



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FÁBIO HIROSHI TAKAGUI

**APLICAÇÃO DE MARCADORES CROMOSSÔMICOS E DNA
BARCODING PARA ESTUDO DA EVOLUÇÃO
CARIOTÍPICA E RESOLUÇÃO DE CONFLITOS
TAXONÔMICOS EM DORADIDAE (PISCES-
SILURIFORMES)**

Londrina
2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL



Programa de
Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular

FÁBIO HIROSHI TAKAGUI

**Aplicação de Marcadores cromossômicos e DNA Barcoding para
estudo da Evolução cariotípica e resolução de conflitos
taxonômicos em Doradidae (Pisces-Siluriformes)**

Londrina

2019

FÁBIO HIROSHI TAKAGUI

**APLICAÇÃO DE MARCADORES CROMOSSÔMICOS E DNA
BARCODING PARA ESTUDO DA EVOLUÇÃO
CARIOTÍPICA E RESOLUÇÃO DE CONFLITOS
TAXONÔMICOS EM DORADIDAE (PISCES-
SILURIFORMES)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Giuliano-Caetano

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Simões de Almeida

Londrina
2019

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

TAKAGUI, FABIO HIROSHI .

Aplicação de Marcadores cromossômicos e DNA Barcoding para estudo da Evolução cariotípica e resolução de conflitos taxonômicos em Doradidae (Pisces-Siluriformes). / FABIO HIROSHI TAKAGUI. - Londrina, 2019.
182 f.

Orientador: LUCIA GIULIANO-CAETANO.

Coorientador: FERNANDA SIMÕES DE ALMEIDA.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.

Inclui bibliografia.

1. CITOGENÉTICA - Tese. 2. CITOTAXONOMIA - Tese. 3. EVOLUÇÃO - Tese. 4. ICTIOFAUNA - Tese. I. GIULIANO-CAETANO, LUCIA . II. SIMÕES DE ALMEIDA, FERNANDA. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

FÁBIO HIROSHI TAKAGUI

**APLICAÇÃO DE MARCADORES CROMOSSÔMICOS E DNA
BARCODING PARA ESTUDO DA EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA E
RESOLUÇÃO DE CONFLITOS TAXONÔMICOS EM DORADIDAE
(PISCES-SILURIFORMES)**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Giuliano-Caetano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Roberto Laridondo Lui
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -
UNIOESTE

Prof. Dr. Paulo Cesar Venere
Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT

Profa. Dra. Ana Claudia Swarça
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marceléia Rubert
União de Ensino do Sudoeste do Paraná - UNISEP

Londrina, 27 de fevereiro de 2019.



CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 27 dias do mês de fevereiro do ano de 2019, na sala SALA 02 do Laboratório Escola De Pós-Graduação, desta Universidade, às 14:00 horas, reuniu-se a Banca Examinadora homologada pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, composta por: Dra. Lucia Giuliano Caetano, Dra. Ana Claudia Swarça, Dra. Marceléia Rubert, Dr. Paulo Cesar Venere e Dr. Roberto Laridondo Lui. A reunião teve por objetivo julgar o trabalho do estudante FÁBIO HIROSHI TAKAGUI sob o título: "Aplicação de marcadores cromossômicos e DNA barcoding para estudo da Evolução cariotípica e resolução de conflitos taxonômicos em Doradidae (Pisces-Siluriformes)". Os trabalhos foram abertos pela professora Dra. Lucia Giuliano Caetano. A seguir, foi dada a palavra ao estudante para apresentação do trabalho. Cada examinador arguiu o Doutorando, com tempos iguais de arguição e resposta. Terminadas as arguições, procedeu-se ao julgamento do trabalho, concluindo a Banca Examinadora por sua Aprovação. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

O estudante deverá reformular seu trabalho no prazo de 30 dias: (X) SIM () Não

Se houver alteração no título do trabalho, informar o novo título abaixo

Obs.: Esta documentação não deve conter returas ou corretivo e deve ser preenchida de forma legível.

Londrina, 27 de Fevereiro de 2019

PRESIDENTE

Dra. LUCIA GIULIANO CAETANO

UEL

Lucia Giuliano Caetano

TITULARES

Dr. ROBERTO LARIDONDO LUI

UNIOESTE

Roberto Laridondo Lui

Dr. PAULO CESAR VENERE

UFMT

Paulo Cesar Venere

Dra. ANA CLAUDIA SWARÇA

UEL

Ana Claudia Swarça

Dra. MARCELEIA RUBERT

FAED

Marceléia Rubert

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever essa Tese, foi utilizar apenas poucas linhas para agradecer à todas as pessoas que fizeram parte da minha trajetória de “apenas” 10 anos no Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Estadual de Londrina.

Inicio os agradecimentos pela minha família: meus pais Rosania e Edson, meu irmão Aquio assim como meus avós Teresa, Luís, Geraldo e Edna, que de um modo ou de outro, sempre me motivaram a continuar firme nos estudos, e mesmo não compreendendo os objetivos do meu trabalho, jamais deixaram eu desistir e quando necessário não mediam esforços para me ajudar.

Quando digo família, não me refiro somente às pessoas com quem tenho parentesco genético, nessa longa jornada tive a “sorte” de encontrar amigos espetaculares, aos quais eu serei eternamente grato pelos momentos engraçados, desabafos, e sobretudo por aquela “maozinha” amiga em alguns momentos em que nem mesmo eu acreditava ser possível se reerguer e continuar na caminhada. Incluo nesta lista Tia Regina e meus amigos Angeliquinha, Larissa, Marcelo, Lucas e Daniel.

Uma vez dentro da Universidade, tive a oportunidade de conviver com grande profissionais, dentre eles minha querida orientadora Lucia Giuliano-Caetano, que me ensinou as bases para ser um bom citogeneticista e despertou em mim a paixão pelos cromossomos de peixes. Esses 10 anos de convivência foram em sua maior parte de aprendizado, alegrias e bons resultados. Te agradeço imensamente por ter acreditado no meu potencial e sobretudo por jamais ter “podado minhas asas”, essa independência certamente foi um diferencial na minha carreira.

Lembro-me como se fosse hoje, meu Primeiro Simpósio de Citogenética de Peixes em 2009, alí tive a oportunidade de encontrar os grandes pesquisadores da área, e nesse sentido, alguns deles influenciaram significativamente na minha jornada acadêmica:

Ana Lucia Dias, Alberto Sergio Fenochio, Ana Claudia Swarça, Roberto Lui, Vladimir Pavan Margarido, Paulo Venere, Paulo Affonso, Marcelo Vicari, Fernanda Almeida-Simões (minha co-orientadora).

Durante a realização de minha Tese, tive a oportunidade de conhecer também algumas pessoas que sem o auxílio delas, talvez não tivesse obtido êxito e produzido um trabalho de qualidade. Nesse aspecto eu sou extremamente grato à Prof. Eliana Feldberg, não somente por ter me acolhido em sua casa e no seu laboratório onde eu desenvolvi grande parte do minha pesquisa, mas principalmente por ter resgatado meu ânimo em um momento que meu trabalho não fazia mais sentido. O mesmo se aplica aos professores José Birindelli, Vladimir Pavan Margarido, Roberto Lui e Paulinho Venere, que também sempre estiveram ao meu lado em diferentes etapas desse trabalho, e que por tantos ensinamentos passados terão sempre minha admiração e carinho.

Não posso esquecer dos meus amigos Patrik Viana e Lucas Baumgartner, duas pessoas com as quais eu convivi muito nesses anos de tese, me ajudaram em vários aspectos: na coleta do material, preparação, algumas análises e com sugestões valiosas nos artigos. Mas destaco sobretudo o grande carinho que tenho por esses dois, tenham a plena certeza de que meus resultados só foram possíveis graças ao auxílio de vocês!

Agradeço também ao Professor Jansen Zuanon, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo auxílio na coleta de muitas espécies aqui analisadas, assim como por sempre estar disposto a tirar minhas dúvidas referentes à identificação das espécies juntamente com a Professora Lucia Py-Daniel, no período em que eu estive em Manaus. Agradeço também aos meus colegas de Laboratório do INPA Milena Ferreira e Leandro Marajó com os quais embora tenha convivido durante pouco tempo, posso dizer que foram dias muito agradáveis repletos de “resenhas” mas também de muito aprendizado.

Desde quando cheguei no laboratório até os dias de hoje, tive a oportunidade de conhecer muitas pessoas, entretanto algumas marcaram minha vida como é o caso de Marceia Hubert, Renata da Rosa e Jamille Bitencourt pelos ensinamentos lá no início de tudo, grande parte do que sei hoje devo à paciência que tiveram comigo. Aos demais colegas de laboratório (tanto os que já passaram pelo LACA, quanto aqueles que ainda permanecem), também deixo meus profundos agradecimentos, sem dúvidas é de extrema importância trabalhar em um ambiente agradável e isso fez toda diferença durante a realização desse trabalho.

