2013), a qual está relacionada com a evolução e diferenciação de cromossomos sexuais em diversos vertebrados (Singh *et al.*, 1984; Subramanian *et al.*, 2003), atuando, por exemplo, na descondensação da cromatina para a expressão gênica (Viger *et al.*, 1998; Priyadarshini *et al.*, 2003).

Entre os peixes neotropicais, Pimelodidae é uma das famílias mais diversas, com 114 espécies válidas, distribuídas em 32 gêneros (Nelson, 2016; Fricke *et al.*, 2019). Enquanto *Bergiaria* é representado por apenas duas espécies, dentre elas, *Bergiaria westermanni* (Ferraris

Jr., 2007), *Pimelodus* é o gênero mais especioso de Pimelodidae, contando com 36 representantes (Fricke *et al.*, 2019), dentre eles *Pimelodus microstoma* (Ribeiro & Lucena, 2007), e *Pimelodus pohli* (Ribeiro & Lucena, 2006). Porém, apesar do grande número de espécies, a família ainda carece de informações citogenéticas, principalmente do ponto de vista da distribuição cromossômica de sequências repetitivas (para uma revisão ver Girardi *et al.*, 2018).

Nesse contexto, este trabalho analisou a distribuição cromossômica de treze repetições microssatélites em três espécies de Pimelodidae, com o objetivo de contribuir para a melhor caracterização e compreensão do conteúdo genômico da família.

6.3.2. Material e Métodos

Analizamos exemplares de *B. westermanni* (13 fêmeas e 2 machos) e *P. pohli* (28 fêmeas e 20 machos), ambos da bacia do rio São Francisco, e *P. microstoma* (40 fêmeas e 27 machos), da bacia do alto rio Paraná (Tab.1). As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICM-Bio - licença N°10538-1). Os experimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (número do processo CEUA 1926260315) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Brasil. Os exemplares das espécies foram depositados no Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), estado do Paraná, Brasil, e na Coleção Ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), estado do Paraná, Brasil (Tab. 1). As preparações cromossômicas foram realizadas de acordo com Bertollo *et al.* (2015).

A sequência (GATA)_n foi amplificada por PCR (*Polymerase chain reaction*), utilizando os primers descritos por Ijdo *et al.* (1991), e marcada por *nick translation* com Dig Nick-Translation Mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), de acordo com as especificações do fabricante. O mix de reação de PCR, para um volume final de 25µl, foi composto de 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 µM de cada primer, 160 µM de dNTPs, 2U de Platinum® Taq DNA polimerase

(Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA), Tampão 10x (sem cloreto) e água destilada. As condições do ciclo de PCR foram: 94°C/5 min, 9 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/30 seg, 72°C/1 min, 29 ciclos de 94°C/1 min, 60°C/30 seg, 72°C/90 seg, com etapa final de 72°C/5min. Os demais microssatélites (C)₃₀, (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAG)₁₀, (CGG)₁₀, (CAT)₁₀, (GAA)₁₀, (GAC)₁₀, (GAG)₁₀, (TAC)₁₀ foram obtidos comercialmente, já marcados diretamente com Cy5 na extremidade 5' durante a síntese (Sigma, St. Louis, MO, USA).

A hibridização da sequência (GATA)_n seguiu o protocolo de Pinkel *et al.* (1986), e foi realizada sob condições de alta estrinência [77%; mix de hibridização - 200ng de cada sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato dextrano e 2xSSC (pH 7,0), 16h à 37°C], com detecção por anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Os demais microssatélites foram mapeados cromossomicamente de acordo com o protocolo de Kubat *et al.* (2008), com mix de hibridização composto por 2µL de sonda (100ng/µL), 12,5µL de formamida, 5µL de sulfato de dextrano 50% e 2,5µL de 20xSSC, por lâmina. Após as hibridizações, os cromossomos foram corados com antifading + DAPI (Vector, Burlingame, CA, EUA).

As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51). As imagens foram capturadas com o *software* DP2-BSW, com câmera (Olympus DP-72) acoplada ao microscópio, e posteriormente analisadas usando o *software* Adobe® Photoshop CS5 Extended.

6.3.3. Resultados

Os indivíduos das três espécies exibiram número diploide (2n) igual a 56 cromossomos, e em *B. westermanni* verificou-se uma variação intra- e interindividual de 0 a 4 cromossomos B. Nenhum sistema de cromossomos sexuais foi observado nas espécies analisadas. Os cromossomos B de *B. westermanni* exibiram marcações para todos os microssatélites, porém com algumas variações, com alguns apresentando sítios bem evidentes, como observado em (CA)₁₅, e outros com marcações mais fracas, como demonstrado com (CAT)₁₀ e (GAG)₁₀ (Figs. 1 e 2; Tab. 1).

Nas três espécies, os microssatélites (CAA)₁₀, (CAG)₁₀, (CGG)₁₀, (GAA)₁₀, (GAC)₁₀,

(GAG)₁₀ e (TAC)₁₀ apresentaram um padrão de distribuição semelhante, localizados preferencialmente nas regiões terminais/subterminais dos cromossomos (Figs. 1, 2, 3, 4, 5 e 6; Tab. 1). As repetições (CA)₁₅ e (GA)₁₅ foram as únicas que exibiram localização exclusivamente terminal nos cromossomos de *B. westermanni* (Fig. 1; Tab. 1), enquanto que em *P. microstoma* e *P. pohli* essa condição foi verificada apenas para as sequências (C)₃₀, (GA)₁₅ e (CAC)₁₀ (Figs. 3 e 5; Tab. 1). Em *B. westermanni*, as repetições (C)₃₀ e (CAC)₁₀ foram verificadas nas regiões terminais e intersticiais dos cromossomos (Fig. 1; Tab. 1). A distribuição de (CA)₁₅ em *P. pohli* seguiu o padrão observado em *B. westermanni*, mas em *P. microstoma*, foram evidenciadas marcações intersticiais também (Figs. 3 e 5; Tab. 1). Já o microssatélite (CAT)₁₀ apresentou distribuição variável entre as espécies. Em *P. pohli* foram observadas marcações apenas nas regiões terminais dos cromossomos, enquanto que em *B. westermanni* e *P. microstoma*, a ocorrência de sítios intersticiais também foi constatada (Figs. 2, 4 e 6; Tab. 1). Em *P. microstoma*, um bloco mais proeminente foi evidenciado na região terminal de um par cromossômico metacêntrico (Fig. 4; Tab. 1).

A sequência (GATA)_n mostrou-se dispersa em *P. microstoma* e *P. pohli*, com acúmulo preferencial nas regiões centroméricas e terminais (Fig. 7), e com a ocorrência de um cluster na região terminal de um par cromossômico submetacêntrico em *P. microstoma* (Fig. 7). A distribuição dessa repetição em *B. westermanni* (Malimpensa *et al.*, 2018), e segue o mesmo padrão disperso, e com sítios nos cromossomos B.

6.3.4. Discussão

A variação no número de unidades de repetição dos DNAs repetitivos no genoma dos organismos (Schneider *et al.*, 2015), faz dessas sequências excelentes ferramentas citogenéticas, auxiliando na compreensão de diversos aspectos estruturais e evolutivos dos cromossomos (Traldi *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2017).

Diversos estudos utilizam o mapeamento de SSRs objetivando compreender a evolução de

sistemas de cromossomos sexuais (Poltronieri *et al.*, 2014; Yano *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017; de Freitas *et al.*, 2018; Hatanaka *et al.*, 2018), dado que a acumulação de DNAs repetitivos é um dos processos-chave que ocorrem durante a diferenciação desses cromossomos (Pucci *et al.*, 2016). Nenhuma das três espécies estudadas possui sistemas de cromossomos sexuais diferenciados. Também não foram identificados possíveis proto-cromossomos sexuais, uma vez que a distribuição dos microssatélites foi uniforme pelos cariótipos e semelhante entre machos e fêmeas, sem acúmulo preferencial em um cromossomo/sexo específico.

Todos os SSRs avaliados mostraram-se presentes nos cromossomos B de *B. westermanni*, porém, variações na intensidade dos sinais puderam ser verificadas entre os microssatélites. A presença de SSRs em cromossomos B foi observada em *Astyanax mexicanus* para as sequências (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (GATA)_n (Piscor & Parise-Maltempi, 2016), e no gafanhoto *Abacris flavolineata* para as sequências (GA)₁₅ e (GAC)₁₀ (Milani & Cabral-de-Mello, 2014). O acúmulo de SSRs, assim como de outros DNAs repetitivos, nos cromossomos B é facilitado pela baixa taxa de recombinação existente nos mesmos (Charlesworth *et al.*, 2005), e pode ter uma função essencial na evolução desses cromossomos (Milani & Cabral-de-Mello, 2014).

Os DNAs repetitivos não estão sujeitos à pressão de seleção que afeta as sequências não repetitivas do genoma, sendo suposto que a maioria dos microssatélites apresenta uma evolução neutra, sem efeito no fenótipo dos indivíduos (Schlötterer, 2000). Adicionalmente, o fato das sequências altamente repetitivas, como os SSRs, tenderem a se acumular em regiões de baixa recombinação, como as de heterocromatina (Schneider *et al.*, 2015), reforçou, por muito tempo, a ideia de que os SSRs não apresentavam função alguma no genoma das espécies. Entretanto, efeitos funcionais dos microssatélites em regiões eucromáticas podem ser visualizados em algumas espécies (Schneider *et al.*, 2015; Pucci *et al.*, 2016; Utsunomia *et al.*, 2018).

As espécies analisadas neste trabalho exibiram padrões de distribuição similares entre seus cariótipos para quase todos os microssatélites testados, com sítios localizados predominantemente nas regiões heterocromáticas dos cromossomos, como telômeros e regiões pericentroméricas,

excepcionalmente intersticiais como em *B. westermanni*, evidenciando uma conservação do conteúdo genômico de DNAs repetitivos, sugerindo que a heterocromatina possa estar exercendo uma função importante na organização genômica dos SSRs nesses peixes. O acúmulo preferencial de SSRs nessas regiões cromossômicas pode ser encontrado em outras espécies de peixes, como *Hoplias malabaricus* (Cioffi *et al.*, 2010), *Erythrinus erythrinus* (Yano *et al.*, 2014), e *Gymnarchus niloticus* (Hatanaka *et al.*, 2018).

A predominância de sítios SSRs nas regiões cromossômicas terminais/subterminais parece ser uma tendência no genoma de alguns grupos de peixes, especialmente para as repetições (CA)₁₅ e (GA)₁₅, dada a organização em cluster desses SSRs em diversas espécies (Poltronieri *et al.*, 2014; Scacchetti *et al.*, 2015; Pucci *et al.*, 2016; Gouveia *et al.*, 2017; Utsunomia *et al.*, 2018). Nossos resultados com estes microssatélites também evidenciam a presença de sítios proeminentes exclusivamente nos telômeros, evidenciando uma conservação genômica na distribuição dessas repetições, exceto em *P. microstoma*, que também mostrou sítios intersticiais de (CA)₁₅.

A localização preferencial dos microssatélites em regiões específicas dos cromossomos corrobora a ideia, postulada em outros trabalhos, de que a organização dos SSRs no genoma não é aleatória, com cada organismo/espécie exibindo um acúmulo preferencial de repetições específicas com distribuições bem particulares nos cromossomos (Tóth *et al.*, 2000; Scacchetti *et al.*, 2015; Ruiz-Ruano *et al.*, 2015; Utsunomia *et al.*, 2018). Pucci *et al.* (2016) propõem que tais regiões podem ser consideradas “hotspots” para o acúmulo de SSRs e podem estar associadas com a formação estrutural das mesmas, além de participar de rearranjos cromossômicos.

Sinais mais conspícuos de alguns SSRs foram observados em cromossomos específicos em algumas das espécies estudadas, evidenciando um grau de compartimentalização maior para essas sequências. Em *P. microstoma*, por exemplo, blocos proeminentes de (CAA)₁₀ e (CAT)₁₀ foram constatados na região terminal de um par cromossômico metacêntrico, bem como para (CAG)₁₀ nos telômeros de um par subteloicêntrico. Já a repetição (TAC)₁₀ exibiu sinais terminais mais evidentes em um par metacêntrico de *P. pohli* e em seis pares cromossômicos de *P. microstoma*.

A organização em cluster dessas sequências na região terminal de alguns cromossomos do cariótipo segue o padrão observado para (CAG)₁₀ e (CAT)₁₀ em espécies de *Leporinus* (Poltronieri *et al.*, 2014), e o da repetição (CGG)₁₀ em vários cromossomos de *Pyrrhulina australis* (de Moraes *et al.*, 2017).

A condição dispersa dos microssatélites também pode ser verificada em outras espécies de peixes, como *Astyanax* (Piscor & Parise-Maltempa, 2016), *Pyrrhulina* (de Moraes *et al.*, 2017) e *Hepsetus* (Carvalho *et al.*, 2017). Esse padrão pode ser resultante da ocorrência de rearranjos cromossômicos ou da associação das SSRs com TEs (Pucci *et al.*, 2016). De fato, eventos como a associação com TEs e o crossing-over desigual, podem contribuir para a alta dinamicidade dos microssatélites, controlando a expansão, acumulação e mesmo a eliminação dessas sequências no genoma dos organismos, exercendo, assim, um papel fundamental na organização das mesmas (Scacchetti *et al.*, 2015; Pucci *et al.*, 2016; Utsunomia *et al.*, 2018).

O microssatélite (GATA)_n (Epplen *et al.*, 1982), está relacionado com a regulação gênica (Trainor *et al.*, 1996), com a diferenciação de cromossomos sexuais e com a determinação sexual em diversos vertebrados (Singh *et al.*, 1984; Nanda *et al.*, 1990; Subramanian *et al.*, 2003), dada a sua presença nos sexuais de diversas espécies de vertebrados (Epplen *et al.*, 1982; Singh *et al.*, 1984; Jones & Singh, 1985). Em algumas espécies, a maior concentração da sequência (GATA)_n nos cromossomos sexuais está associada com a descondensação da cromatina para a expressão gênica em estágios específicos do desenvolvimento (Singh *et al.*, 1994; Viger *et al.*, 1998; Priyadarshini *et al.*, 2003). Entretanto, apesar da associação dessa sequência com os cromossomos sexuais, também têm sido relatada a ocorrência da mesma nos autossomos em muitas espécies (Singh *et al.*, 1984), como é o caso do inseto *Ephestia kuehniella*, que mesmo apresentando um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW bem definido, não possui sítios da sequência (GATA)_n nesses cromossomos, mas apenas nos autossomos. Apesar de não ter sido evidenciado nenhum sistema de cromossomos sexuais diferenciados nos cariótipos das espécies aqui analisadas, demonstrou-se a distribuição dispersa da sequência (GATA)_n nos autossomos das mesmas, assim

como observado em *Solea senegalensis* (Cross *et al.*, 2006), em espécies de Batrachoididae (Merlo *et al.*, 2007; Úbeda-Manzanaro *et al.*, 2010), de *Hypostomus* (Traldi *et al.*, 2013), e de Parodontidae (Ziemniczak *et al.*, 2015). É considerado que diversos eventos, tais como rearranjos cromossômicos, conversão gênica, amplificação da heterocromatina e transposição de TEs, poderiam estar associados a esse padrão disperso de distribuição da sequência (GATA) (Traldi *et al.*, 2013).

Entretanto, um cluster bem conspícuo nos telômeros de um par cromossômico submetacêntrico de *P. microstoma*, sugere a ocorrência de uma amplificação dessa sequência no genoma dessa espécie, contribuindo assim na diferenciação do seu conteúdo genômico em relação às demais espécies de Pimelodidae. Adicionalmente, a presença dessa sequência nos cromossomos B de *B. westermanni* (Malimpensa *et al.*, 2018), merece destaque.

Assim sendo, o mapeamento físico de treze repetições microssatélites nos cromossomos de espécies de Pimelodidae, contribuiu com a caracterização molecular de DNAs repetitivos nesse grupo. Ao lado de um conservadorismo genômico exibido pela distribuição cromossômica semelhante foram também evidenciadas importantes diferenciações relacionadas a esta classe de DNA como marcadores evolutivos. Neste sentido, a presença de sítios nos cromossomos B de *B. westermanni*, assim como de um cluster específico em *P. microstoma*, suscita importantes indagações a serem investigadas sobre seu possível papel no processo evolutivo dessas espécies.

6.3.5. Referências

BARROS, A.V.; WOLSKI, M.A.V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? **Gene**, v. 608, p. 20-27, 2017.

BERTOLLO, L.A.C.; CIOFFI, M.B.; MOREIRA-FILHO, O. Direct chromosome preparation from Freshwater Teleost Fishes. In: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (Eds). **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. United States: CRC Press, 2015, p. 21-26.

CARVALHO, P.C.; de OLIVEIRA, E.A.; BERTOLLO, L.A.C.; YANO, C.F.; OLIVEIRA, C.; DECRU, E.; *et al.* First chromosomal analysis in Hepsetidae (Actinopterygii, Characiformes): insights into relationship between African and Neotropical fish groups. **Front Genet**, v. 8, p. 203, 2017.

CHARLESWORTH, B.; SNLEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, p. 118–128, 2005.

CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X₁X₂Y sex chromosome system in this group. **Heredity**, v. 105, p. 554-561, 2010.

CROSS I.; MERLO A.; MANCHADO M.; INFANTE C.; CAÑAVATE J.P.; REBORDINOS L. Cytogenetic characterization of the *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleurenctiformes. Soleidae): Ag-NOR, (GATA)_n, (TTAGGG)_n and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. **Genetica**, v. 128, p. 253–259, 2006.

de FREITAS, N.L.; AL-RIKABI, A.B.; BERTOLLO, L.A.C.; EZAZ, T.; YANO, C. F.; *et al.* Early stages of XY sex chromosomes differentiation in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) revealed by DNA repeats accumulation. **Current Genomics**, v. 19, n. 3, p. 216-226, 2018.

de MORAES, R.L.R.; BERTOLLO, L.A.C.; MARINHO, M.M.F.; YANO, C.F.; HATANAKA, T.; *et al.* Evolutionary relationships and cytotaxonomy considerations in the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 6, p. 536-546, 2017.

EPPLEN, J.T.; McCARREY, J. R.; SUTOU, S.; OHNO, S. Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proc Natl Acad Sci**, v. 79, p. 3798-3802, 1982.

EPPLEN, J.F.; EPPLEN-HAUPT, A. Aspects of tandemly organized, repetitive sequences in chromosomal DNA. In: SOBTI, R.C.; OBE, G.; ATHWAL, R.S. (Eds.) **Some aspects of chromosome structure and functions**. Índia: Narosab Publishing House, 2002. 238 p. 1-10.

FRICKE, R.; ESCHEMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes.** California Academy of Sciences, 2019. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/speciesbyfamily.asp#Pimelodidae>>. Acesso em 20 de jan. de 2019.

FERRARIS JR., C.J. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types.** Auckland, New Zealand: Magnolia Press, 2007. 628 p.

GIRARDI, S.C.; PAVANELLI, C.S.; MARGARIDO, V.P. Contributions to the systematic of Pimelodidae (Osteichthyes, Siluriformes): basic and molecular cytogenetics on seven species of *Pimelodus* from three Brazilian hydrographic systems. **Neotrop Ichthyol**, v. 16, n. 2, 2018.

GOUVEIA, J.G.; WOLF, I.R.; VILAS-BOAS, L.A.; HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T.; DIAS, A.L. Repetitive DNA in the catfish genome: rDNA, microsatellites, and Tc1-mariner transposon sequences in *Imparfinis* species (Siluriformes, Heptapteridae). **J Heredity**, v. 108, n. 6, p. 650-657, 2017.

HATANAKA, T.; DE OLIVEIRA, E.A.; RÁB, P.; YANO, C.F.; BERTOLLO, L.A.C.; *et al.* First chromosomal analysis in *Gymnarchus niloticus* (Gymnarchidae: Osteoglossiformes): insights into the karyotype evolution of this ancient fish order. **Biol J Linn Soc**, v. 125, n. 1, p. 83-92, 2018.

IJDO, J.W.; WELLS, R.A.; BALDINI, A.; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 17, p. 4780, 1991.

KUBAT, Z.K.Z.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v. 51, p. 350-356, 2008.

JONES, K.W.; SINGH, L. Snakes and the evolution of sex chromosomes. **Trends in Genet**, v. 1, p. 55-61, 1985.

MALIMPENSA, G.C.; TRALDI, J.B.; TOYAMA, D.; HENRIQUE-SILVA, F.; VICARI, M.R.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal Mapping of Repeat DNA in *Bergiaria westermanni* (Pimelodidae, Siluriformes): Localization of 45S rDNA in B Chromosomes. **Cytogenet Genome Res**, v. 154, n. 2, p. 99-106, 2018.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: **Fish Cytogenetics**. New York: Science Publisher, 2007. p. 421-453.

MERLO, M.A.; CROSS, I.; PALAZÓN, J.L.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and (TTAGGG)_n by one-color and double color FISH in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Teleostei: Batrachoididae). **Genetica**, v. 131, p. 195-200, 2007.

MILANI, D; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. **PloS One**, v. 9, n. 5, p. e97956, 2014.

NANDA, I.; FEICHTINGER, W.; SCHMID, M.; SCHRODER, J.H.; ZISCHLER, H.; EPPLEN, J.T. Simple repetitive sequences are associated with the differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. **J Mol Evol**, v. 30, p. 456–462, 1990.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 5 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. 707 p.

PISCOR, D; PARISE-MALTEMPI, P.P. Microsatellite organization in the B chromosome and A chromosome complement in *Astyanax* (Characiformes, Characidae) species. **Cytogenet Genome Res**, v. 148, n. 1, p. 44-51, 2016.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

POLTRONIERI, J.; MARQUIONI, V.; BERTOLLO, L.A.C.; KEJNOVSKY, E.; MOLINA, W.F.; LIEHR, T.; CIOFFI, M.B. Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. **Cytogenet Genome Res**, v. 142, n. 1, p. 40-45, 2014.

PRIYADARSHINI, P.; MURTHY, B.S.; NAGARAJU, J.; SINGH, L. GATA-binding protein expressed predominantly in the pupal ovary of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 33, p. 185–195, 2003.

PUCCI, M.B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; *et al*: Chromosomal spreading of microsatellites and (TTAGGG)_n sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi* genomes (Characiformes: Crenuchidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 149, n. 3, p. 182-190, 2016.

RIBEIRO, F.R.V.; LUCENA, C.A.S. A new species of *Pimelodus* La Cépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio São Francisco drainage, Brazil. **Neotrop Ichthyol**, v. 4, n. 4, p. 411-418, 2006.

RIBEIRO, F.R.V.; LUCENA, C.A.S. *Pimelodus microstoma* Steindachner, 1877, a valid species of pimelodid catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the upper rio Paraná drainage. **Neotrop Ichthyol**, v. 5, n. 1, p. 75-78, 2007.

RUIZ-RUANO, F.J.; CUADRADO, A.; MONTIEL, E.E.; CAMACHO, J.P.M.; LOPEZ-LEON, M.D. Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. **Chromosoma**, v. 124, p. 221–234, 2015.

SCACCHETTI, P.C.; UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.; *et al*: Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei, Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes. **Cytogenet Genome Res**, v. 146, n. 2, p. 136-143, 2015.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v. 109, n. 6, p. 365-371, 2000.

SCHNEIDER, C.H.; GROSS, M.C.; TERCENIO, M.L.; DE TAVARES, É.S.G.M.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genome (Pisces, Cichlidae). **Comp Cytogenet**, v. 9, n. 4, p. 595, 2015.

SILVA, D.M.Z.A.; DANIEL, S.N.; CAMACHO, J.P.M.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F.J.; *et al*: Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Mol Genet Genomics**, v. 291, p. 1407-1418, 2016.

SINGH, L.; PHILLIPS, C.; JONES, K.W. The conserved nucleotide sequences of Bkm, which define Sxr in the mouse, are transcribed. **Cell**, v. 36, p. 111-120, 1984.

SUBRAMANIAN, S.; MISHRA, R.K.; SINGH, L. Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. **Bioinformatics**, v. 19, p. 681–685, 2003.

SUMNER, A.T. **Chromosomes – organization and function**. Malden, Blackwell Publishing 2003. 275 p.

TERENCIO, M.L.; SCHNEIDER, C.H.; GROSS, M.C.; DO CARMO, E.J.; NOGAROTO, V.; *et al*. Repetitive sequences: the hidden diversity of heterochromatin in prochilodontid fish. **Comp Cytogenet**, v. 9, n. 4, p. 465, 2015.

TÓTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Res**, v. 10, p. 967–981, 2000.

TRAINOR, C.D.; OMICHINSKI, J.G.; VANDERGON, T.L.; GRONENBORN, A.M.; CLORE, G.M.; FELSENFELD, G. A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. **Mol Cell Biol**, v. 16, p. 2238–2247, 1996.

TRALDI, J.B.; BLANCO, D.R.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). **J Genet**, v. 92, n. 1, p. 127-130, 2013.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZÓN, J.L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**, v. 138, p. 787–794, 2010.

UTSUNOMIA, R.; MELO, S.; SCACCHETTI, P.C.; OLIVEIRA, C.; MACHADO, M.A.; *et al*. Particular Chromosomal Distribution of Microsatellites in Five Species of the Genus *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes). **Zebrafish**, p. 1-6, 2018.

VIGER, R.S.; MERTINEIT, C.; TRASLER, J.M.; NEMER, M. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the MIS promoter. **Development**, v. 125, n. 14, p. 2665–2675, 1998.

YANO, C.F.; POLTRONIERI, J.; BERTOLLO, L.A.C.; ARTONI, R.F.; LIEHR, T.; CIOFFI, M.B Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triporthus trifurcatus* (Characidae,

Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. **PloS ONE**, v. 9, n.3, p. 1-7, 2014.

ZIEMNICZAK, K.; TRALDI, J.B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. *In situ* Localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n Repeated DNAs and W Sex Chromosome Differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenet Genome Res**, v. 144, n. 4, 325-332, 2015.

6.3.6. Figuras e Tabelas

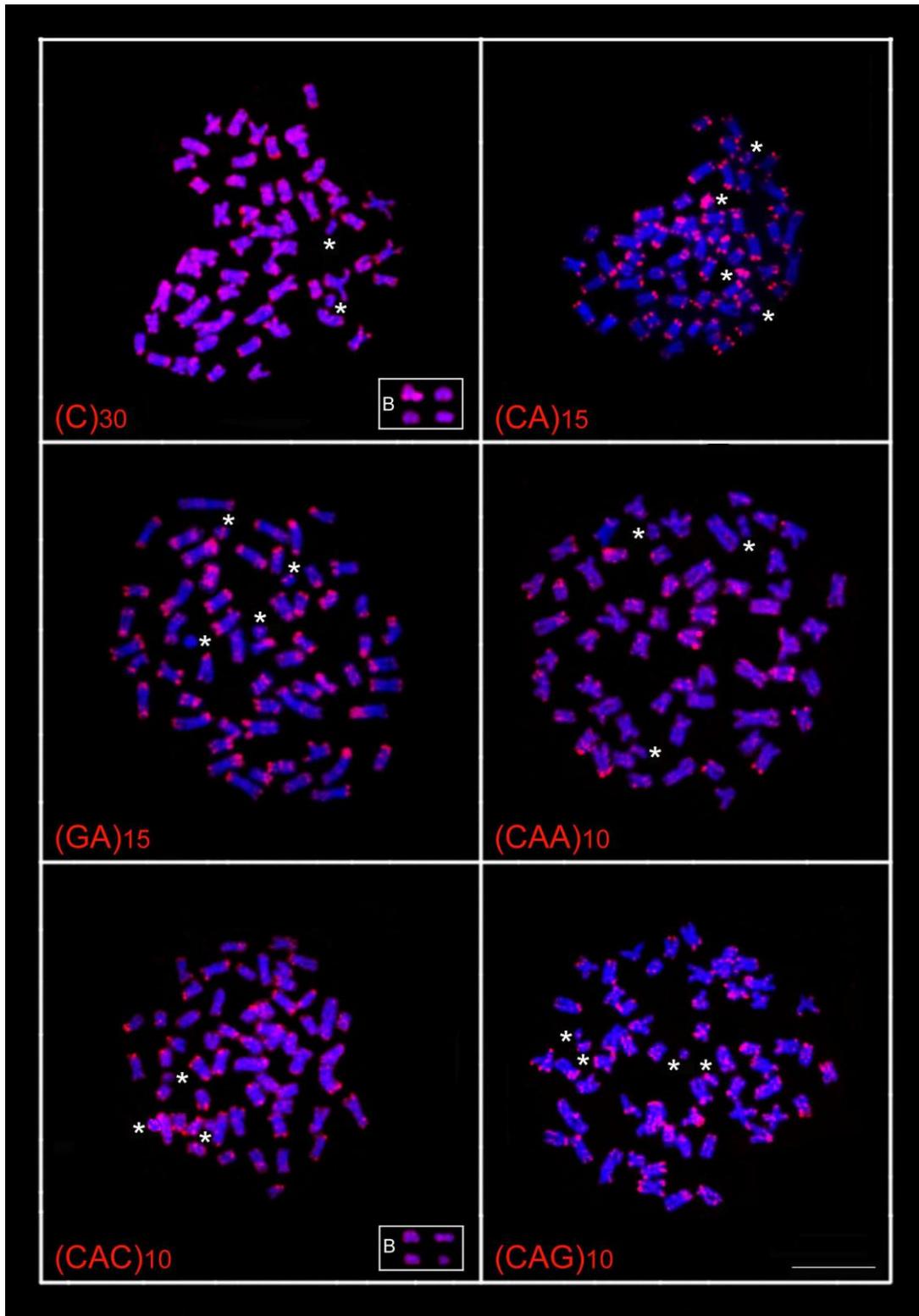


Figura 1. Metáfases de *B. westermanni* submetidas à FISH com os microssatélites (C)₃₀, (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀ e (CAG)₁₀. Os asteriscos indicam os cromossomos B. Os boxes mostram os sítios presentes nos cromossomos B. Barra = 5µm.