Aos órgãos fomentadores de pesquisa científica (CAPES e Fundação Araucária) pela contribuição financeira. À Universidade Estadual de Londrina por disponibilizar toda estrutura laboratorial e também recursos humanos para minha formação e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde boa parte do material foi coletado e preparado.

TAKAGUI, Fábio Hiroshi. **Aplicação de marcadores cromossômicos e DNA barcoding para estudo de evolução cariotípica e resolução de conflitos taxonômicos em doradidae (Pisces-Siluriformes)**. 2019. 183 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A família Doradidae é atualmente constituída por 95 espécies de peixes que ocorrem apenas em ecossistemas dulcícolas da América do Sul, sendo mais abundantes na bacia amazônica, onde desempenham papéis ecológicos fundamentais para a homeostasia do ecossistema. Nas últimas décadas diversos estudos filogenéticos baseados em marcadores morfológicos e moleculares corroboraram o monofiletismo do grupo, entretanto algumas divergências permanecem, principalmente em alguns clados onde a abordagem taxonômica tradicional não foi suficiente para diagnosticá-los. Nesse sentido, o presente estudo busca resolver alguns desses problemas taxonômicos, utilizando marcadores citogenéticos associados ao DNA barcoding, assim como propor tendências sobre a evolução cariotípica em Doradidae. Foram analisadas 15 espécies de thorny catfishes, provenientes de diferentes sistemas hidrográficos, os dados obtidos foram distribuídos em três capítulos, cada qual explorando a eficiência dos estudos cariotípicos para compreender questões biogeográficas, citotaxonômicas e evolutivas. O capítulo 1 traz informações sobre as características cariotípicas da subfamília Wertheimerinae: *Wertheimeria maculata*, *Kalyptodoras bahiensis* e *Franciscodoras marmoratus*. As três espécies exibiram $2n=58$ e a mesma fórmula cromossômica com diferenças apenas no padrão de distribuição dos DNAr e principalmente na disposição dos blocos heterocromáticos. Tal variação microestrutural parece estar relacionada com a atividade saltatória de elementos transponíveis, dentre os quais o retrotransposon *Rex3* merece destaque. Também foi sugerida uma hipótese biogeográfica para explicar a diversificação cariotípica de Wertheimerinae, sendo essa baseada em eventos de captura de cabeceira no Complexo do Espinhaço que proporcionou um dinâmico intercâmbio de ictiofauna entre o rio São Francisco e a drenagem costeira do Leste. O capítulo 2 trata de questões citotaxonômicas, com ênfase no gênero *Anadoras*, que embora seja um dos mais amplamente distribuídos dentre aqueles alocados em Doradidae, possui apenas duas espécies formalmente descritas: *Anadoras grypus* e *Anadoras weddellii*, sendo que no presente estudo o status taxonômico de uma possível nova espécie endêmica do Alto rio Araguaia foi testado, utilizando marcadores citogenéticos e algoritmos de delimitação de espécies baseado no DNA barcoding. Os dados cromossômicos foram eficientes somente para diferenciar *A. grypus* de seus congeneres, evidenciando uma notável similaridade entre *A. weddellii* e *Anadoras* sp. “araguaia”. Entretanto o DNA barcoding separou claramente as três espécies, identificando três unidades taxonômicas moleculares operacionais (MOTUs), com alto valor de divergência genética e suportadas pelas inferências Bayesianas, Verossimilhança e por todos os algoritmos de delimitação de espécies. Foi observado também uma baixa distância genética entre populações de *A. weddellii* do Alto, Médio rio Paraguai e Baixo Amazonas, sugerindo uma baixa variabilidade entre populações distantes geograficamente. Curiosamente, a distância intraespecífica observada em indivíduos de uma mesma população de *A. grypus* foi maior do que aquela observada em populações de bacias distintas de *A. weddellii*, no entanto o valor obtido não suporta a hipótese de espécies crípticas em simpatria no Lago Catalão e sugere que a variação descrita no padrão de NORs é um polimorfismo intrapopulacional. No capítulo 3, inferências evolutivas utilizando o software Mesquite foram propostas para explicar a origem da atual diversidade cariotípica de Doradidae. Nesse estudo, 9 espécies foram analisadas

evidenciando uma acentuada variação no número de diplóide: $2n=44$ em *Amblydoras nheco*, $2n=46$ em *Amblydoras affinis*, $2n=52$ em *Astrodoras asterifrons*, $2n=58$ em *Platydoras hancockii*, *Pterodoras granulosus*, *Centrodoras brachiatus*, *Oxydoras niger*, *Hemidoras stenopeltis* e $2n=60$ em *Trachtdoras steindachneri*. Espécies crípticas foram identificadas em *Amblydoras affinis* assim como um inédito sistema de NORs múltiplas em *P. hancockii*. A reconstrução do carácter ancestral corroborou estudos anteriores e estimou como $2n$ basal 58 cromossomos e NORs simples terminais no braço curto de subtelocêntricos, essas características permanecem conservadas em diferentes clados de Doradidae, porém cariótipos derivados também ocorrem devido a rearranjos cromossômicos (inversões pericêntricas, Fissão e Fusão cêntrica, Translocações) e também pelo acúmulo diferencial de regiões heterocromáticas.

Palavras-chave: Cariótipos. Citotaxonomia. DNA barcoding. MOTUs. Heterocromatina.

TAKAGUI, Fábio Hiroshi. **Application of chromosomal markers and DNA barcoding for the study of karyotypic evolution and resolution of taxonomic conflicts in doradidae (Pisces-Siluriformes)**. 2019. 183 p. Thesis (Doctorate in Genetics and Molecular Biology). – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019

ABSTRACT

The Family Doradidae is currently composed of 95 species of fish that occur only in South American freshwater ecosystems, most abundantly in the Amazon basin, where they play ecologic roles that are fundamental for the homeostasis of the ecosystem. In the last decades, several phylogenetic studies based on morphological and molecular markers have corroborated the monophyletic nature of the group, however some divergences remain, mainly in some clades where the traditional taxonomic approach was not enough to diagnose them. In this sense, the present study aims to solve some of these taxonomic problems, using cytogenetic markers associated with DNA barcoding, as well as to propose trends on the karyotype evolution in Doradidae. 15 species of thorny catfishes from different hydrographic systems were analysed. The data were divided in three chapters, each of them exploring the efficiency of karyotype studies for better understand biogeographic, cytotaxonomic and evolutionary issues of Doradidae. Chapter 1 provides information on the characteristics of the species of the subfamily Weitheimerinae: *Wertheimeria maculata*, *Kalyptodoras bahiensis* and *Franciscodoras marmoratus*. The three species had $2n=58$ chromosomes and the same chromosomal formula with differences only in the distribution pattern of rDNA and specially in the arrangement of the heterochromatin blocks. Such microstructural variation seems to be related to the salutatory activity of transposable elements, among which the retrotransposon Rex3 is worth being highlighted. It was also suggested a biogeographic hypothesis to explain the karyotypic diversification of Wertheimerinae, which is based on River catching events in the Espinhaço Complex and provided a dynamic interchange in the ichthyofauna between São Francisco River and the eastern coastal drainage. Chapter 2 deals with cytotaxonomic issues, with emphasis on the genus *Anadoras*, which is the most widely distributed among those allocated in Doradidae, however the genus has only two formally described species: *Anadoras grypus* and *Anadoras wedelli*, and in the present study the taxonomic status of a possible new endemic species from Upper Araguaia River was tested using cytogenetic markers and DNA delimitation algorithms based on DNA barcoding. The chromosome data were efficient only to differentiate *A. grypus* from its congeners, evidencing a remarkable similarity between *A. wedelli* and *Anadoras* sp. “araguaia”. However, DNA barcoding clearly separated the three species, identifying three molecular operational taxonomic units (MOTUs), with high genetic divergence value and supported by Bayesian inferences, Likelihood and by all algorithms of species delimitation. It was also observed a low genetic distance between populations of *A. wedelli* from Upper, Middle Paraguay River and Lower Amazonas, suggesting a low variability among populations geographically distant. Interestingly, the intraspecific distance observed in individuals from the same *A. grypus* population was higher than what was observed in populations from the distant basis of *A. wedelli*, however the value does not support the hypothesis of cryptic species in sympatry in Lake Catalão and suggest that the variation described for the NORs pattern is an intrapopulation polymorphism. In Chapter 3, evolutionary inferences using the Mesquite software were proposed to explain the origin of the current karyotype diversity in Doradidae. In this study, 9 species were analyzed showing a remarkable variation in the diploid number: $2n = 44$ in *Amblydoras nheco*, $2n = 46$ in *Amblydoras affinis*, $2n = 52$ in *Astrodoras asterifrons*, $2n = 58$ in *Platydoras hancockii*,

Pterodoras granulosus, *Centrodoras brachiatus*, *Oxydoras kneri*, *Hemidoras stenopeltis* and $2n = 60$ in *Trachydoras steindachneri*. Cryptic species were identified in *Amblydoras affinis* as well as an unprecedented system of multiple NORs in *P. hancockii*. The reconstruction of the ancestral character corroborated previous studies and estimated $2n=58$ chromosomes and simple terminal NORs in the short arm of subtelocentric as basal, these characteristics remain conserved in different clades of Doradidae, however it also occurs in derived karyotypes due to chromosomal rearrangements (pericentric inversions, Fission and Centric Fusion and translocations) and also by the differential accumulation of heterochromatic.