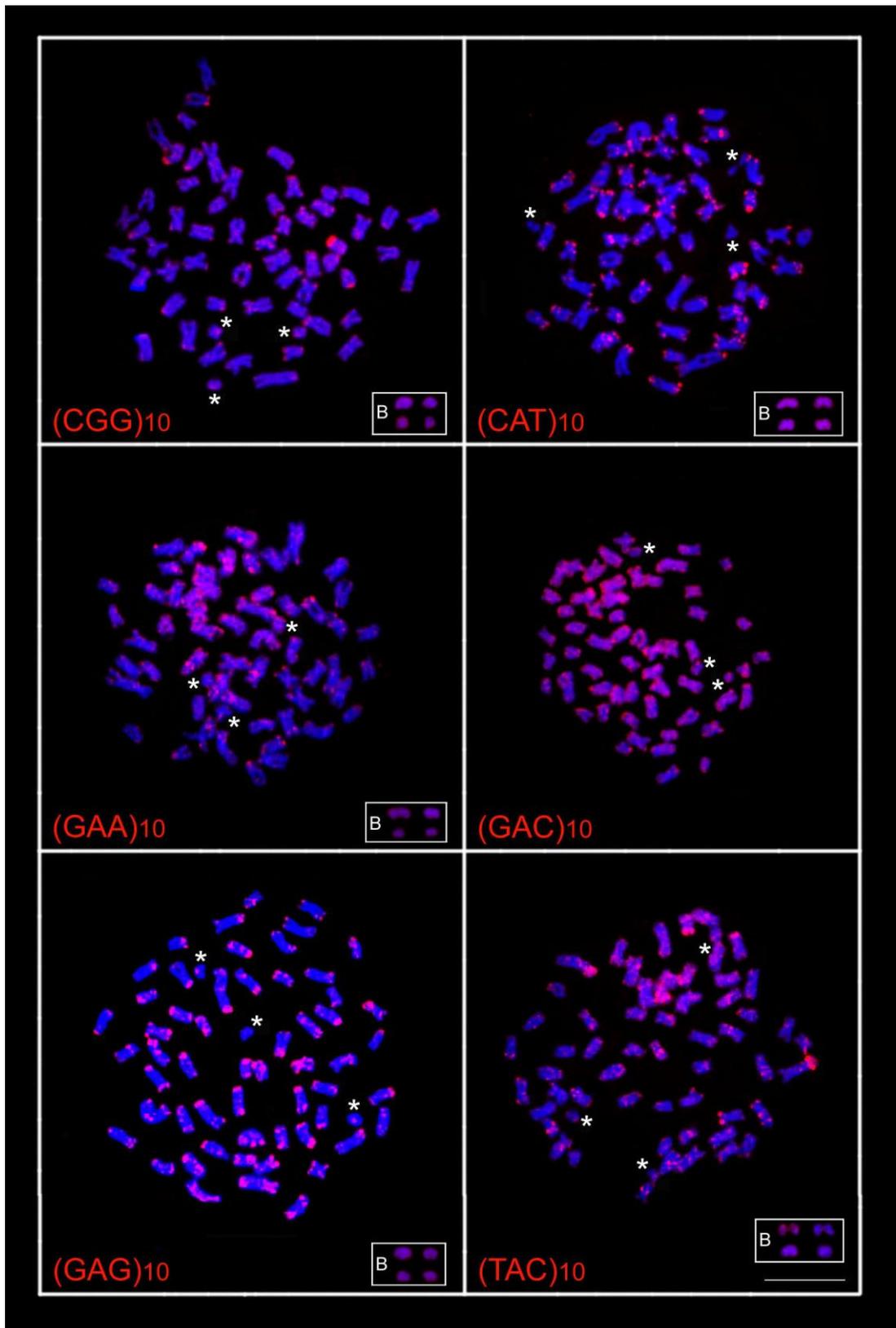


Figura 2. Metáfases de *B. westermanni* submetidas à FISH com os microsatélites (CGG)₁₀, (CAT)₁₀, (GAA)₁₀, (GAC)₁₀, (GAG)₁₀ e (TAC)₁₀. Os asteriscos indicam os cromossomos B. Os boxes mostram os sítios presentes nos cromossomos B. Barra = 5µm.

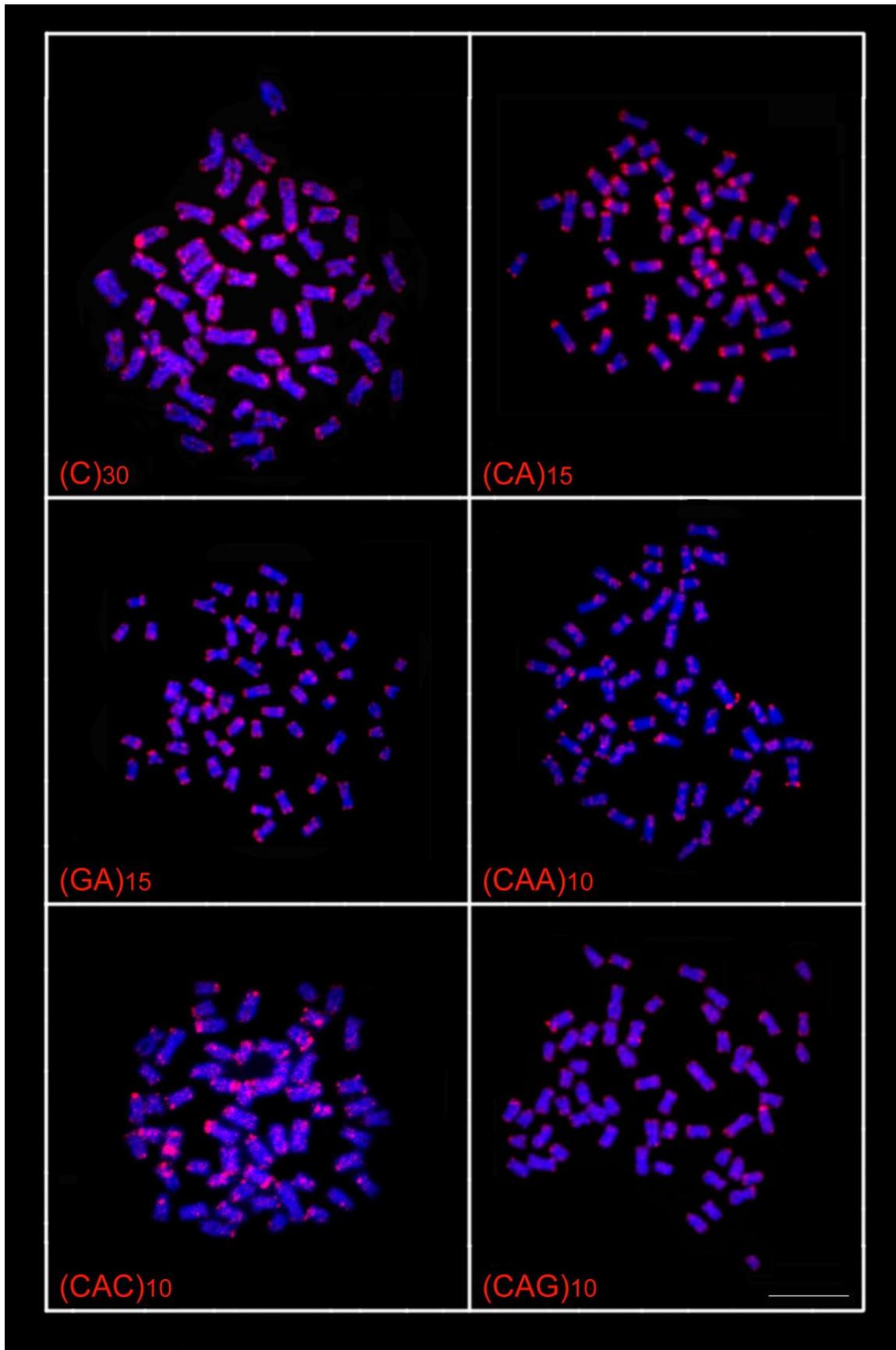


Figura 3. Metáfases de *P. microstoma* submetidas à FISH com os microssatélites (C)₃₀, (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀ e (CAG)₁₀. Barra = 5µm.

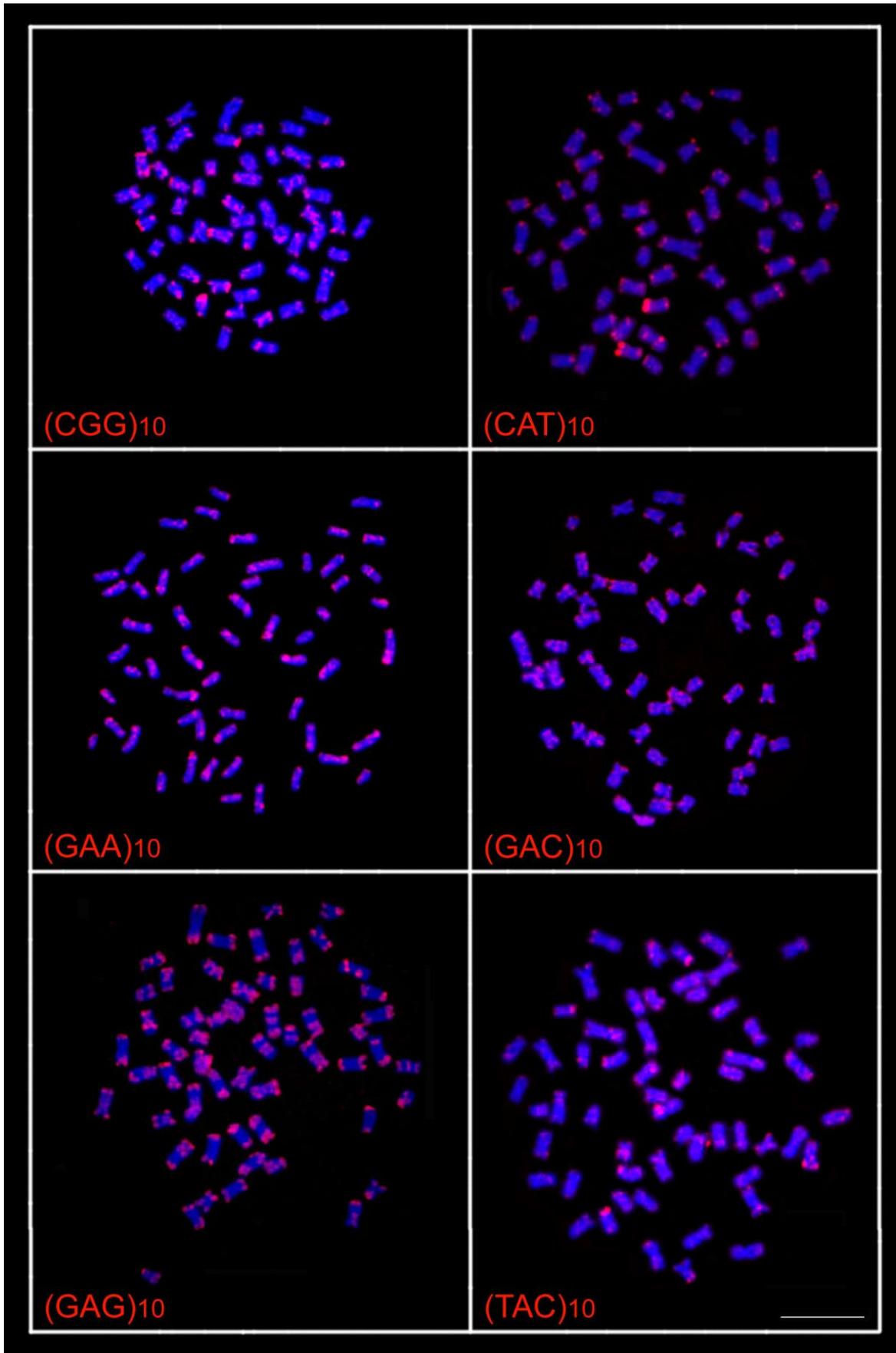


Figura 4. Metáfases de *P. microstoma* submetidas à FISH com os microsatélites (CGG)₁₀, (CAT)₁₀, (GAA)₁₀, (GAC)₁₀, (GAG)₁₀ e (TAC)₁₀. Barra = 5µm.

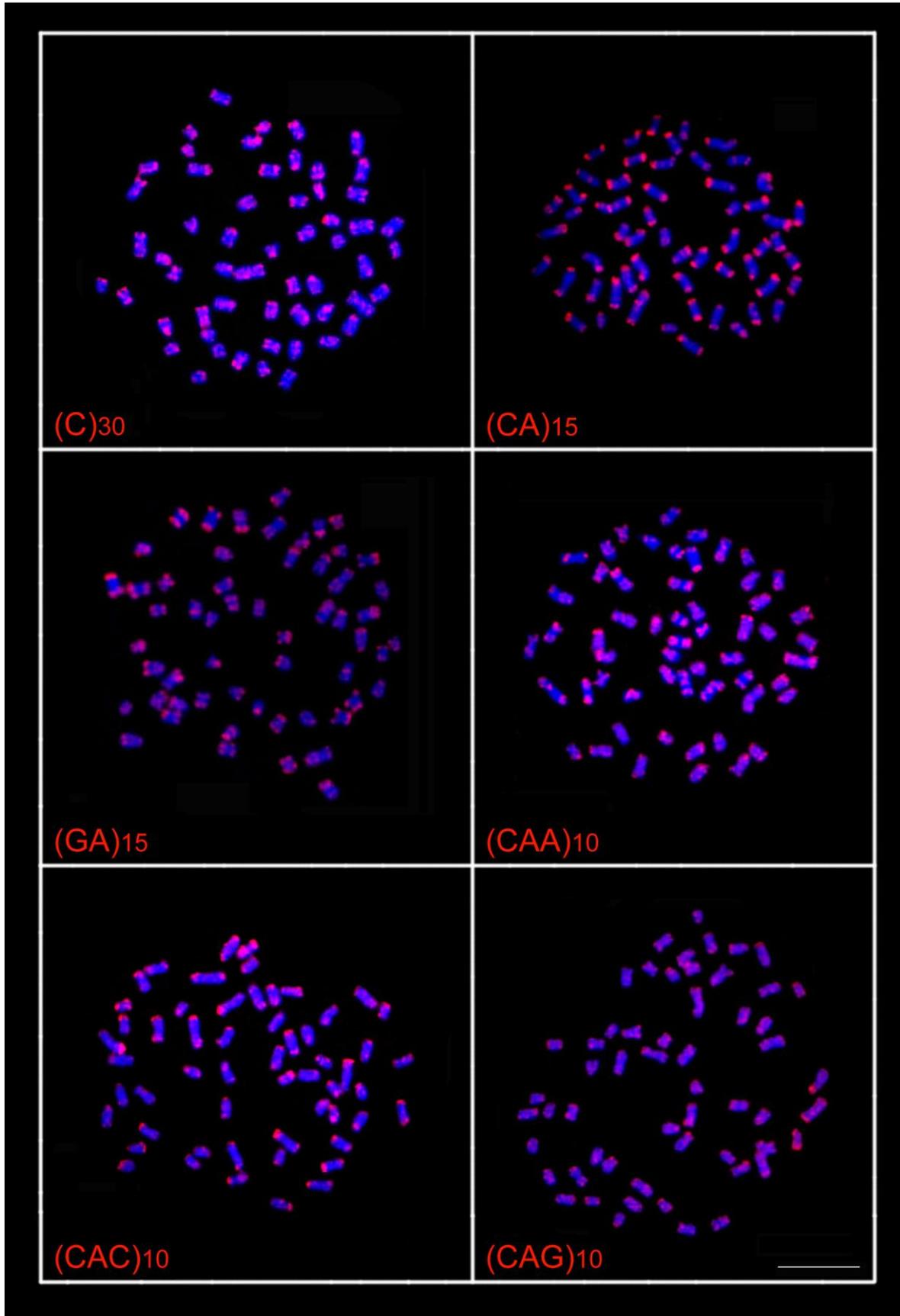


Figura 5. Metáfases de *P. pohli* submetidas à FISH com os microssatélites (C)₃₀, (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀ e (CAG)₁₀. Barra = 5µm.

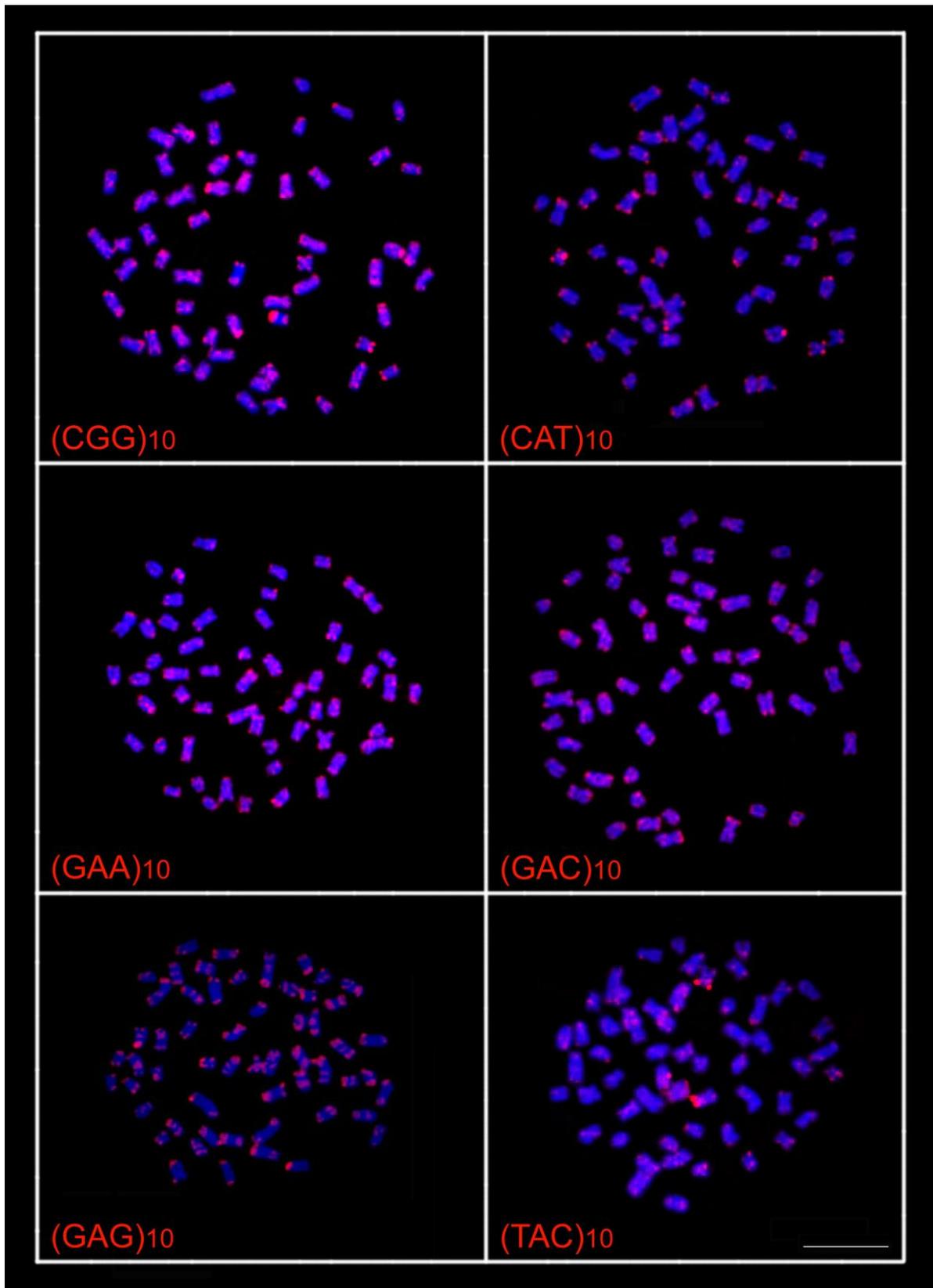


Figura 6. Metáfases de *P. pohli* submetidas à FISH com os microssatélites (CGG)₁₀, (CAT)₁₀, (GAA)₁₀, (GAC)₁₀, (GAG)₁₀ e (TAC)₁₀. Barra = 5µm.

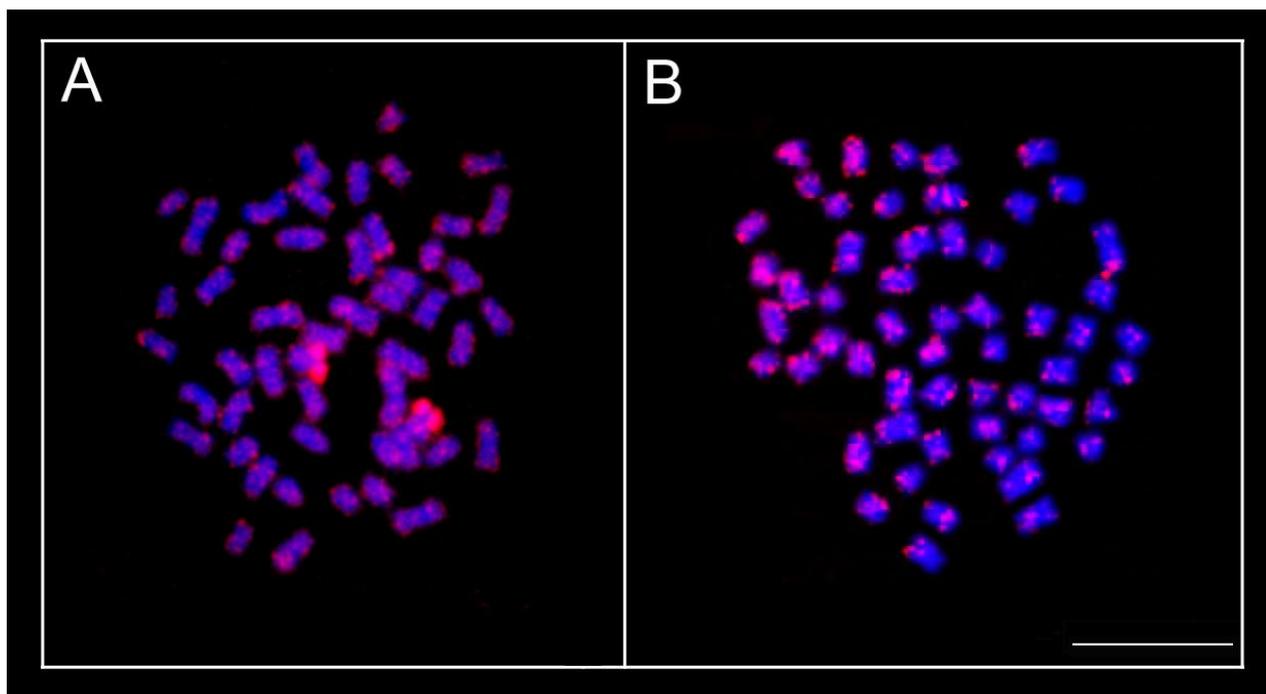


Figura 7. Metáfases de *P. microstoma* (A) e *P. pohli* (B) submetidas à FISH com sonda da sequência (GATA)_n. Barra = 5µm.

Tabela1. Padrão de distribuição dos sítios microssatélites nas espécies analisadas.

Microssatélite	Espécie		
	<i>B. westermanni</i>	<i>P. microstoma</i>	<i>P. pohli</i>
(C) ₃₀	ST + SST + SI + SB	ST + SI + SST	
(CAC) ₁₀			
(GA) ₁₅	ST + SI + SB	ST + SI	ST + SI
(CA) ₁₅			
(CGG) ₁₀	ST + SST + SI + SB	ST + SST + SI	
(GAA) ₁₀			
(GAC) ₁₀			
(GAG) ₁₀			
(CAA) ₁₀		ST + SST + SI	ST + SST + SI CT - 1 par m
(CAG) ₁₀			ST + SST + SI CT - 1 par st
(CAT) ₁₀	ST	ST + SST + SI CT - 1 par m	
(TAC) ₁₀	ST + SST + SI CT - 1 par m	ST + SST + SI CT - 6 pares	
(GATA) _n	SD + SB (*)	SD CT - 1 par m	SD

Legenda: ST = Sítios Terminais; SST = Sítios Subterminais; SI = Sítios Intersticiais; SD = sítios dispersos; CT = cluster terminal; SB = Sítios nos Cromossomos B.

(*) Dados de Malimpensa *et al.*, 2018.

**Investigações cromossômicas e moleculares e
integrativas como suporte à delimitação de espécies de
Pimelodidae (Siluriformes).**

Resumo

Pimelodidae é uma das mais diversas famílias de peixes neotropicais, composta por 114 espécies válidas. Contudo, a delimitação de espécies dessa família ainda é problemática, em virtude da ausência de um diagnóstico filogenético. Assim, este trabalho objetivou contribuir para esta abordagem, a partir de um estudo cromossômico/molecular integrativo em quatro espécies dessa família portadoras de fenótipos morfológicos similares, *Bergiaria westermanni*, *Pimelodus fur*, *Pimelodus microstoma* e *Pimelodus pohli*. Todas as espécies apresentaram $2n = 56$ cromossomos, exceto *P. fur*, com $2n = 54$. Por sua vez, *B. westermanni* evidenciou a presença de até 04 cromossomos B. A sequência telomérica $(TTAGGG)_n$ foi verificada nas porções terminais dos cromossomos de todas as espécies, incluindo os cromossomos B de *B. westermanni*, mas diferenciando *P. pohli* pela ocorrência de sítios intersticiais (ITS) em três pares cromossômicos, indicando prováveis rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a evolução cariotípica dessa espécie. Os dados obtidos com a hibridização genômica comparativa (CGH) mostraram que o compartilhamento do genoma das espécies de *Pimelodus* (*P. fur*, *P. microstoma* e *P. pohli*) ocorre em poucas regiões cromossômicas de *B. westermanni*. Por outro lado, ocorre o predomínio do genoma de *B. westermanni* nos cromossomos B desta espécie, sugerindo a origem intraespecífica desses elementos. Paralelamente, os resultados obtidos com três metodologias moleculares distintas (DNA *barcoding*, GMYC e bPTP), revelaram a ocorrência de quatro MOTUs (*Molecular Operation Taxonomic Units*), correspondentes à cada uma das espécies nominais. Assim sendo, os dados citogenético/moleculares obtidos sustentam a delimitação das quatro espécies investigadas, dando suporte ao status taxonômico corrente atribuído a cada uma delas.

Palavras-Chave: Análise GMYC, DNA *barcoding*, FISH, peixes, taxonomia

Abstract

Pimelodidae is one of the most speciose Neotropical fish families, composed by 114 valid species. However, the species delimitation in this family is still problematic, due to the absence of a phylogenetic diagnosis. Thus, this study aimed to contribute to this subject, using an integrative cytogenetic/molecular approach in four species of this family bearing similar morphological phenotypes, i.e., *Bergiaria westermanni*, *Pimelodus fur*, *Pimelodus microstoma* and *Pimelodus pohli*. All species exhibited $2n = 56$ chromosomes, except *P. fur*, with $2n = 54$. *B. westermanni* also evidenced zero to 04 supernumeraries or B chromosomes. The telomeric sequence $(TTAGGG)_n$ was verified in the terminal chromosome regions of all species, including the B chromosomes of *B. westermanni*, but differing *P. pohli* due to interstitial telomeric sites (ITS) in three chromosome pairs, indicating probable specific chromosomal rearrangements that had occurred during the karyotype evolution of this species. The comparative genomic hybridization (CGH) data evidenced the sharing of the genome content of the *Pimelodus* species (*P. fur*, *P. microstoma* and *P. pohli*) with only few chromosomal regions of *B. westermanni*. In turn, the predominance of the *B. westermanni* genome content in the B chromosomes of this species suggests the intraspecific origin of such elements. In addition, the results obtained with three different molecular methodologies (DNA *barcoding*, GMYC and bPTP), revealed the occurrence of four MOTUs (Molecular Operation Taxonomic Units), that correspond to each one of the nominal species. Therefore, the cytogenetic/molecular data sustain the delimitation of the four species investigated giving support to their current taxonomic status.

Key-words: DNA *barcoding*, fishes, GMYC analysis, taxonomy

6.4.1. Introdução

Pimelodidae é uma diversa família de peixes neotropicais, representada por 114 espécies válidas (Nelson, 2016; Fricke *et al.*, 2019). O gênero *Bergiaria* conta somente com duas espécies descritas, dentre elas *Bergiaria westermanni*, endêmica da bacia do rio São Francisco. Em contrapartida, *Pimelodus*, é o gênero o mais especioso do grupo, possuindo 36 representantes (Fricke *et al.*, 2019), dentre eles *Pimelodus fur*, *Pimelodus microstoma* e *Pimelodus pohli* (Lundberg & Littmann, 2003).

A delimitação de espécies em Pimelodidae é feita, predominantemente, baseada em características morfológicas, em virtude da ausência de um diagnóstico baseado em relações filogenéticas (Garavello & Shibatta, 2007). Para *Pimelodus*, especificamente, não existe hipótese de monofiletismo (Lundberg & Littmann, 2003; Ribeiro *et al.*, 2011), de tal forma que caracteres morfológicos são utilizados no diagnóstico e delimitação das espécies (Ribeiro *et al.*, 2008). Sob esta perspectiva, a identificação taxonômica da família ainda é muito imprecisa e problemática, de modo que muitas espécies são posteriormente realocadas após a realização de estudos filogenéticos e moleculares (Garavello & Shibatta, 2007; Girardi *et al.*, 2018). Apesar da indiscutível relevância dos dados morfológicos para a taxonomia, a utilização de outras ferramentas, como a citogenética e o DNA *barcoding*/estudos filogenéticos, pode auxiliar na identificação de espécies, permitindo a melhor compreensão de incertezas taxonômicas e dando maior suporte para os dados morfológicos.