Key-words: Karyotypes. Citotaxonomy. DNA barcoding. MOTUs. Heterochromatin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Bacias hidrográficas da América do Sul. Figura adaptada a partir de Albert et al. (2016). 25
- Figura 2** - Gráfico de setores evidenciando o número de espécies dos principais grupos de peixes de água doce da América do Sul, baseado no levantamento feito por Reis et al. (2013). Ordem Characiformes (A) *Moenkhausia sanctafilomenae* (B) *Boulengerella* (C) *Salminus brasiliensis*; Ordem Siluriformes (D) *Pterodoras granulosus* (E) *Pseudoplatystoma fasciatum* (F) *Hypostomus* (G) *Brachyplatystoma filamentosum*; Ordem Perciformes- Cichlidae (H) *Symphysodon discus* (I) *Astronotus ocellatus*; Ordem Cyprinodontiformes – Aplocheilidae (J) *Austrolebias*; Ordem Gymnotiformes – Apterontidae (L) *Apterontus*; Lepidosirenidae (M) *Lepidosiren paradoxa*; Ordem Osteoglossiformes (N) *Osteoglossum* (O) *Arapaima gigas*; Ordem Myliobatiformes (P) *Potamotrygon motoro*; Ordem Pleuronectiformes (Q) *Catathyridium*. 28
- Figura 3** - Exemplar de *Platydoras birindelli* (Sousa et al. 2018), em destaque as principais características diagnósticas de Doradidae. Fonte: José Oliván Birindelli..... 35
- Figura 4** - Arvore filogenética mais parcimoniosa da subfamília Astrodoradinae, construída a partir de marcadores morfológicos por Sousa (2010)..... 40
- Figura 5** - Arvore filogenética mais parcimoniosa da família Doradidae, obtida a partir de caracteres morfológicos externos e osteológicos. Fonte: Birindelli (2014). 41
- Figura 6** - Arvore filogenética de Máxima Verossimilhança representando as relações entre os Doradidae a partir de marcadores moleculares: nuclear (Rag1) e mitocondriais (mtDNA 16S e COI). Fonte: Arce et al. (2013).. 42
- Figura 7** - Esquema demonstrando os todos os estudos citogenéticos em Doradidae em ordem cronológica. 43
- Figura 8** - Mapa evidenciando os Locais onde foram coletados os espécimens analisados no presente estudo, com destaque às Bacias hidrográficas a qual pertencem. 57

Figura 9 - Espécies analisadas no presente estudo: [a] *Franciscodoras marmoratus* [b] *Kalyptodoras bahiensis* [c] *Wertheimeria maculata* [d] *Anadoras grypus* [e] *Anadoras weddellii* [f] *Anadoras* sp. “araguaia” [g] *Astrodoras asterifrons* [h] *Amblydoras nheco* [i] *Amblydoras affinis* [j] *Platydoras hancockii* [l] *Pterodoras granulatus* [m] *Trachydoras steindachneri* [n] *Oxydoras niger* [o] *Centrodoras brachiatus* [p] *Tenellus ternetzi* [q] *Hemidoras stenopeltis* [r] *Ossancora punctata*.
Fontes: Sousa (2010); José Olivan Birindelli (arquivo pessoal); Queiroz et al. (2013); Capítulo 3 do livro Peixes do Rio do rio Madeira 58

Figura 10 - Gel de Agarose 1% após eletroforese evidenciando as bandas de aproximadamente 600pb contendo os fragmentos do gene COI das três espécies de *Anadoras*. 66

CAPITULO 1

Figure 1 - Topographic map showing the São Francisco basin and the Brazilian eastern coastal drainages. The circles indicate the collection sites of *W. maculata* from Pardo River (red circle), *K. bahiensis* from Paraguaçu River (pink circle) and *F. marmoratus* from São Francisco River (yellow circles). The Espinhaço Complex is highlighted between these two hydrographical basins and its geomorphological transformations at over the thousands years influenced the current ichthyofaunistic composition of these adjacent watershed. The red squares are indicating regions where headwater stream-captures have already been recorded..... 86

Figure 2 - Karyotypes of Wertheimerinae species evidenced the conservation of diploid numbers and karyotypic formulae in contrast with divergences in heterochromatin distribution: *W. maculata* (a) Giemsa staining (b) C-banding; *K. bahiensis* (c) Giemsa staining (d) C-banding; *F. marmoratus* (e) Giemsa staining (f) C-banding. The boxes contain the chromosome pairs bearing the 18S (green signals) and 5S (red/pink signals) rDNA sites. 90

- Figure 3** - Metaphasis of Wertheimerinae species after FISH with *Rex3* retrotransposon (a) *W. maculata* (b) *K. bahiensis* (c) *F. marmoratus*. The arrows indicate the pair bearing the NORs bearing chromosomes which in both species shows homology to the *Rex3* retrotransposon. The boxes show some pairs with heterochromatic blocks with partial overlap with *Rex3* retrotransposon, suggesting the existence of the other repetitive DNAs types in these sites..... 90
- Figure 4** - Similarity dendrogram based on Eucldean distances constructed from 40 cytogenetic characters of Wertheimerinae species and two outgroups: *Anadoras* sp. “araguaia” and *Platydoras armatulus*. 91

CAPITULO 2

- Figure 1** - Topographic map showing the localities where the *Anadoras* species was collected. *Anadora grypus* was collected in Catalão Lake, in Central Amazon basin (Pink square); *Anadoras* sp. “araguaia” was collected in a marginal Lagoon near to Medo stream a small tributarie of Araguaia river (Red square); *Anadoras weddellii* was collected in two different points in Paraguay river basin: marginal lagoon of Cuiaba river (Gray square) and in marginal lagoons of Miranda river (Black square). 92
- Figure 2** - *Anadoras* species here analyzed and the mainly diagnostic morphological features. [A]=*A. grypus*; [B]= *A. weddeellii*; [C]=*Anadoras* sp. “araguaia”. FONTE: Sousa (2010) unpublished data..... 115
- Figure 3** - Karyotypes of *Anadoras* species after conventional and molecular cytogenetics analyzis: *A. weddellii* (a) Giemsa staining (b) C-banding (c) FISH with rDNAs probes; *Anadoras* sp. “araguaia” (d) Giemsa staining (e) C-banding (f) FISH with rDNAs probes; *A. grypus* (g) Giemsa staining (h) C-banding (i) (j) FISH with rDNAs probes, note the presence of two patterns of rDNAs, named **A** (only two sites of 18S rDNAs on short arm of pair 11) and **B** (Multiple sites of 18S rDNA). The scale bar corresponds at 10 µm. 116

- Figure 4 -** Metaphasis of *Anadoras* species: **(a)** after double FISH with 18S (green signals) and 5S (pink signals) rDNAs probes showing the association between chromomes 11 and 28 in metaphasis and nucleus of *Anadoras grypus* **(b)** after Ag-NORs evidencing transcriptional activity in all NORs sites of *Anadoras grypus*; **(c)** Fiber-FISH with 18S (green) and 5S (red) rDNAs probes shows the adjascent organization on short arm of pair 11 and **(d)** the absence of 5S rDNA sites on chromosome 28; FISH with telomeric [TTAGGG]_n in metaphasis of **(e)** *A. weddellii* and **(f)** *A. grypus*, **(g)** *Anadoras* sp. “araguaia”. The scale bar corresponds at 10 μm. 123
- Figure 5 -** Similarity dendrogram based on Eucllydean distances constructed from 25 cytogenetic characters of *Anadoras* species. The colors means: Green=18S rDNA; Red=5S rDNA; Yellow=Heterochromatin; Black=Centromeres. The black squares indicates only some cytogenetic characters used for construction of this dendrogram. 124
- Figure 6 -** Consensus tree (NJ neighbor-joining, ML maximum likelihood and BI Bayesian inference) based on COI sequences from samples of *Anadoras weddelli*, *A. grypus*, *Anadoras* sp. “araguaia” and related species *W. maculata* and *P. armatulus*. Only bootstrap (NJ, ML) and a posteriori probability (BI) values above 80% and 0.9, respectively, are shown on branches. The vertical bars indicate the results from the species delimitation analyses. 126

CAPITULO 3

- Figure 1 -** Karyotypes of Astrodoradinae subfamily species: after Giemsa staining, C banding and FISH with 18S, 5S rDNA and Telomeric probes. The scale bar corresponds at 10μm. 154
- Figure 2 -** Karyotypes of Doradinae subfamily “Large thorny catfishes clade”: after Giemsa staining, C banding and FISH with 18S, 5S rDNA and Telomeric probes. The scale bar corresponds at 10μm. 156
- Figure 3 -** Karyotypes of Doradinae subfamily “Fimbriate barbells thorny catfishes clade”: after Giemsa staining, C banding and FISH with 18S, 5S rDNA and Telomeric probes. The scale bar corresponds at 10μm. 157

- Figure 4 -** Reconstruction of the ancestral diploid number using the Mesquite software, based in cytogenetic data available for Doradidae species (including the present work) and two Auchenipteridae species (sister group) integrated with the Molecular phylogeny of Arce et al., (2013). 159
- Figure 5 -** Reconstruction of the ancestral NORs patterns, using the Mesquite software, based in cytogenetic data available for Doradidae species (including the present work) and two Auchenipteridae species (sister group) integrated with the Molecular phylogeny of Arce et al., (2013). 160

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Cytogenetic data available for the Neotropical freshwater thorny catfishes of Doradidae Family, based only in Original articles.....	48
Tabela 2 - Informações sobre as espécies, Local de coleta e Vouchers em Coleções Ictiológicas.....	59

CAPITULO 2

Table 1 - Matrix of characters constructed from cytogenetic markers (chromosome quantity and morphology, heterochromatin distribution and 18S rDNA and 5S rDNA patterns). These dataset was used for construction of the similarity dendrogram based on Euclidean distance.....	106
Table 2 - Collection sites, cytogenetic and morphological identification codes and accession number sequences of mtDNA COI in Genbank of <i>Anadoras</i> specimens here analyzed.	134
Table 3 - Kimura's Two-Parameters Model Genetic Distance among populations of <i>Anadoras grypus</i> , <i>Anadoras weddellii</i> and <i>Anadoras</i> sp. "araguaia" from different South American hydrographic basins.	135

CAPITULO 3

Table 1 - Cytogenetic data available for the Neotropical freshwater Doradoidea Superfamily (Doradidae + Auchenipteridae).	134
Table 2 - Information about the species, collection sites and Vouchers in Ichthyological Collections.....	170
Table 3 - Probabilistic values calculated by Mesquite software for estimated the ancestral diploid number of Doradidae.	173
Table 4 - Probabilistic values calculated by Mesquite software for estimated the ancestor NORs pattern of Doradidae.	174

SUMARIO

INTRODUÇÃO	21
1 Fundamentação Teórica	
1.1 A América do Sul e sua diversidade ictiofaunística em águas continentais	24
1.2 Características gerais e composição ictiofaunística das principais bacias hidrográficas do Brasil	27
1.3 A bacia Amazônica.....	29
1.4 A bacia dos rios Tocantins-Araguaia	31
1.5 A bacia do rio Paraguai	32
1.6 A bacia do rio São Francisco e Atlântico Sul-Leste	33
1.7 A Família Doradidae (Características morfológicas, importância biológica e comercial).....	35
1.8 Relações Filogenéticas em Doradidae: um breve histórico	38
1.9 Estudos Citogenéticos	43
1.10 DNA Barcoding em peixes: ênfase em grupos dulcícolas neotropicais	51
2 OBJETIVOS	
3.1 GERAL	55
3.2 ESPECÍFICOS	55
3 Materiais e Métodos	
3.1 Espécies/Populações analisadas e seus respectivos locais de coleta.....	56
3.2 Análises Citogenéticas.....	61
3.3 Análises Moleculares.....	65
4 Referências Bibliográficas	68

CAPÍTULO 1: “Chromosomal diversity of thorny catfishes (Siluriformes-Doradidae): a case of allopatric speciation among Wertheimerinae species of São Francisco and Brazilian eastern coastal drainages”

Abstract	81
Introduction	82
Material & Methods	85
Results	88
Discussion	92
References	97

CAPÍTULO 2: “Species delimitation of thorny catfishes *Anadoras* (Doradidae-Astrodoradinae): an integrative analysis based on Chromosomal markers and DNA barcoding”

Abstract	111
Introduction	112
Material & Methods	114
Results	120
Discussion	127
References	137

CAPÍTULO 3: “Karyoevolution of thorny catfishes (Siluriformes-Doradidae): a dynamic process based on pericentric inversions, Robertsonian translocations and heterochromatin divergence”

Abstract	147
Introduction	148
Material & Methods	150
Results	152
Discussion	163
References	176

CONSIDERAÇÕES FINAIS	180
-----------------------------------	-----

INTRODUÇÃO

A América do Sul é um centro da biodiversidade ictiofaunística, apenas em águas continentais, 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens foram descritas, representando ao todo mais de 5160 espécies válidas (Reis et al., 2017). Essa incrível biodiversidade reflete a disponibilidade abundante de recursos hídricos, visto que nessa região encontram-se três das maiores bacias hidrográficas do planeta: Amazonas, Orinoco e Platina (Vari & Malabarba, 1998). Anualmente, dezenas de novas espécies de peixes são descritas, porém diferentes atividades antropogênicas vêm causando a extinção de muitas espécies antes mesmo de serem formalmente reconhecidas pela comunidade científica. De acordo com a lista vermelha de da Fauna Brasileira (Rosa & Lima, 2008), 135 espécies de peixes dulcícolas estão em perigo iminente de extinção, principalmente aquelas descritas para as bacias do Atlântico Leste (devido aos impactos causados por atividades urbanas e industriais) e amazônica (construção de represas hidrelétricas e desmatamento decorrente da expansão agrícola).

Diante desse contexto, descrever a biodiversidade é o primeiro passo para protegê-la dessas constantes ameaças. Nesse sentido, durante muito tempo a diferenciação morfológica foi o único critério de escolha para os taxonomistas descreverem e inventariar a biodiversidade ictiofaunística. Contudo, diferenças morfológicas não são sempre causadas pela história evolutiva independente, e grupos isolados reprodutivamente podem ser morfológicamente indistinguíveis, como nos casos de complexos de espécies e espécies crípticas (Piggott et al., 2011; Souza-Shibatta et al., 2013; Prizon et al. 2017; Ussó et al. 2018). Desse modo, a taxonomia precisa ser pluralista e integrar novas abordagens para fornecer um inventário acurado sobre a biodiversidade ictiofaunística de uma determinada região.

A taxonomia integrativa é a abordagem mais eficaz para a descoberta de novos táxons e também para estimar a verdadeira biodiversidade em grupos crípticos, onde a análise

taxonômica tradicional baseada em variações morfológicas e distribuição geográfica não é eficiente (Dayrat, 2005; Pante et al., 2015). Nos últimos anos, diversos tipos de marcadores moleculares, incluindo cromossomos, genes nucleares e mitocondriais, têm sido associados a dados morfológicos, proporcionando uma compreensão mais ampla da biodiversidade e das relações filogenéticas em diferentes peixes neotropicais (Souza-Shibata et al., 2018, Serrano et al., 2018). Por apresentar regiões variáveis o suficiente para analisar grupos taxonomicamente relacionados, o DNA barcoding tem sido usado como uma ferramenta universal para delimitação de espécies (Hebert et al., 2003a; 2003b; 2004a; 2004b). Adicionalmente, novas ferramentas metodológicas nas análises de DNA barcoding disponíveis em plataformas online têm sido incorporados garantindo a melhor confiabilidade dos dados tais como o sistema de BINs, ABGD, PTP e GMYC (Barreto et al., 2015), entre outros. Esse métodos geralmente fornecem resultados congruentes e são eficazes na descoberta de muitas espécies de peixes, principalmente em grupos cuja divergência ocorreu a pouco tempo.