Uma das ferramentas citogenéticas que pode ser utilizada na delimitação e diferenciação de espécies é a hibridização genômica comparativa (*Comparative Genomic Hybridization* – CGH), que pode auxiliar em estudos citotaxonômicos (de Moraes *et al.*, 2017), e em diversas outras abordagens, como na comparação de genomas de espécies próximas (Carvalho *et al.*, 2017; Hatanaka *et al.*, 2018), na compreensão da origem e diferenciação de cromossomos sexuais e cromossomos B (Fantinatti *et al.*, 2011; de Freitas *et al.*, 2017), e na caracterização do conteúdo genômico dos cromossomos (Yano *et al.*, 2017). Similarmente, dados moleculares têm

contribuído extensivamente para aumentar o conhecimento sobre a ictiofauna Neotropical (Pereira *et al.*, 2011; 2013; Nascimento *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2016). O DNA *barcoding* é uma metodologia alternativa ao diagnóstico morfológico convencional, que tem sido empregado com sucesso na identificação e delimitação de espécies, por utilizar o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) (Hebert *et al.*, 2003).

Neste contexto, este trabalho utilizou técnicas de citogenética molecular e da biologia molecular, com o objetivo de contribuir com a caracterização de espécies de Pimelodidae com morfologias similares e, conseqüentemente, com a delimitação taxonômica e relações filogenéticas das mesmas.

6.4.2. Materiais e Métodos

Foram analisados, por meio de metodologias citogenéticas e moleculares, exemplares de quatro espécies de Pimelodidae (Tab. 1): *B. westermanni* (13 fêmeas e 2 machos), *P. fur* (1 macho), *P. pohli* (28 fêmeas e 20 machos), as três coletadas na bacia do Rio São Francisco, e *P. microstoma* (40 fêmeas e 27 machos), proveniente da bacia do Alto Rio Paraná. As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICM-Bio - licença N°10538-1). Os experimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (número do processo CEUA 1926260315) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Brasil. Os exemplares das espécies foram depositados no Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), estado do Paraná, Brasil, e na Coleção Ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), estado do Paraná, Brasil (Tab. 1).

Metodologias Citogenéticas

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de porções do rim anterior dos animais, de acordo com Bertollo *et al.* (2015). Por meio da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

(Pinkel *et al.*, 1986), mapeou-se a sequência telomérica (TTAGGG)_n, amplificada por PCR (*Polymerase chain reaction*) usando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo *et al.*, 1991). A reação de PCR, para um volume final de 25µl, foi composta de 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 µM de cada primer, 160 µM de dNTPs, 2U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA), Tampão 10x e água destilada. As condições do ciclo foram: 94°C/5 min, 9 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/30 seg, 72°C/1 min, 29 ciclos de 94°C/1 min, 60°C/30 seg, 72°C/90 seg, com etapa final de 72°C/5min. O produto amplificado foi marcado com Dig-Nick-Translation Mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) pela técnica de *nick translation*, segundo as recomendações do fabricante. A FISH foi realizada sob condições de alta estringência [77%; mix de hibridização – 200 ng de sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato dextrano e 2xSSC (pH 7,0), 16h à 37°C]. Os sinais foram detectados com anti-digoxigenina-rodamina (Roche), de acordo com as recomendações do fabricante, e os cromossomos foram corados com solução de antifading + DAPI (Vector, Burlingame, CA, EUA).

Utilizando a técnica de CGH, o DNA genômico (gDNA) de *B. westermanni* foi comparado com o gDNA das outras três espécies. Os gDNAs de todas as espécies foram extraídos de porções do fígado de acordo com Sambrook *et al.* (2001). As sondas foram produzidas utilizando-se 500 ng de gDNA de cada espécie em questão, e posteriormente marcadas com Biotin-Nick-Translation Mix (Roche), para o gDNA de *B. westermanni*, ou com Dig-Nick-Translation Mix (Roche), para os gDNAs das outras três espécies, de acordo com as recomendações do fabricante. Utilizou-se o DNA C₀t-1, que corresponde a fração do gDNA enriquecido para sequências moderada- e altamente repetitivas, como bloqueador de sequências repetitivas comuns aos genomas das espécies, segundo o protocolo de Zwick *et al.* (1997). O mix final para cada experimento foi composto de 500 ng da sonda de cada espécie mais 13 µg de DNA C₀t-1 das respectivas espécies. Esse mix foi precipitado em etanol 100%, e os *pellets* foram secos e ressuspendidos em tampão de hibridização (20 µL por lâmina) contendo formamida 50% + 2xSCC + SDS 10% + sulfato dextrano 10% + tampão Denhardt's pH7.0.

A FISH para o CGH dos experimentos seguiu o protocolo de Symonová *et al.* (2015), com algumas modificações. Inicialmente as lâminas contendo cromossomos de *B. westermanni* foram tratadas com RNase (37°C – 90 min) e pepsina (37°C – 3 min), seguida de desnaturação em formamida 75% 2xSSC, pH 7.0 (74°C – 3 min) e série alcóolica (70%, 85% e 100% - 2 min cada). O mix de hibridização foi desnaturado (86°C – 6 min, gelo – 10 min) e aplicado nas lâminas, que ficaram incubadas por 3 dias a 37°C. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em formamida 50% 2xSSC pH 7.0 (44°C – 10 min) e três vezes no 1xSSC (44°C – 7 min), seguido de incubação em leite em pó 3%. Os sinais foram detectados com avidina-FITC (Sigma) e anti-digoxigenina-rodamina (Roche), com coloração final com solução de antifading + DAPI.

Os resultados obtidos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX51, com filtros apropriados. As imagens selecionadas foram capturadas através do *software* DP2-BSW, com câmera acoplada ao microscópio, e posteriormente analisadas e processadas usando o *software* Adobe® Photoshop CS5 Extended.

Metodologias Moleculares

Utilizando o gDNA das espécies estudadas, sequências parciais do gene COI foram amplificadas por PCR para 5 indivíduos de *B. westermanni*, 5 de *P. microstoma* e 5 de *P. pohli*, e para o único espécime de *P. fur*, conforme protocolo descrito por Bellafronte *et al.* (2013), utilizando-se os primers FISH F1 e FISH R1 (Ward *et al.*, 2005). A reação de PCR, para um volume final de 25 µL, foi composta de 2,5 µL de tampão 10x (sem cloreto), 0,7 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de cada primer (10mM), 4,0 µL de dNTPs mix (1,25mM), 0,2 µL de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), 1,0 µL de DNA genômico (50ng/ µl) e 15,6 µL de água destilada ultrapura. As condições do ciclo de PCR foram: 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C/ 30 seg, 54°C/30 seg, 72°C/1min, e etapa final de 72°C/10 min. Os produtos de PCR foram purificados com o Kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EUA), segundo as recomendações do fabricante. As

reações de sequenciamento foram realizadas usando o Kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (ABI) e o sequenciador ABI-PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA, EUA).

Para identificar possíveis homologias, submetemos as sequências a uma análise de identidade no BLAST_n (Altschul *et al.*, 1990) através do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, EUA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). As sequências foram alinhadas, utilizando o algoritmo ClustalW, e editadas manualmente usando o *software* Geneious R7 v7.1.3 (Kearse *et al.*, 2012). A sequência do gene COI de *P. fur* foi alinhada com uma sequência disponível no NCBI para a espécie, pelo fato de possuímos apenas um exemplar para a análise.

Após a edição das sequências, estimamos as médias intra e interespecíficas utilizando o modelo de evolução Kimura-2-parâmetros (K2P – Kimura, 1980) no programa MEGA v5.2 (Tamura *et al.*, 2011). Para a delimitação de unidades taxonômicas operacionais moleculares (*Molecular Operational Taxonomic Units* – MOTUs; Blaxter *et al.*, 2005; Galimberti *et al.*, 2012), que podem representar potenciais espécies, foram utilizadas duas abordagens: uma tradicional (distância – DNA *barcoding* – Hebert *et al.*, 2003) e outra baseada em coalescência (GMYC, Pons *et al.*, 2006, e bPTP, Zhang *et al.*, 2013).

A análise de distância requer primeiramente a escolha do *threshold*, que representa o valor limite entre distâncias intra e interespecíficas. O DNA *barcoding* tem como hipótese que indivíduos pertencentes a mesma espécie apresentarão distâncias genéticas mais baixas do que indivíduos de espécies distintas, dado o valor limiar (ou *threshold*). No presente trabalho, utilizamos dois valores: o valor padronizado de 2%, adotado para a identificação dos peixes Neotropicais (Pereira *et al.*, 2013), e um calculado a partir do nosso conjunto de dados (ótimo *threshold* – OT), utilizando a função “LocalMinima” implementada no pacote SPIDER (*SPecies IDentity and Evolution in R*; Brown *et al.*, 2012) para a plataforma R (<http://www.R-project.org>). Posteriormente, estes valores foram utilizados pelo programa jMOTU (Jones *et al.*, 2011) para a obtenção das MOTUs. Por fim, a topologia de *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) foi

construída a fim de se obter uma representação gráfica das unidades moleculares. Esta foi construída utilizando o modelo K2P e o método de *bootstrap* (1.000 réplicas) para obter o suporte dos agrupamentos (Felsenstein, 1985).

Além da metodologia baseada em distância, utilizamos uma abordagem mais robusta estatisticamente, que é se baseia em coalescência para delimitar as espécies, compreendendo dois métodos distintos. O primeiro deles foi o GMYC (*General mixed Yule Coalescent*), que utiliza uma árvore ultramétrica para analisar, baseado no comprimento dos ramos dessa árvore, a divergência nas taxas de ramificação entre os eventos de especiação e extinção (relações interespecíficas) e os eventos de coalescência (relações intraespecíficas) (Pons *et al.*, 2006). Assim, foi determinado, por meio do *software* jModelTest 3.7 (Posada, 2008), o melhor modelo de substituição nucleotídica para o conjunto de dados, utilizando o critério de informação bayseana (BIC) (Lanfear *et al.*, 2010). Em seguida, a árvore ultramétrica foi construída com o *software* BEAST v.2.2.1 (Bouckaert *et al.*, 2014), sob as seguintes condições: relógio molecular relaxado com uma distribuição de lognormal; taxa mutacional de 0,012 (ou 1,2% a cada 1 milhão de anos; Bermingham *et al.*, 1997), para calibrar nossa árvore e estimar os tempos de divergência entre as MOTUs; e o modelo de especiação *birth-death*, sugerido por Costa-Silva *et al.* (2015). Para a obtenção da árvore ultramétrica utilizamos as espécies *Megalonema argentinum* (Números GenBank: KU289066.1 e KU288957.1) e *Megalonema* sp. (Número GenBank: KT952414.1) como grupos externos. Foram utilizadas quatro cadeias independentes de Markov (MCMC) a partir de árvores aleatórias e corridas com 10 milhões de gerações, com parâmetros e árvores sendo salvas a cada 10.000 gerações. Para o *burn-in* foram descartadas 25% das topologias, e os arquivos de *log* e *trees* foram combinados por meio do *software* LogCombiner v.1.8.0 (Drummond *et al.* 2012). A mixagem apropriada dos dados foi verificada com o *software* Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond, 2007), com o tamanho efetivo da amostragem (ESS – *effective sample size*) igual a 200 ou mais sendo necessário para todos os parâmetros. De posse da árvore ultramétrica, o método GMYC foi realizado no pacote SPLITS (*SPecies LIimits by Threshold*

Statistics; Monaghan *et al.*, 2009) do *software* R, utilizando o método de *threshold* único e parâmetro de intervalo padrão (intervalo = c(1,10).

A análise bPTP (A *Bayesian Implementation Poisson Tree Processes*) utiliza uma árvore não-ultramétrica visando obter a taxa de especiação diretamente do número de substituições. Assim, o método assume que o número de substituições entre espécies é significativamente maior do que o número de substituições entre espécies. De maneira geral, GMYC e bPTP pretendem identificar as mudanças significativas no ritmo dos eventos de ramificação da árvore. Entretanto, GMYC usa o tempo para identificar pontos de transição de taxa de ramificação, enquanto PTP usa diretamente o número de substituições (Zhang *et al.*, 2013). Para a análise do bPTP, a árvore não ultramétrica foi estimada no *software* de inferência bayesiana MrBayes (Zhang *et al.*, 2013) utilizando o mesmo conjunto de dados que os métodos anteriores. A análise de delimitação de espécies foi conduzida no servidor <https://species.h-its.org/ptp/>. Os parâmetros utilizados foram: 400.000 gerações de cadeias MCMC e *burn-in* de 0,1, considerando *M. argentinum* e *M. sp* como grupo externo.

6.4.3. Resultados

Dados citogenéticos

Verificou-se número diploide (2n) igual a 56 cromossomos em *B. westermanni*, *P. microstoma* e *P. pohli*, e 2n = 54 cromossomos em *P. fur*. Adicionalmente, em *B. westermanni* evidenciou-se uma variação intra- e interindividual de 0 até 4 cromossomos B. Não foi observada a ocorrência de sistemas de cromossomos sexuais diferenciados nas espécies analisadas.

O mapeamento da sequência telomérica (TTAGGG)_n revelou que a mesma encontra-se presente nas regiões terminais de todos os cromossomos do cariótipo das duas espécies (Fig. 1A e 1B). Além disso, foram observados sítios teloméricos intersticiais (ITS) em três pares cromossômicos em *P. pohli*, (Fig. 1B - asteriscos). A distribuição dessa repetição em *B. westermanni*, já foi publicada pela autora (ver Malimpensa *et al.*, 2018 – Capítulo I), e segue o

padrão de sítios apenas terminais, inclusive nos cromossomos B, indicando a ausência de ITS nessa espécie. Para *P. fur*, não foram obtidos resultados suficientes e satisfatórios com esse marcador.

Os dados obtidos com a técnica de CGH mostraram que o gDNA de *B. westermanni* compartilha algumas regiões com o gDNA das outras três espécies (Fig. 2)

Com *P. fur*, verifica-se o compartilhamento genômico na região terminal do braço longo (q) de dois pares cromossômicos, um metacêntrico (m) e um subtelocêntrico (st), sendo que neste último, essa região de gDNA comum, possivelmente corresponde a região organizadora de nucléolo (RON) de ambas as espécies. Os cromossomos B de *B. westermanni* apresentaram conteúdo genômico das duas espécies, porém, com maior predomínio do gDNA de *B. westermanni* (Fig. 2 – boxes). Os resultados obtidos na hibridização com *P. microstoma* foram semelhantes ao padrão de observado com *P. fur*, apresentando compartilhamento de conteúdo genômico nas mesmas regiões cromossômicas verificadas para *P. fur*. Entretanto, apesar de prevalecer o gDNA de *B. westermanni* nos cromossomos B da espécie, foi constatada uma maior presença de gDNA de *P. microstoma* nesses elementos em relação aos dados observados com *P. fur* (Fig. 2 – boxes). Para *P. pohli* evidenciou-se o compartilhamento de gDNA apenas na região terminal do braço q de um par st, que possivelmente corresponde às RONS de ambas as espécies. Para os cromossomos B de *B. westermanni* também foi observado um predomínio do gDNA desta espécie, apesar de ter sido verificada a ocorrência de conteúdo genômico de *P. pohli* nesses elementos, em maior quantidade comparada a presença de gDNA de *P. fur* e *P. microstoma* (Fig. 2 – boxes).