Nos últimos anos, diversos trabalhos tem empregado os dados citogenéticos como ferramenta adicional e complementar aos resultados obtidos com DNA barcoding na taxonomia molecular de diferentes grupos de peixes (Prizon et al., 2017; Ferreira et al., 2017; Usso et al., 2018). As diferenças no cariótipo são capazes de determinar isolamento reprodutivo, seja pela incompatibilidade de gametas ou pelos efeitos sobre a fertilidade, constituindo um evento relevante para o processo de diferenciação entre espécies (Coghlan et al., 2005; Allendorf & Luikart, 2007). Nesse contexto, as análises cariotípicas comparadas, permitem detectar rearranjos cromossômicos relacionados à presença de unidades evolutivas únicas, gerando marcadores para citotaxonomia (Maurutto et al., 2012). Adicionalmente, as análises moleculares baseadas em DNA não podem substituir a análise cromossômica (Allendorf & Luikart, 2007) visto que a citogenética permite analisar a macro-organização do

material nuclear ao passo que a análise do DNA é realizada, em geral, a partir de um ou poucos loci.

Apesar dessas potencialidades e do baixo custo das análises citogenéticas, é notável o aparente descaso dos estudos com cromossomos em projetos de conservação e estudos da biodiversidade. Diante desse contexto, o presente estudo foi desenvolvido com intuito de descrever a variabilidade cariotípica de 15 espécies de Doradidae, dentre as quais estão espécies ameaçadas de extinção, outras com importância comercial e principalmente alguns grupos com problemas taxonômicos. Assim diferentes marcadores cromossômicos foram utilizados visando demonstrar a importância das análises citogenéticas como ferramenta complementar, e que juntamente com o DNA barcoding e programas de reconstrução de caracteres ancestrais pode produzir dados de grande valia para resolver conflitos taxonômicos e compreender alguns processos evolutivos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A América do Sul e sua diversidade ictiofaunística em águas continentais

Os primeiros organismos que podem ser classificados como peixes surgiram durante o período Cambriano, há mais de 500 milhões de anos, desde aquela época até os dias atuais, esse grupo já exibiu uma incomparável diversidade morfológica, fisiológica e comportamental que proporcionou uma rápida e eficiente ocupação dos mais diversos ecossistemas aquáticos do planeta Terra. Atualmente existem mais de 32.000 espécies, vivendo em rios, lagos, estuários, mares e oceanos e que mesmo após sucessivos eventos de mudança climáticas e extinções em massa, ainda são dentre os vertebrados modernos o grupo com maior diversidade (Nelson, 2016).

Os peixes não representam um grupo natural, sendo na realidade uma “escada” filogenética, onde estão alocados os Hyperotreti ou Myxini (peixes-bruxa), Petromyzontoidea (lampréias), Chondrichthyes (tubarões, raias e quimeras), Actinopterygii (peixes com nadadeiras raiadas), Actinistia (celacantos) e os Dipnoi (peixes pulmonados), além de numerosos taxa já extintos. Muitos desses organismos possuem grande relevância econômica, constituindo um importante componente da dieta alimentar do ser humano, sendo inclusive, a base da economia de vários países. Também são apreciados na pesca esportiva, assim como no mercado aquarofílica. Devido a sua tamanha diversidade, algumas espécies têm sido ao longo dos anos extensivamente utilizadas como modelos em trabalhos científicos, visando compreender questões comportamentais, ecológicas, evolutivas, genéticas e fisiológicas (Nelson, 2016).

O continente sul-americano é considerado um centro de megadiversidade ictiofaunística, para se ter uma ideia, apenas em águas continentais, já foram descritas

5160 espécies distribuídas em 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens (Reis et al., 2016). Tamanha riqueza de espécies tem relação direta com o fato de que nessa região estão situados três das maiores bacias hidrográficas do mundo: Amazonas, Orinoco e Platina que juntas descarregam mais de 269.000 m³ de água por segundo no Oceano Atlântico, o que se equipara a mais de 25% de toda água doce superficial do planeta Terra (Vari & Malabarba, 1998). Além dessas três grandes drenagens, existem outras dez bacias hidrográficas ou também denominadas de Ecorregiões dulcícolas mundiais, são elas: Atlântico Leste, Guianas, Magdalena, Maracaibo-Caribe, Atlântico Nordeste, Pacífico Nordeste, Orinoco, Atlântico Sudeste, Cone Sudeste, São Francisco e Titicaca (Abell et al., 2008).



Figura 1 – Bacias hidrográficas da América do Sul. Figura adaptada a partir de Albert et al., (2016).

As bacias hidrográficas sul-americanas são extremamente heterogêneas, em relação as suas características físicas, químicas e estruturais, o que torna possível a existência de uma variedade de habitats, que por sua vez são ocupados por diferentes tipos de peixes. Assim, as espécies se distribuem desde os lagos de alta altitude e corredeiras torrenciais dos

Andes, nas planícies de inundações permanentes e savanas ou estuários que sazonalmente são inundados, em florestas inundadas e canais profundos de grandes rios de terras baixas e até mesmo em canais subterrâneos e cavernas das paisagens cársticas do Escudo Brasileiro (Reis et al., 2016).

De um modo geral, os peixes dulcícolas descritos para a América do Sul são comumente classificados em três grupos: a primeira divisão inclui peixes cuja diversificação ocorreu exclusivamente em ecossistemas continentais é o caso de todos os Ostariophysi, dentre os quais se destacam os Siluriformes (1915 spp.), Characiformes (1700 spp.) e Gymnotiformes (212 spp.) juntamente com mais quatro pequenas famílias de teleósteos, Arapaimidae (3 spp.), Osteoglossidae (2 spp.), Polycentridae (6 spp.) e Lepidosirenidae (1 spp.). O segundo grupo é constituído por peixes que são confinados a habitats de água doce, porém proximamente relacionados à táxons marinhos, como é o caso das famílias Cichlidae (480 spp.), Rivulidae (270 spp.), Cyprinodontidae (59 spp.), Anablepidae (17 spp.) e Poeciliidae (250 spp.). Embora facilmente distinguíveis, esses dois grupos compartilham uma história evolutiva, sendo ambos originados em Gondwana há aproximadamente 145-100 milhões de anos (antecedendo a completa separação da América do Sul) e posteriormente, foram submetidos a radiações evolutivas durante o Paleogene (66 – 23 milhões de anos) (Reis et al., 2013).

A terceira divisão corresponde à uma assembleia contendo 28 famílias de teleósteos e elasmobrânquios marinhos que invadiram os ecossistemas dulcícolas da América do Sul em diferentes momentos. Fazem parte desse grupo as famílias: Atherinidae, Atherinopsidae, Engraulidae (anchovas), Scianidae (corvinas), Anguillidae (enguias), Achiridae (linguados), Gobiidae (caboz), Mugilidae (tainhas), Belonidae (peixe-agulha), Tetraodontidae (baiacus), Clupeidae, Pristigasteridae (sardinhas), Potamotrygonidae (arraias) entre outros (Albert et al., 2011).

A vasta rede hidrográfica da América do Sul como atualmente encontra-se configurada, permitiu o surgimento de uma fauna de peixes rica em espécies com uma grande variedade de adaptações, resultado de um processo evolutivo que se iniciou há mais de 100 milhões de anos, sobre influência de numerosos eventos geológicos e mudanças climáticas (Albert & Reis, 2011). Além disso, o continente sul-americano é a única região da Terra que não sofreu grandes alterações em decorrência do resfriamento ocorrido durante o Cenozoico, da formação de zonas boreais e temperadas em altas latitudes, assim como pela aridificação em latitudes equatoriais, que nas demais regiões do planeta provocaram extinções em massa e rotatividade biótica (Hoorn et al., 2010; Kristiansen et al., 2011; Morley, 2012).

2.2 Características gerais e composição ictiofaunística das principais bacias hidrográficas do Brasil

O território brasileiro é contemplado com a maior rede fluvial do planeta, tanto em volume quanto em extensão. Nela estão os rios Amazonas e a bacia Platina (rios Parana, Paraguai e Uruguai) que são considerados hotspots para descoberta de novas espécies de peixes (Nelson, 2016). Estima-se que a ictiofauna brasileira seja constituída por mais de 2.300 espécies de água doce (Reis et al., 2003), todavia esse valor certamente encontra-se subestimado considerando que somente na última década, dezenas de espécies foram descritas, principalmente devido a incorporação de análises moleculares (DNA barcode) e uma exploração mais intensa em bacias hidrográficas pouco amostradas.

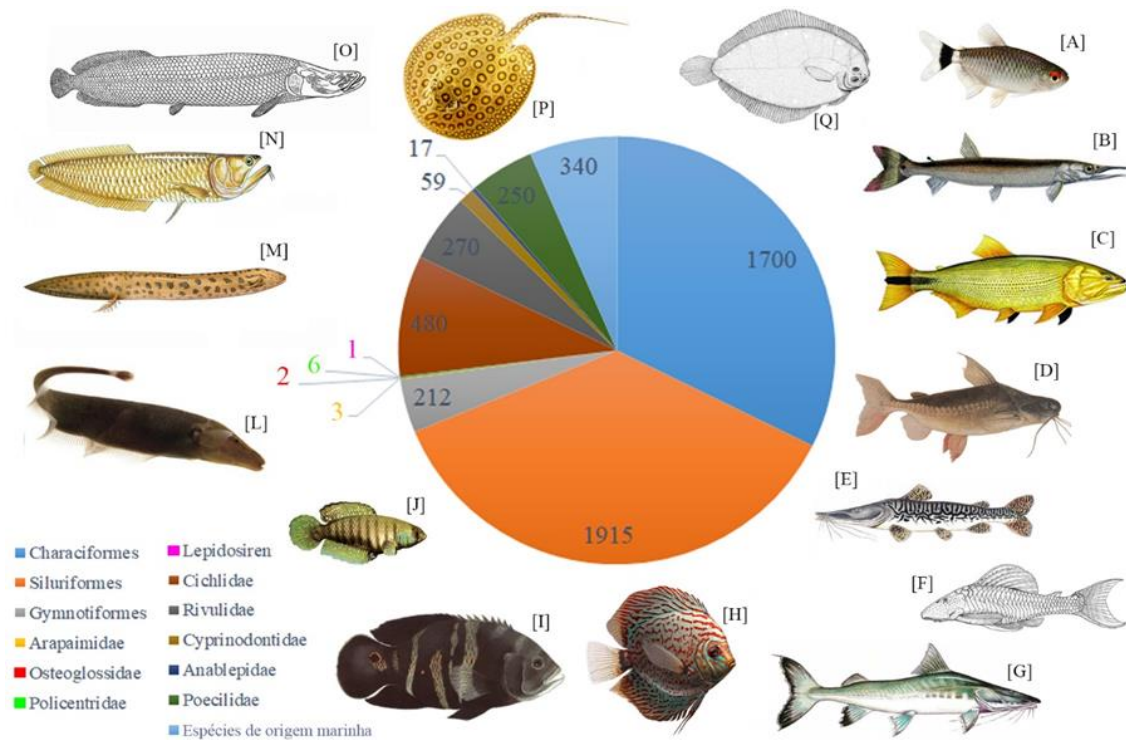


Figura 2 – Gráfico de setores evidenciando o número de espécies dos principais grupos de peixes de água doce da América do Sul, baseado no levantamento feito por Reis et al. (2013). Ordem Characiformes (A) *Moenkhausia sanctaefilomenae* (B) *Boulengerella* (C) *Salminus brasiliensis*; Ordem Siluriformes (D) *Pterodoros granulosus* (E) *Pseudoplatystoma fasciatum* (F) *Hypostomus* (G) *Brachyplatystoma filamentosum*; Ordem Persiformes- Cichlidae (H) *Symphysodon discus* (I) *Astronotus ocellatus*; Ordem Cyprinodontiformes – Aplocheilidae (J) *Austrolebias*; Ordem Gymnotiformes – Apterodontidae (L) *Apterodontus*; Lepidosirenidae (M) *Lepidosiren paradoxa*; Ordem Osteoglossiformes (N) *Osteoglossum* (O) *Arapaima gigas*; Ordem Myliobatiformes (P) *Potamotrygon motoro*; Ordem Pleuronectiformes (Q) *Catathyridium*.

Ao passo que muitas espécies são descritas anualmente no Brasil, outras dezenas são extintas sem ao menos serem descritas ou encontram-se seriamente ameaçadas. Segundo o livro vermelho da Fauna brasileira ameaçada de extinção, 135 espécies de peixes dulcícolas estão sob iminente risco, sendo que a maior parte delas são descritas para as bacias hidrográficas do Atlântico Leste (situada entre a foz do rio São Francisco até os rios costeiros de Santa Catarina) e drenagens amazônicas.

As principais atividades antrópicas responsáveis pelo declínio da biodiversidade ictiofaunística são: a exploração comercial abusiva (principalmente de espécies de grande

porte ou que tem valor no mercado aquarífilista), introdução de espécies exóticas (manejo inadequado de estações de piscicultura), fragmentação ou completa destruição do meio ambiente pelas atividades agrícolas, construção de reservatórios hidrelétricos (favorece a ocupação de espécies lacustres em detrimento das populações originais) e poluição gerada pelos grandes centros urbanos (Reis et al., 2017).

EEAs bacias hidrográficas do Brasil possuem particularidades atribuídas principalmente às características ambientais dominantes, em especial, o índice pluviométrico numa escala temporal e espacial, a história geológica, composição dos solos e a sedimentação (Cunha & Guerra, 1998). Diante de tamanha heterogeneidade, diferentes métodos foram testados visando estabelecer um sistema de classificação para as bacias hidrográficas, sendo que atualmente a divisão mais aceita considera a existência de 8 grandes bacias: Amazônica, Tocantins-Araguaia, São Francisco, Paraguai-Paraná, Uruguai além das pequenas drenagens costeiras do Atlântico Sul subdivididas em porções norte-nordeste, leste e sudeste.

2.3 A bacia Amazônica

A bacia hidrográfica amazônica situa-se na porção norte da América do Sul e abrange o território de nove países: Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia cobrindo uma área que ultrapassa 8,4 milhões de km². Nela encontra-se o rio Amazonas, que possui mais de 6.400 km de extensão desde suas nascentes à 5.500 m de altitude na montanha Nevada Mismi, Cordilheira dos Andes (sul do Peru) até sua foz no oceano Atlântico. Ao longo do seu percurso, o rio Amazonas recebe diferentes nomes, em território peruano é conhecido como Ucayali, Urubamba, Tunguragua, Apurimac e Marañon. Ao ultrapassar as fronteiras do Brasil recebe o nome de Solimões, sendo somente denominado rio Amazonas a partir da confluência com o rio Negro, próximo à Manaus (Van der Sleen & Albert, 2018).

Esse complexo sistema fluvial descarrega toneladas de sedimentos no oceano Atlântico que por sua vez, fornecem nutrientes para sustentar a vida de diversos organismos marinhos, muitos dos quais, atuam diretamente no processo de sequestro de carbono e contribuem para a estabilização do clima da Terra (Subramaniam, 2008). Além disso o rio Amazonas sustenta a maior floresta tropical do planeta, responsável pela produção de cerca de 20% de todo suprimento de oxigênio e também considerada um hotspot de biodiversidade animal e vegetal (Hoorn & Wesselingh, 2010). Em seu vasto e heterogêneo território já foram descritas 11.200 espécies de árvores, 7.500 borboletas, 1.500 pássaros (Hubbell et al., 2008) além de mais de 3.000 espécies de peixes (Van der Sleen & Albert, 2018).

Diversos fatores podem ser elencados no intuito de justificar a atual biodiversidade ictiofaunística descrita em rios amazônicos, entretanto a abundância e disponibilidade de diferentes tipos de recursos alimentares, certamente é um fator diretamente relacionado a tamanha diversificação. De acordo com Carvalho et al., (2007), a ictiofauna da Amazônia explora uma ampla variedade de alimentos, contudo a disponibilidade desses recursos variam acentuadamente devido às fortes oscilações sazonais (períodos de cheia e seca) o que tornou necessário o desenvolvimento de estratégias de alimentação diversificadas. Devido à essas variações, nos rios amazônicos predominam espécies com hábitos alimentares generalistas e oportunistas, no entanto, alguns grupos especialistas, como os candirus que se alimentam de sangue e os peixes que se alimentam de escamas, não dependem de recursos alimentares derivados do plâncton ou de cadeias alimentares baseadas em detritos, ou das florestas ribeirinhas.

A diversidade de peixes na Amazônia também reflete, em grande parte, a heterogeneidade dos ambientes aquáticos disponíveis. Nesse sentido de acordo com a composição química das águas (pH, coloração, transparência e condutância elétrica), os ecossistemas fluviais amazônicos são tradicionalmente divididos em três tipos: (a) **Rios de**

Agua branca, tem sua origem na Cordilheira dos Andes e transportam uma grande quantidade de sedimentos ricos em nutrientes, o que confere um pH neutro, alta turbidez e condutividade elétrica em torno de $40 - 140 \mu\text{S cm}^{-1}$, nessa categoria se enquadram os rios: Juruá, Japurá, Purus e Madeira. (b) **Rios de Agua Negra**, como é o caso do rio Negro, drenam o escudo cristalino Pré-cambriano da Guiana, suas águas são escuras e com pH levemente ácido (em torno de 4-5) o que tem relação direta com a presença de elevada quantidade de ácidos húmicos que dão à água uma coloração marrom-avermelhada. (c) **Rios de Agua Clara**, tais como os rios Tapajós e Xingú que drenam as regiões do cerrado e escudo arcaico centro-brasileiro. Esses rios tem como característica principal águas esverdeadas e com elevado nível de transparência (superior a 150 cm), pH em torno de 6 – 7, baixa condutividade devido às baixas quantidades de sedimentos e sólidos dissolvidos (Sioli, 1968; 1991; Villamizar et al., 2014).