Dados moleculares

Após o alinhamento e edição das sequências, os 22 fragmentos do gene COI (21 sequências obtidas no presente trabalho e 1 sequência do banco de dados do NCBI) apresentaram 589 pares de bases (pb), sendo que destes, 531 são conservados e 58 são variáveis. Dos 58 sítios

variáveis, 50 deles são parcimoniosamente informativos (ou seja, ocorrem em mais de um indivíduo) e 8 são singletons (mutações únicas em apenas um indivíduo). A maioria dos sítios polimórficos ocorreu na terceira posição dos códons (91,37%, 53 sítios), não alterando, portanto, o aminoácido produzido. As outras cinco mutações foram sinônimas, ocorrendo na primeira posição dos códons. Nenhuma inserção, deleção ou stop códon foi verificada, indicando que todos os fragmentos obtidos são sequências funcionais do gene COI e não NUMTS (pseudogenes mitocondriais nucleares).

Por meio da função “LocalMinima” do SPIDER (pacote R) foi calculado o OT para o nosso conjunto de dados, o qual foi igual a 0,027 (ou 2,7 %), sendo considerado o valor que possivelmente acarreta a transição/lacuna (também chamada de *Barcoding gap*) decorrente da diferença entre as distâncias intra- e interespecíficas. Como o OT igual a 2,7% é considerado alto para peixes Neotropicais (Pereira *et al.*, 2013), optamos por utilizar o *threshold* limite sugerido pela literatura, que é de 2% (Hebert *et al.*, 2003). Os valores médios das máximas intraespecíficas e das mínimas interespecíficas para as espécies analisadas (Tab. 2) estão de acordo com o que foi estipulado pela literatura para o DNA *barcoding*, de que as espécies identificadas por essa metodologia apresentariam uma distância intraespecífica menor que o *threshold* de 2%, e uma distância interespecífica maior que 2% (Hebert *et al.*, 2003).

Comparando as máximas distâncias intraespecíficas com as mínimas distâncias interespecíficas para cada espécie nominalmente reconhecida, obtivemos a distribuição das unidades taxonômicas em quatro quadrantes (Fig. 3). Devido ao fato de termos coletado e analisado apenas um indivíduo de *P. fur*, não foi possível calcular a máxima distância intraespecífica. Sendo assim, realizamos a distribuição nos quadrantes apenas para as outras três espécies (*B. westermanni*, *P. microstoma* e *P. pohli*). Todas as três foram incluídas no quadrante I, apresentando distâncias intraespecíficas menores e interespecíficas maiores que o *threshold*, indicando que dados morfológicos e moleculares são congruentes e as espécies não apresentam problemas taxonômicos (Hebert *et al.*, 2003). Utilizando o *threshold* de 2%, foram identificados

quatro MOTUs, sendo que cada uma dessas MOTUs correspondem às quatro espécies taxonomicamente válidas (*B. westermanni*, *P. fur*, *P. microstoma* e *P. pohli*). A árvore de *Neighbor-Joining* obtida está representada na Fig. 4.

Na análise GMYC, a máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) do modelo GMYC foi significativamente superior ($L = 47,51751$) a verossimilhança do modelo nulo ($L_0 = 40,68834$, $p \text{ value} = 0,000$), indicando que a hipótese nula, de que há uma única unidade molecular no nosso conjunto de dados, foi rejeitada. O único ponto de transição entre os processos de coalescência e especiação/extinção, das análises de GMYC, demonstram a presença de sete ML entidades (consideradas “espécies” para a análise), com um intervalo de confiança de 7-10. O GMYC recuperou os mesmos quatro grupos identificados pelas análises de distância (Fig. 5) As análises de bPTP também demonstraram a presença de quatro espécies, coincidindo com os resultados obtidos nas análises de DNA *barcoding* e GMYC, que são correspondentes com as quatro espécies taxonomicamente válidas (Fig. 5).

A topologia do gene COI (Fig. 5) apresenta altos valores de suporte ($<0,95$) para os nós formados, exceto para o nó que suporta o clado do gênero *Pimelodus*. É possível também observar a proximidade filogenética entre as espécies *P. microstoma* e *P. fur*. As estimativas de tempo de divergência entre as espécies sugerem que o ancestral comum mais recente do grupo viveu durante o Plioceno superior, há aproximadamente 3,1 milhões de anos (Ma), com intervalo de confiança (95% HPD) de 1,87 a 4,4 Ma. Todos os demais processos de diversificação ocorreram no Pleistoceno.

6.4.4. Discussão

Morfologicamente, as espécies analisadas no presente trabalho são muito parecidas, exibindo padrões de coloração e tamanho muito similares, especialmente as três pertencentes à *Pimelodus*, que se distinguem entre si por diferenças sutis, muitas vezes perceptíveis somente ao exame detalhado dos taxonomistas (Garavello & Shibatta, 2007; Ribeiro & Lucena, 2006; 2007;

2010). Tais semelhanças morfológicas, aliadas à ausência de um diagnóstico baseado em relações filogenéticas, impõem dificuldades à correta identificação taxonômica de Pimelodidae, tornando a delimitação de espécies na família muito imprecisa e complexa (Garavello & Shibatta, 2007; Girardi *et al.*, 2018).

Adicionalmente, similaridades cariotípicas foram também observadas entre as espécies estudadas neste trabalho (Capítulos I, II e III), como os padrões de bandamento C e RONS e de distribuição cromossômica de algumas sequências repetitivas (por exemplo, microssatélites, DNAr 45S, snRNA U2 e co-localização de histonas). Entretanto, diversas outras características citogenéticas mostraram divergências interespecíficas, tais como $2n = 54$ em *P. fur* (presente capítulo; Garcia & Moreira-Filho, 2005), cromossomos B em *B. westermanni* (Malimpensa *et al.*, 2018), localização e número de sítios de DNAr 5S (Capítulos I e II; Garcia & Moreira-Filho, 2008), e a presença de ITS em *P. pohli* (presente capítulo), sustentam a delimitação taxonômica.

Os experimentos de CGH mostram que apesar das três espécies de *Pimelodus* apresentarem regiões compartilhadas com *B. westermanni*, tal compartilhamento foi limitado a algumas regiões cromossômicas, sendo *P. pohli* a espécie que demonstrou o menor número de sítios cromossômicos compartilhados com *B. westermanni*, os quais foram evidenciados somente na região terminal de um par cromossômico st, e que possivelmente são correspondentes às RONS dessas espécies (Capítulos I e II). *P. fur* e *P. microstoma* apresentaram sítios de compartilhamento na região terminal de dois pares cromossômicos, em um par m, e em um par st, sendo este, provavelmente correspondente às RONS (Capítulos I e II; Garcia & Moreira-Filho, 2005). Por sua vez, os cromossomos supranumerários de *B. westermanni* também evidenciaram sítios genômicos compartilhados com *P. fur*, *P. microstoma* e *P. pohli*, porém em quantidade bem menor comparativamente à hibridização com o próprio genoma de *B. westermanni*, onde grandes blocos espécie-específicos são observados, sustentando sua origem intraespecífica (Malimpensa *et al.*, 2018).

Assim sendo, esses resultados corroboram os dados obtidos com a taxonomia,

evidenciando que apesar das similaridades morfológicas, a ocorrência de poucas regiões cromossômicas com compartilhamento genômico distancia *B. westermanni* das outras espécies analisadas, além de demonstrar que *P. pohli* é a espécie que aparentemente mais divergiu em relação às demais. A similaridade de padrões de compartilhamento de gDNA com *B. westermanni* verificada de *P. fur* e *P. microstoma* com *B. westermanni*, sugere uma maior proximidade entre essas duas espécies de *Pimelodus*, fato este que já foi também sustentado pela taxonomia por muito tempo, uma vez que *P. microstoma* era considerada espécie sinônima de *P. fur* (Ribeiro & Lucena, 2007) bem como pela topologia de inferência bayesiana do gene COI aqui apresentada.

A ocorrência de sítios da sequência telomérica (TTAGGG)_n restritos às regiões terminais dos cromossomos de *B. westermanni*, *P. fur* e *P. microstoma*, indicam a ausência de rearranjos envolvendo essas sequências ao longo do processo de evolução cariotípica dessas espécies. Entretanto, a presença de ITS em *P. pohli* indica um cenário oposto nessa espécie. O número diploide $2n = 56$ cromossomos verificado em *P. pohli* é evidenciado também em praticamente todas as espécies de Pimelodidae (ver revisão em Girardi *et al.*, 2018). Sendo assim, a hipótese mais plausível para a ocorrência de ITS nessa espécie é a de que esses sítios teloméricos são remanescentes de rearranjos cromossômicos indicando assim mais uma característica cromossômica específica para essa espécie em relação às demais ora investigadas.

Incertezas taxonômicas são comuns entre os peixes neotropicais, e grande parte delas vem sendo investigada por meio de metodologias moleculares, especialmente a do DNA *barcoding* (Pereira *et al.*, 2013), a qual tem sido também empregada para o estabelecimento de relações filogenéticas (Ramirez & Galetti Jr., 2015). Os dados presentemente obtidos com as análises moleculares corroboraram os resultados do CGH, mostrando a ocorrência de quatro MOTUs, correspondentes às quatro espécies nominais atualmente admitidas, ou seja: grupo (1) formado por *B. westermanni*; grupo (2) formado por *P. fur*; grupo (3) formado por *P. microstoma* e grupo (4) formado por *P. pohli*. As análises com o DNA *barcoding* revelaram que a maior distância interespecífica ocorre entre *B. westermanni* e *P. microstoma*, enquanto que a menor distância

ocorre entre *P. fur* e *P. micróstoma* (Tab. 2). Este último resultado justifica, de certa forma, a sinonímia sugerida durante vários anos para essas duas espécies (Ribeiro & Lucena, 2007).

A topologia do gene COI foi calibrada a partir da taxa mutacional geral para peixes. Embora não haja uma taxa específica para a família Pimelodidae, os tempos de diversificação entre as espécies parecem condizentes com a história geológica das bacias do Alto Paraná e São Francisco. Entre as quatro espécies estudadas, apenas *P. micróstoma* encontra-se na bacia do Alto Paraná, sendo provável que o ancestral comum mais recente desse grupo encontrava-se então presente na bacia do São Francisco durante o Plioceno Superior (3,1Ma - 95% HPD de 1,87 a 4,4 Ma) (Fig. 5). O próximo ponto de diversificação é em relação ao ancestral do gênero *Pimelodus* (2,88 Ma, 95% HPD de 1,67-4,1 Ma). O ancestral comum mais recente de *P. fur* e *P. micróstoma* (1,4 Ma, 95% HPD de 0,61 a 2,2 Ma) provavelmente dispersou para a bacia do Alto Paraná, por captura de cabeceira, e se diversificou em *P. micróstoma*, enquanto outra parte divergiu para *P. fur*. Eventos de captura de cabeceiras entre essas duas bacias hidrográficas são comuns na literatura (Buckup, 2011; Machado *et al.*, 2018). A estrutura geológica da região apresenta inúmeras falhas geológicas que são reativadas continuamente, promovendo rearranjos entre as bacias e consequente troca de ictiofauna. Especificamente, entre as cabeceiras das duas bacias hidrográficas existe um sistema de falhas geológicas conhecido como Descontinuidade Crustal do Alto Rio São Francisco (Buckup, 2011). Essa falha sofreu importantes reativações durante o Pleistoceno, período em que ocorreu o processo de diversificação entre *P. fur* e *P. micróstoma*. Para melhor compreensão dos processos de diversificação entre os gêneros *Pimelodus* e *Bergiaria*, seria aconselhável a inclusão de outros marcadores moleculares e o aumento no número de espécies do gênero.

Os resultados moleculares, associados com os dados cromossômicos, corroboram a identificação taxonômica de *B. westermanni*, *P. fur*, *P. micróstoma* e *P. pohli* mostrando que, apesar das similaridades morfológicas, as diferenças citogenéticas e genômicas sustentam a existência de quatro espécies bem definidas. Foi também possível constatar que os tempos de

diversificação dessas espécies são condizentes com as histórias geológicas das bacias do Alto Rio Paraná e do Rio São Francisco, o que permite sugerir que a ocorrência do ancestral comum mais recente dessas espécies na bacia do rio São Francisco e dispersão posterior para a bacia do alto rio Paraná.

6.5.5. Referências

ALTSCHUL, STEPHEN F.; GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

BELLAFRONTE, E.; MARIGUELA, T.C; PEREIRA, L.H.G; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, O. DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin - Applying new data to clarify taxonomic problems. **Neotrop Ichthyol**, v. 11, n. 3, p. 497-506, 2013.

BERMINGHAM, E. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. **Molecular Systematics of Fishes**. Academic Press. 1997. p. 113-128.

BERTOLLO, L.A.C.; CIOFFI, M.B.; MOREIRA-FILHO, O. Direct chromosome preparation from Freshwater Teleost Fishes. In: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (Eds). **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. United States: CRC Press, 2015, p. 21-26.

BLAXTER, M.; MANN, J.; CHAPMAN, T.; THOMAS, F.; WHITTON, C.; *et al.* Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. **Philos Trans R Soc of L B Biol Sci**, v. 360, n. 1462, p. 1935-1943, 2005.

BOUCKAERT, R.; HELED, J.; KÜHNERT, D.; VAUGHAN, T.; WU, C.H.; *et al.* BEAST 2: A *software* platform for bayesian evolutionary analysis. **PloS Computat Biol**, v. 10, p. e1003537, 2014.

BROWN, S.D.J.; COLLINS, R.A.; BOYER, S.; LEFORT, M.C.; MALUMBRES-OLARTE, J.; *et al.* Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA *barcoding*. **Mol Ecol Res**, v. 12, p. 562–565, 2012.

BUCKUP, P.A. The Eastern Brazilian Shield. In: ALBERT, J.S.; REIS, R.E. **Historical Biogeography of Neotropical freshwater fishes**. Los Angeles: University of California Press, 2011. p. 203-210.

CARVALHO, P.C.; de OLIVEIRA, E.A.; BERTOLLO, L.A.C; YANO, C.F.; OLIVEIRA, C.; DECRU, E.; *et al.* First chromosomal analysis in Hepsetidae (Actinopterygii, Characiformes): insights into relationship between African and Neotropical fish groups. **Front Genet**, v. 8, p. 203, 2017.