2.4 A bacia dos rios Tocantins-Araguaia

A bacia hidrográfica do rio Tocantins-Araguaia drena uma área de aproximadamente 767.000 km^2 (Mérona et al., 2010), com suas principais nascentes situadas na região central do Brasil nos estados de Mato Grosso e Goiás seguindo um fluxo em direção ao norte até desaguar no delta da baía da Ilha de Marajó, no estado do Pará (Santos et al., 2004). A ictiofauna desse vasto sistema hidrográfico é bastante semelhante aquela descrita nas demais bacias amazônicas, especialmente nas porções mais baixas próximas a sua foz (Goulding et al., 2003), porém essa bacia se destaca por conter um elevado número de espécies endêmicas, principalmente em suas porções mais altas, próximas às suas nascentes (Santos et al., 2004; Bertaco et al., 2011, Claro & Shibatta, 2013).

O sistema do rio Araguaia é de acordo com Lowe-McConnell, (1999), um complexo mosaico de ambientes lacustres e lóticos que devido à essa acentuada diversidade abrigam uma ictiofauna bastante rica, sendo a maior parte dela constituída por espécies endêmicas. O rio Araguaia, assim como, uma grande parcela da bacia do Tocantins-Araguaia encontram-se inseridos no bioma Cerrado, que embora seja um hotspot de biodiversidade, é considerado um dos 25 biomas mais ameaçados do nosso planeta (Mittermeier et al., 1999). As principais atividades antropogênicas responsáveis pelo declínio da biodiversidade ictiofaunística nessa bacia são: devastação da vegetação ripária devido atividades agropecuárias, expansão das fronteiras agrícolas gerando aumento no desmatamento e derrubada de matas ciliares, mineração, introdução de espécies exóticas e obviamente construção de usinas hidrelétricas (Ferreira & Tokarski 2007; Agostinho et al., 2009).

2.5 A bacia do rio Paraguai

O rio Paraguai é um dos três grandes afluentes do Rio de La Plata, juntamente com o Paraná e o Uruguai. Esse complexo sistema fluvial drena a parte central do continente sulamericano, abrangendo uma vasta área com cerca de 1.1 milhões de km², que se inicia nas suas cabeceiras no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina até sua confluência com o rio Paraná no norte de Corrientes onde dá início ao rio da Prata, cuja foz é no Oceano Atlântico (Carvalho & Albert, 2011).

A bacia do Alto rio Paraguai engloba uma complexa rede de rios caudalosos e profundos associados à sistemas lacunares que podem ser intermitentes ou temporários. Nesse sentido a drenagem do rio Paraguai pode ser classificada em duas regiões distintas: uma vasta planície de inundação (uma das maiores do mundo com cerca de 140.000 km²) conhecida como Pantanal; e uma região platô, constituída de áreas com altitudes superiores a

200 m, abrangendo aproximadamente 223,500 km² (Silva & Abdon, 1998). Estas duas regiões exibem características estruturais e geomorfológicas particulares, entretanto são ainda muito interdependentes pois os principais rios que formam o Pantanal tem suas cabeceiras nas regiões mais elevadas próximas ao escudo cristalino brasileiro (Teresa et al., 2010).

Aproximadamente 309 espécies de peixes foram identificadas na bacia do rio Paraguai, sendo predominantemente constituída por membros das ordens Characiformes e Siluriformes (Ferreira et al., 2017). De acordo com Carvalho & Albert, (2011), a origem da ictiofauna atual da bacia do rio Paraguai tem relação direta com o período de intensas modificações geomorfológicas que ocorreram na Cordilheira dos Andes. Esses movimentos orogênicos, possibilitaram o intercâmbio de ictiofauna dessa bacia com outras adjacentes, como é o caso dos rios Mamoré, Tapajós, Madeira e Tocantins-Araguaia. Sendo assim, a atual fauna de peixes reportada para essa bacia contém muitos grupos de origem amazônica, que em diferentes momentos, migraram de afluentes das bacias adjacentes por meio de eventos de vicariância ou geodispersão.

2.6 A bacia do Rio São Francisco e Atlântico Sul – Leste

O rio São Francisco possui uma área de drenagem com aproximadamente 2.756 km abrangendo os estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe. Sua bacia hidrográfica exibe uma ampla heterogeneidade de ambientes, incluindo: áreas de cachoeira, planícies alagadas, lagoas marginais e regiões estuarinas, além de uma infinidade de poças intermitentes ao longo do seu leito, o que lhe confere uma rica e diversificada ictiofauna, constituída por cerca de 400 espécies, muitas delas endêmicas (Barbosa et al., 2017).

A bacia do Atlântico Leste brasileiro é um hotspot de biodiversidade de peixes, com mais de 190 espécies descritas para esta região; entre eles, uma parcela considerável é

endêmica (Ribeiro, 2006). Esta bacia hidrográfica é composta por vinte e cinco drenagens independentes (geograficamente isoladas), incluindo grandes rios, como é o caso de Paraguaçu, Contas, Jequitinhonha e Doce, além de sistemas hidrográficos menores (Pardo, Una, Mucuri e São Mateus) (Camelier & Zanata, 2015). A ictiofauna atual descrita para essa bacia hidrográfica é originária de um complexo processo influenciado por trocas entre rios de escudos cristalinos de terras altas adjacentes (Rosa et al. al., 2004; Ribeiro, 2006; Buckup et al., 2011; Camelier & Zanata 2015), associado às mudanças no nível do mar (transgressões e regressões marinhas) ocorridas durante o Pleistoceno Superior (Weitzman et al., 1988).

Os sistemas hidrográficos do rio São Francisco e as drenagens costeiras do Leste possuem uma estreita relação, no tocante a origem de sua biodiversidade ictiofaunística. Essas bacias atualmente encontram-se isoladas devido a vasta cadeia de montanhas que compõe a Serra do Espinhaço, entretanto em diferentes períodos geológicos alterações estruturais proporcionaram o intercâmbio entre a fauna de peixes dessas duas bacias, por meio de eventos de captura de cabeceira (Ribeiro, 2006).

2.7 A Família Doradidae (Características morfológicas, importância biológica e comercial).

Morfologicamente, os peixes que pertencem à família Doradidae podem ser facilmente distinguidos dos demais Siluriformes. Sendo que as principais características diagnósticas são: (1) presença do escudo infranucal, formado a partir de um ligamento ossificado entre a placa nucal posterior e a costela da sexta vértebra; (2) presença de um ligamento entre o ramo de Muller e os escudos timpânicos; e (3) hipertrofia da ossificação dos túbulos da linha lateral formando uma fileira de escudos laterais cada qual contendo um ou mais espinhos retrorsos (Birindelli, 2014).

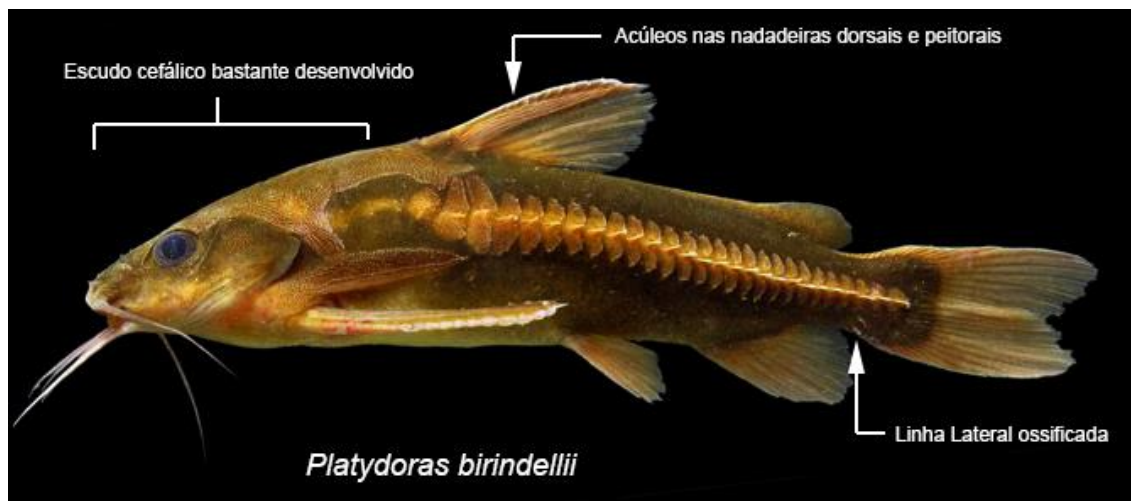


Figura 3 - Exemplar de *Platydoras birindelli* (Sousa et al. 2018), em destaque as principais características diagnósticas de Doradidae. FONTE: José Oliven Birindelli.