COSTA-SILVA, G.J.; RODRIGUEZ, M.S.; ROXO, F.F.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex Neotropical hyperdiverse group. **PloS ONE**, v. 10, p. e0135075, 2015.

de FREITAS, N.L.; AL-RIKABI, A.B.; BERTOLLO, L.A.C.; EZAZ, T.; YANO, C. F.; *et al.* Early stages of XY sex chromosomes differentiation in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) revealed by DNA repeats accumulation. **Current Genomics**, v. 19, n. 3, p. 216-226, 2018.

de MORAES, R.L.R.; BERTOLLO, L.A.C.; MARINHO, M.M.F.; YANO, C.F.; HATANAKA, T.; *et al.* Evolutionary relationships and cytotaxonomy considerations in the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 6, p. 536-546, 2017.

DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 **Mol Biol Evol**, v. 29, p. 1969-1973, 2012.

FRICKE, R.; ESCHEMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. California Academy of Sciences, 2019. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/speciesbyfamily.asp#Pimelodidae>>. Acesso em 20 de jan. de 2019.

FANTINATTI, B.E.A.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; CABRAL-DE-MELLO, D. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Genetica**, v. 139, n. 10, p. 1273-1282, 2011.

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

FELSENSTEIN, J. Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

GALIMBERTI, A.; SPADA, M.; RUSSO, D.; MUCEDDA, M.; AGNELLI, P.; *et al.* Integrated Operational Taxonomic Units (IOTUs) in Echolocating Bats: A bridge between Molecular and Traditional Taxonomy. **PLoS ONE**, v. 7, p. e40122, 2012.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. **Neotrop Ichthyol**, v. 3, n. 2, p. 285-290, 2005.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes: Pimelodidae) of the São Francisco river: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. **Genet Mol Biol**, v. 31, n. 1, p. 261-264, 2008.

GIRARDI, S.C.; PAVANELLI, C.S.; MARGARIDO, V.P. Contributions to the systematic of Pimelodidae (Osteichthyes, Siluriformes): basic and molecular cytogenetics on seven species of *Pimelodus* from three Brazilian hydrographic systems. **Neotrop Ichthyol**, v. 16, n. 2, 2018.

HATANAKA, T.; DE OLIVEIRA, E.A.; RÁB, P.; YANO, C.F.; BERTOLLO, L.A.C.; *et al.* First chromosomal analysis in *Gymnarchus niloticus* (Gymnarchidae: Osteoglossiformes): insights into the karyotype evolution of this ancient fish order. **Biol J Linn Soc**, v. 125, n. 1, p. 83-92, 2018.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 270, p. 313-321, 2003.

IJDO, J.W.; WELLS, R.A.; BALDINI, A.; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 17, p. 4780, 1991.

JONES, M.; GHOORAH, A.; BLAXTER, M. JMOTU and Taxonator: turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19259, 2011.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; *et al.*: Geneious Basic: an integrated and extendable desktop *software* platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KIMURA, M.A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, p. 111-120, 1980.

LANFEAR, R.; CALCOTT, B.; HO, S.Y.; GUINDON, S. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. **Mol Biol Evol**, v. 29, p. 1695–1701, 2012.

LUNDBERG, J.G.; LITTMANN, M.W. Pimelodidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr., C.J. (Eds.). **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 432–446.

MACHADO, C.B.; ISHIZUKA, T.K.; FREITAS, P.D.D.; VALIATI, V.H.; GALETTI Jr., P.M. DNA *barcoding* reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characiformes). **Syst Biodivers**, v. 15, n. 4, p. 372-382, 2016.

MACHADO, C.B.; GALETTI Jr, P.M.; CARNAVAL, A.C. Bayesian analyses detect a history of both vicariance and geodispersal in Neotropical freshwater fishes. **J Biogeogr**, v. 45, p. 1313-1325, 2018.

MALIMPENSA, G.C.; TRALDI, J.B.; TOYAMA, D.; HENRIQUE-SILVA, F.; VICARI, M.R.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal Mapping of Repeat DNA in *Bergiaria westermanni* (Pimelodidae, Siluriformes): Localization of 45S rDNA in B Chromosomes. **Cytogenet and Genome Res**, v. 154, n. 2, p. 99-106, 2018.

MONAGHAN, M.T.; WILD, R.; ELLIOT, M.; FUJISAWA, T.; BALKE, M.; *et al.* Accelerated species Inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Systematic Biol**, v. 58, p. 298–311, 2009.

NASCIMENTO, M.H.S.; ALMEIDA, M.S.; VEIRA, M.N.S.; LIMEIRA-FILHO, D.; LIMA, R.C.; BARROS, M.C.; *et al.* DNA *barcoding* reveals high levels of genetic diversity in the fishes of the Itaipuru Basin in Maranhão. Brazil. **Genet Mol Res**, v. 15, 1–11, 2016.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 5 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, New Jersey, 2016. 707 p.

PEREIRA, L.H.; PAZIAN, M.F.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA *barcoding* reveals hidden diversity in the neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the upper Parana Basin of Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 22, p. 87–96, 2011.

PEREIRA, L.H.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA *barcoding* accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, v. 14, p. 20, 2013.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PONS, J.; BARRACLOUGH, T.G.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.; DURAN, D.P.; *et al.* Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biol**, v. 55, p. 595–609, 2006.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Mol Biol Evol**, v. 25, p. 1253-1256, 2008.

RAMIREZ, J.L.; GALETTI Jr., P.M. DNA barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta* Cope 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. **Mol Phylogenetics Evol**, v. 93, p. 77-82, 2015.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. Tracer v1.4. 2007. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.

RIBEIRO, F.R.V.; LUCENA, C.A.S. A new species of *Pimelodus* La Cépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio São Francisco drainage, Brazil. **Neotrop Ichthyol**, v. 4, n. 4, p. 411-418, 2006.

RIBEIRO, F.R.V.; LUCENA, C.A.S. *Pimelodus microstoma* Steindachner, 1877, a valid species of pimelodid catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the upper rio Paraná drainage. **Neotrop Ichthyol**, v. 5, n. 1, p. 75-78, 2007.

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

RIBEIRO, F.R.V.; LUCENA, C.A.S. *Pimelodus heraldoi* Azpelicueta, 2001, a junior synonym of *Pimelodus microstoma* Steindachner, 1877 (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotrop Ichthyol**, v. 8, n. 2, p. 277-281, 2010.

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

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Nova Iorque: Laboratory Press, 2001.

SYMONOVÁ, R.; SEMBER, A.; MAJTÁNOVÁ, Z.; RÁB, P. Characterization of fish genomes by GISH and CGH. In: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (eds). **Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. United States: CRC Press, 2015. p. 118–131.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**, v. 10, p. 2731-2739, 2011.

WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. DNA

barcoding Australia's fish species. **Philos Trans R Soc B**, v. 360, p. 1847-1857, 2005.

YANO, C.F.; BERTOLLO, L.A.C.; REBORDINOS, L.; MERLO, M.A.; LIEHR, T.; *et al*: Evolutionary Dynamics of rDNAs and U2 Small Nuclear DNAs in *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae): High Variability and Particular Syntenic Organization. **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 146-154, 2017.

ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869-2876, 2013.

ZWICK, M. S., HANSON, R. E., MCKNIGHT, T. D., ISLAM-FARIDI, M. N., STELLY, D. M.; *et al*. A rapid procedure for the isolation of Cot-1 DNA from plants. **Genome**, v. 40, p. 138-142, 1997.

6.5.6. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Informações das espécies coletadas.

Espécie	Localidade	Município	Bacia	Sexo		Número de Depósito	Latitude/Longitude
				♀	♂		
<i>Bergiaria westermanni</i>	Rio São Francisco	Piumhi (MG)	São Francisco	13	2	NUP 18792 NUP 18793	S - 20° 22' 6,7" O - 45° 59' 0,01"
	Rio São Francisco	Piumhi (MG)	São Francisco	0	1	MZUEL 19081	S - 20° 20' 21,1" O - 45° 58' 48,9"
<i>Pimelodus pohli</i>	Rio São Francisco	Vargem Bonita (MG)	São Francisco	9	8	MZUEL 19072	S - 20° 19' 30,36" O - 46° 22' 38,10"
						MZUEL 19076	
	Rio Piumhi	Piumhi (MG)		19	11	MZUEL 19080	S - 20° 21' 23,2" O - 45° 58' 54,6"
<i>Pimelodus microstoma</i>	Rio Mogi-Guaçu	Pirassununga (SP)	Alto Paraná	40	27	MZUEL 19069	S - 21° 55' 33,8" O - 47° 22' 06,0"
						MZUEL 19070	
						MZUEL 19071	
						MZUEL 19073	
						MZUEL 19074	

Tabela 2. Distância genética entre as espécies analisadas. Na diagonal principal (negrito) estão os valores intraespecíficos.

	<i>Bergiaria westermanni</i>	<i>Pimelodus fur</i>	<i>Pimelodus microstoma</i>	<i>Pimelodus pohli</i>
<i>Bergiaria westermanni</i>	0,0006			
<i>Pimelodus fur</i>	0,0525	-		
<i>Pimelodus microstoma</i>	0,0630	0,0283	0,0027	
<i>Pimelodus pohli</i>	0,0623	0,0479	0,0589	0,0019

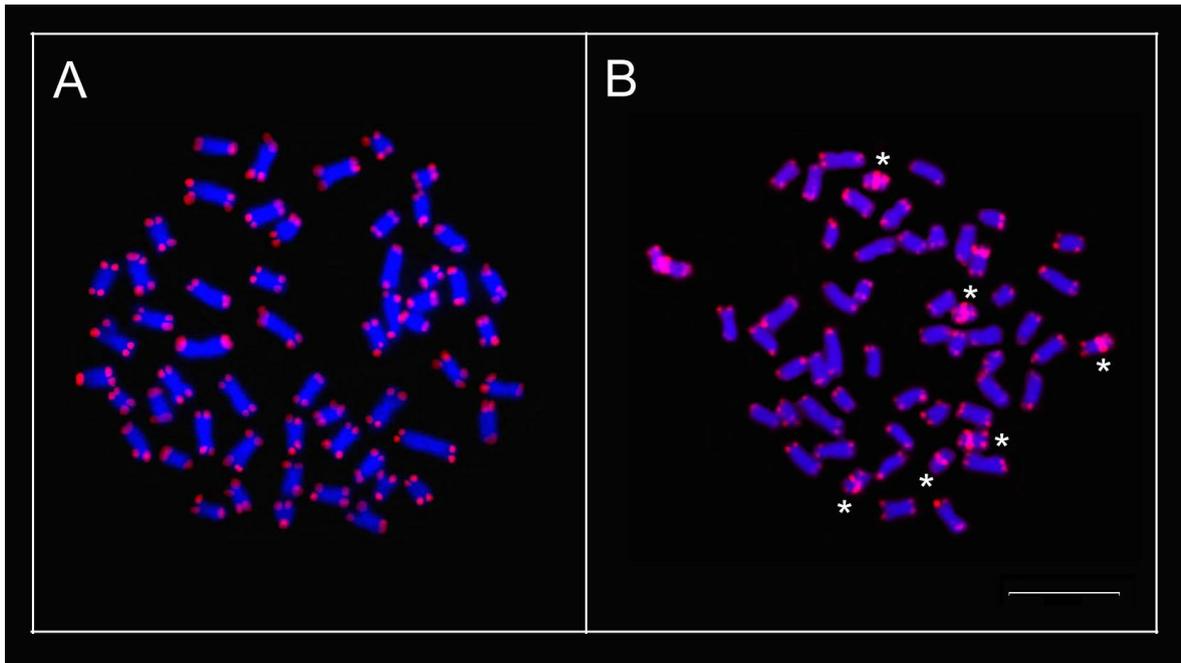


Figura 1. Metáfases de *P. microstoma* (A) e *P. pohli* (B) submetidas à FISH com a sonda (TTAGGG)_n. Em B, os asteriscos indicam os cromossomos portadores de ITS.

Barra = 5 μ m.

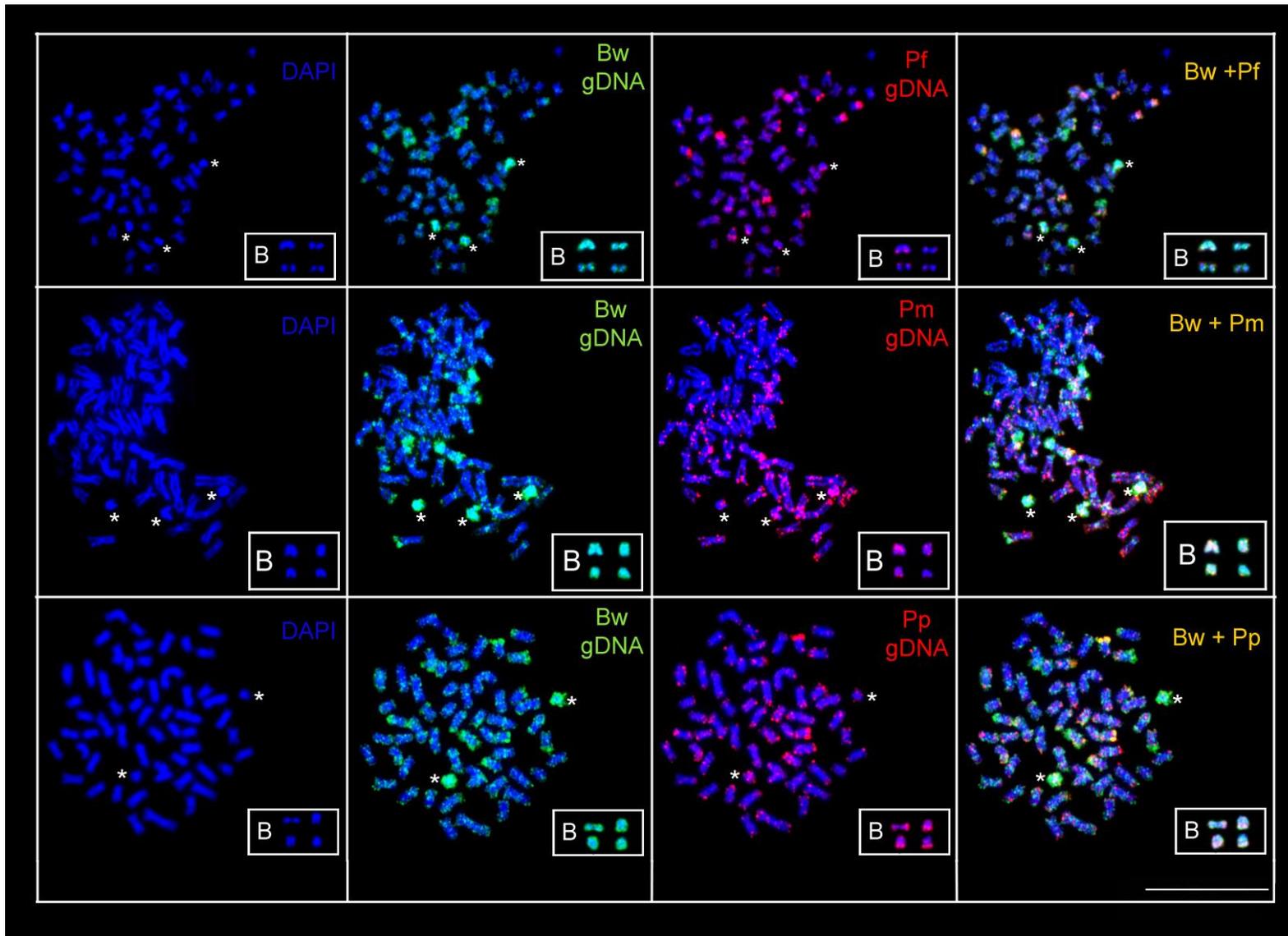


Figura 2. Metáfases de *B. westermanni* submetidas à técnica de CGH. Primeira coluna: coloração com DAPI (azul); Segunda coluna: padrão de hibridização com o gDNA de *B. westermanni* (Bw gDNA) (verde); Terceira Coluna: padrões de hibridização com gDNA de *P. fur* (Pf gDNA), com gDNA de *P. microstoma* (Pm gDNA) e com gDNA de *P. pohli* (Pp gDNA); Quarta coluna: imagens sobrepostas de cada gDNA com a imagem corada com DAPI, com as regiões genômicas compartilhadas evidenciadas em amarelo. Barra = 5 μ m.

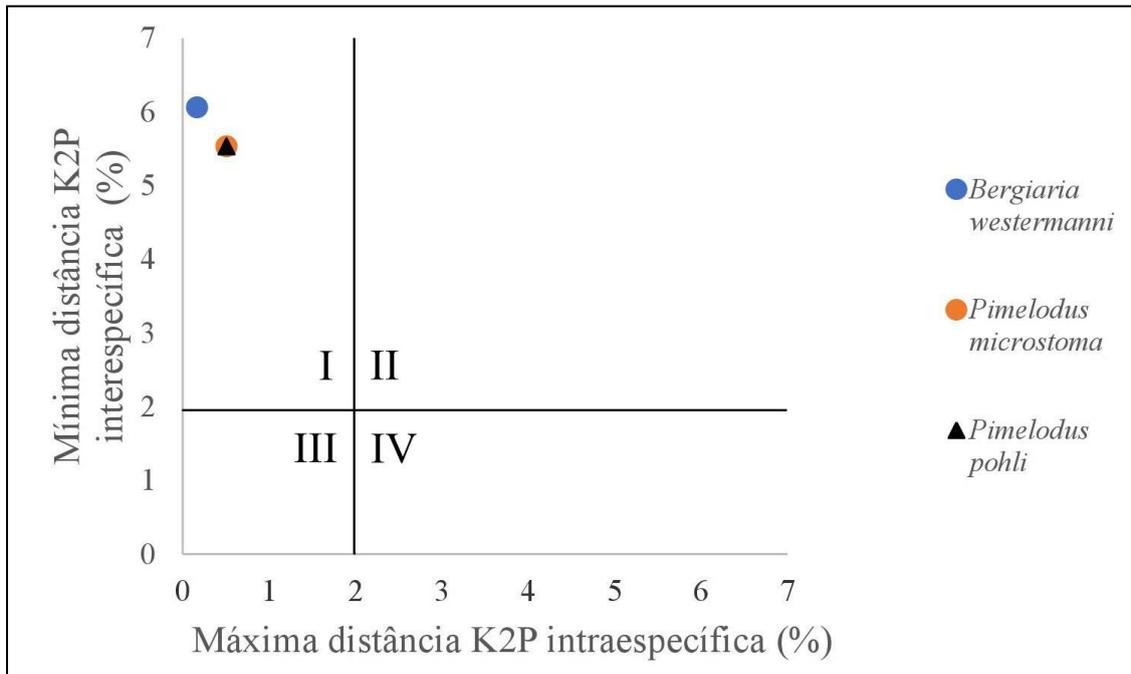


Figura 3. Comparação entre a distância COI intra e interespecífica utilizando as espécies *B. westermanni*, *P. microstoma* e *P. pohli*. Os quatro quadrantes indicados representam: (I) a concordância entre a taxonomia atual e a identificação molecular; (II) possível existência de espécies crípticas; (III) recente divergência, sinonímia ou hibridização; e, (VI) nenhuma correspondência entre taxonomia e identificação molecular.

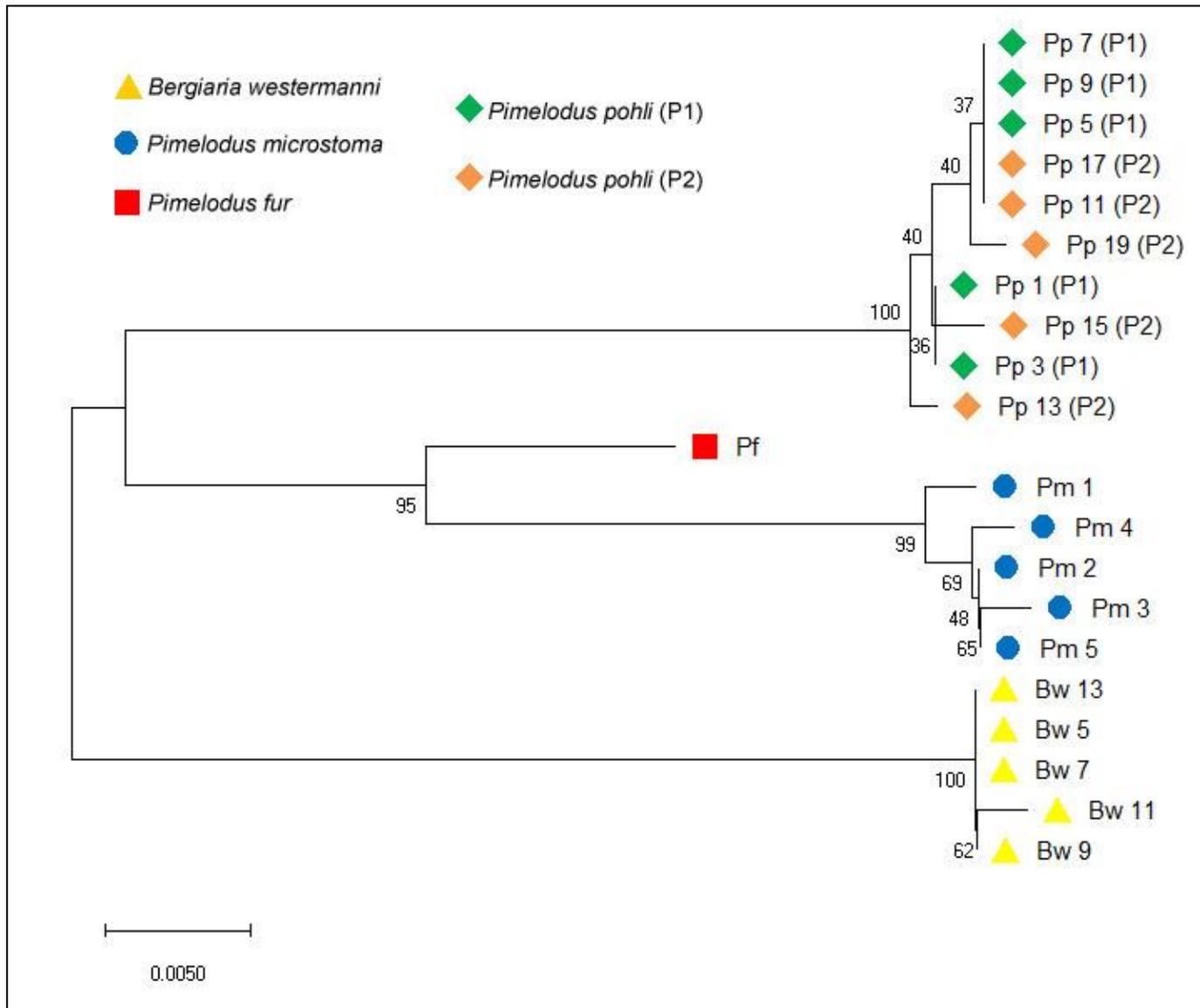


Figura 4. Árvore de *Neighbor-Joining* para as espécies estudadas usando o modelo de distância Kimura-2-parâmetros. Números nos nós representam valores de *bootstrap* obtidos em 1.000 pseudoréplicas.

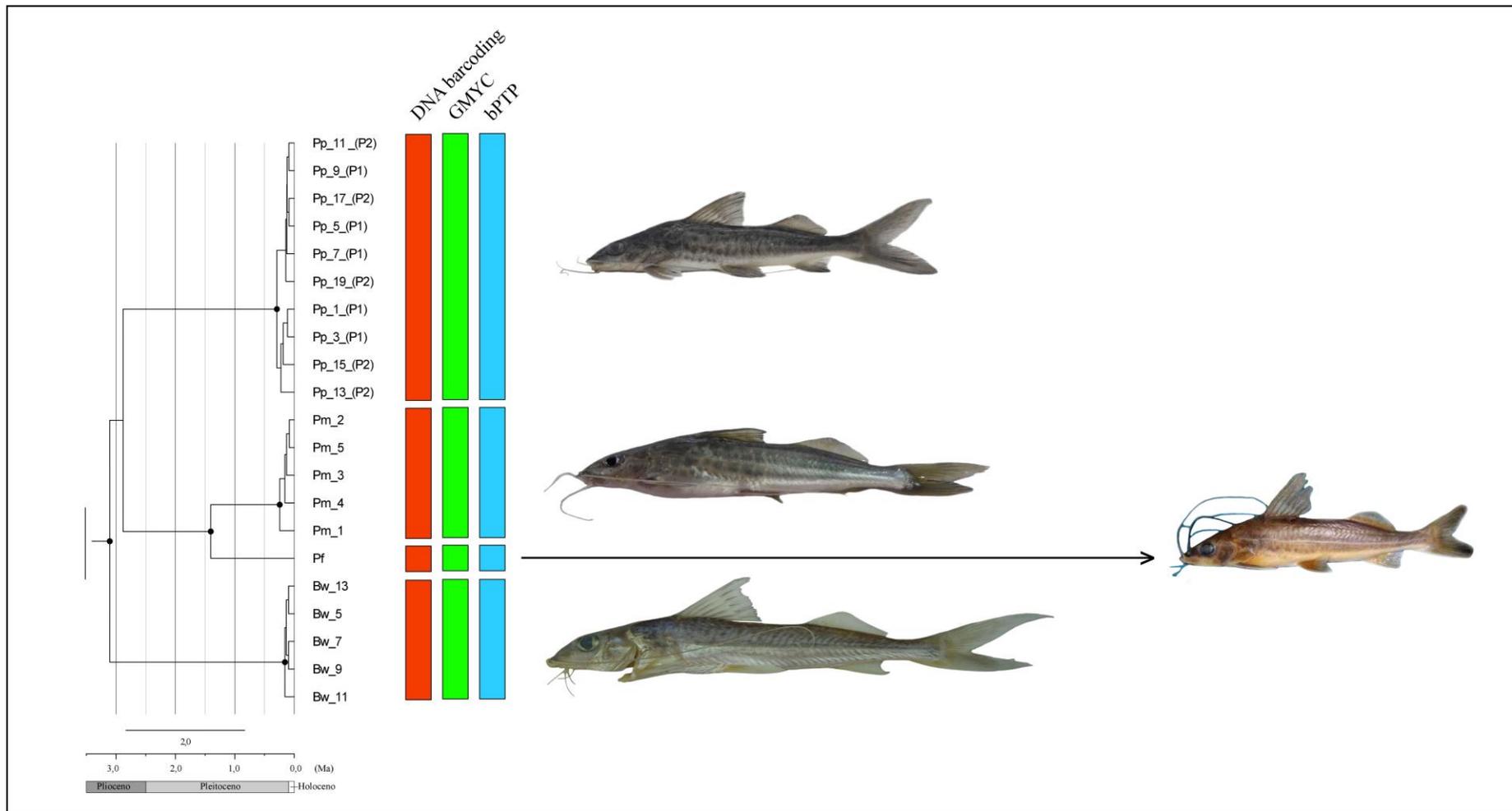


Figura 5. Análise filogenética das quatro espécies estudadas utilizando as três metodologias (DNA *barcoding*, GMYC e bPTP) e estimativa dos tempos de divergência.

Legenda: Bw – *Bergiaria westermanni*; Pf – *Pimelodus fur*; Pm – *Pimelodus microstoma*; Pp – *Pimelodus pohli*; P1 – população 1; P2 – população 2.

7. CONCLUSÕES

1. As espécies analisadas no presente trabalho careciam de informações citogenéticas, especialmente do ponto de vista da citogenética molecular. Neste contexto, este trabalho contribuiu para uma caracterização cromossômica mais detalhada em Pimelodidae, apresentando resultados inéditos para a essa família.

2. Foi evidenciada uma conservação cromossômica em *B. westermanni*, *P. microstoma* e *P. pohli* para diversas características citogenéticas, como: o $2n = 56$; o padrão de distribuição da heterocromatina; a localização dos sítios Ag-RONs/rDNA 45S; o número e localização dos sítios dos snRNA U1 em *P. microstoma* e *P. pohli*; a clusterização dos genes de histonas; a sintenia entre snRNA U2 rDNA 5S; e o padrão de distribuição dos microssatélites nas regiões terminais e subterminais dos cromossomos.

3. Por outro lado, diversas outras características citogenéticas evidenciaram uma diversidade cromossômica e de conteúdo genômico entre as espécies, tais como: o $2n = 54$ em *P. fur*; as diferentes fórmulas cariotípicas; a presença de cromossomos B em *B. westermanni* com genes DNAr; as variações no número e localização dos sítios rDNA 5S; a presença de ITS em *P. pohli*; a sintenia entre snRNA U2, DNAr 5S e histonas em *B. westermanni*; as variações na localização dos sítios H3/H4 em *P. microstoma*; a presença de um bloco conspícuo do microssatélite (GATA)_n em um par cromossômico de *P. microstoma*.

4. A aplicação das metodologias Ag-RON e FISH com DNAr 18S nos núcleos de *B. westermanni*, demonstraram um número de nucléolos maior do que o número de sítios ribossomais nos cromossomos do complemento A, evidenciando, indiretamente, a expressão gênica do DNAr 18S nos cromossomos B dessa espécie.

5. A FISH com rDNA 18S e (GATA)_n mostrou a presença dessas sequências nos cromossomos B de *B. westermanni*, assim como nos cromossomos A da espécie, sugerindo a provável origem intraespecífica desses elementos. Essa hipótese foi sustentada com a CGH, que evidenciou a

predominância de conteúdo genômico de *B. westermanni* nesses cromossomos.

6. As análises moleculares, utilizando DNA *barcoding*, GMYC e bPTP, associadas com as diferenças citogenéticas encontradas entre as quatro espécies analisadas, sustentam a identificação e separação dessas espécies feita pela taxonomia, apesar das grandes similaridades morfológicas observadas entre elas. Adicionalmente, as análises de CGH mostraram que *B. westermanni* compartilha gDNA com as outras espécies, somente em algumas poucas regiões cromossômicas, reforçando ainda mais a divergência e diversificação dessas espécies ao longo da evolução de Pimelodidae.