A maioria dos estudos sobre características biológicas da família Doradidae foram realizados visando descrever os hábitos alimentares. Desse modo, a dieta desse grupo de peixes é bastante diversificada, sendo que, a maioria das espécies já estudadas é onívora, se alimentando desde microalgas e vegetais até pequenos invertebrados aquáticos (larvas de insetos, ácaros, nematódeos e protozoários), moluscos e crustáceos (Sabaj & Ferraris, 2003; Sabaj et al., 2005; Fugi et al., 2007; Agostinho et al., 2009). Dentre os doradídeos onívoros, *Pterodoras granulosus* se destaca por acumular o maior número de estudos. De acordo com Catanhêde et al., (2007), essa espécie além de ocupar um vasto território geográfico, tem papel fundamental no controle biológico do mexilhão-dourado (*Curbicola fluminea*), um molusco de origem asiática que é considerado uma espécie invasora que vem causando uma série de desequilíbrios ambientais no reservatório hidrelétrico de Itaipu.

Outro aspecto ecológico associado ao hábito alimentar de alguns doradídeos é a capacidade de auxiliar na dispersão de sementes de determinados grupos vegetais. A ictiocoria é um processo fundamental para alguns tipos de plantas, visto que este é o único modo de colonizar novos habitats e também de minimizar os efeitos da competição ou de predação. Essa atividade dispersora é realizada principalmente por doradídeos especializados

no consumo de frutas, folhas e sementes, sendo que já foi comprovada nas espécies *Lithodoras dorsalis*, *Megalodoras uranoscopus* e *Pterodoras granulosus* (Barbosa, 2012).

Informações referentes ao comportamento reprodutivo são ainda mais raras. De acordo com Agostinho et al., (2003), algumas espécies, principalmente as de grande porte realizam a piracema, ou seja, são capazes de migrar longas distâncias para se reproduzirem. Essas espécies geralmente possuem fecundação externa e não tem cuidado parental. Contudo, a maioria dos pequenos doradídeos é sedentária e protegem sua prole desde o nascimento até atingirem um estágio maduro. Segundo relatos de alguns aquarofilistas, algumas espécies também são capazes de construir ninhos durante o período de reprodução (Burguess, 1989).

Os membros da família Doradidae ocupam uma vasta gama de habitats e já foram descritos em praticamente todos os sistemas hidrográficos da América do Sul (Birindelli & Sabaj Pérez 2011). Apesar de possuir ampla distribuição geográfica, a maior parte (cerca de 70%) é exclusiva da bacia Amazônica que é um ecossistema caracterizado por uma enorme variedade de habitats e também por ser bastante estável do ponto de vista climático. Além disso, os doradídeos tem uma preferência em ocupar áreas mais baixas, principalmente em planícies de inundação que são muito comuns na bacia Amazônica e são caracterizadas por um ritmo sazonal marcante, que contribui para uma grande disponibilidade de recursos alimentares durante todo ano (Birindelli & Sousa, 2010).

Além da bacia Amazônica, os doradídeos também são importantes componentes ictiofaunísticos da bacia Platina, principalmente nos rios Paraná e Paraguai. Nesses sistemas já foi registrada a ocorrência das espécies: *Anadoras weddellii*, *Amblydoras nheco*, *Platydoras armatulus*, *Rhinodoras dorbignyi*, *Pterodoras granulosus*, *Trachydoras paraguayensis*, *Oxydoras kneri*, *Ossancora punctata* e *Ossancora eigenmanni*. Esses peixes habitam

preferencialmente ambientes de várzea, sendo frequentemente capturada em planícies de inundação (Zawadzki et al., 1996; Britskii, 2007).

É interessante ressaltar a presença de doradídeos endêmicos de bacias costeiras do nordeste e sudeste do Brasil. Dentre elas podemos destacar *Franciscodoras marmoratus*, *Wertheimeria maculata* e *Kalyptodoras bahiensis* que são encontrados somente nos rios São Francisco, Jequitinhonha e Paraguaçu, respectivamente. Tais espécies são filogeneticamente muito importantes para a compreensão da história evolutiva e biogeográfica de Doradidae, pois ocupam uma posição basal dentre os demais táxons dessa família. Segundo Birindelli, (2010), a elevação da Serra do Mar no final do Cretáceo (75-95 milhões de anos) provavelmente foi o evento responsável pela cladogênese e consequente isolamento geográfico observado entre essas espécies basais (clado Wertheimerinae) das demais linhagens de doradídeos.

Apesar da grande maioria das espécies de Doradidae ocuparem bacias hidrográficas cis-Andinas, existem também alguns táxons endêmicos do rio Magdalena e do Lago Maracaibo, como é o caso de *Rhinodoras thomersoni*, *Centrochir crocodili* e *Doraops zuloagai*. Todas essas espécies trans-andinas estão relacionadas com gêneros amplamente distribuídos pela bacia amazônica, o que evidencia uma possível conexão pretérita entre esses diferentes sistemas hidrográficos. De acordo com Birindelli, (2010), a cladogênese desses táxons deve ter acontecido entre 8 a 11.8 milhões de anos, visto que esta é a idade da formação dessas bacias transandinas, cuja origem tem relação direta com os processos geomorfológicos responsáveis pela elevação do norte da Cordilheira dos Andes.

2.8 Relações filogenéticas em Doradidae: um breve histórico.

Nas últimas décadas a família Doradidae passou por diversas revisões filogenéticas fundamentadas em caracteres morfológicos (Higuchi, 1992; Birindelli, 2006,

Birindelli, 2010; Sabaj, 2002, Sousa, 2010) e também mais recentemente, em dados moleculares obtidos por meio de sequências de genes nucleares e mitocondriais (Moyer et al., 2004; Arce et al., 2013). Todas essas filogenias confirmam o caráter monofilético desse grupo, permanecendo apenas algumas divergências, quanto ao agrupamento, posicionamento e monofiletismo de determinados gêneros.

Baseando-se na análise de 311 caracteres morfológicos, Birindelli, (2014) propôs a hipótese filogenética mais atual e aceita para Doradidae. A partir dessa análise, foi descrita uma nova subfamília denominada Wertheimerinae (*Wertheimeria* + *Kalyptodoras*) considerada o clado basal e grupo-irmão dos demais doradídeos, incluindo o gênero monotípico *Franciscodoras* (incertae sedis) e as subfamílias Astrodoradinae (*Amblyodoras*, *Anadoras*, *Astrodoras*, *Hypodoras*, *Merodoras*, *Physopyxys*, *Scorpiodoras*, *Agamyxis* e *Achantodoras*) e Doradinae (*Platyodoras*, *Centrochir*, *Pterodoras*, *Lithodoras*, *Doraops*, *Megalodoras*, *Centroodoras*, *Rhyncodoras*, *Orinocodoras*, *Rhinodoras*, *Oxyodoras*, *Petalodoras*, *Trachydoras*, *Doras*, *Hemidoras*, *Nemadoras*, *Hassar*, *Anduzedoras*, *Leptodoras*, *Ossancora* e *Tenellus*).

Arce et al., (2013), propuseram uma filogenia molecular para investigar o relacionamento entre os diferentes táxons da família Doradidae, utilizando sequências completas de genes mitocondriais (DNAr 16S, DNAr 12S e subunidade 1 da Citocromo Oxidase C) e do gene nuclear RAG 1 (Recombination activating gene 1). Nessa análise foram incluídos todos os gêneros da família Doradidae, além de espécies de Auchenipteridae e Aspredinidae (grupo externo). Os resultados obtidos corroboram a hipótese de Sullivan et al. (2006), onde o clado Doradídea (Doradidae + Auchenipteridae) compartilha um conjunto maior de similaridades com membros da Família Aspredinidae (cascudos-banjos). Tais autores também definiram a subfamília Astrodoradinae (sem *Acanthodoras* e *Agamyxis*) como

sendo o grupo basal de Doradidae seguido pelo clado Wertheimeria (*Wertheimeria* + *Kalyptodoras* + *Franciscodoras*).

Algumas hipóteses de relacionamento intergenéricas e interespecíficas permanecem contrastantes quando são comparadas as filogenias morfológicas e moleculares. Algumas delas merecem destaque, como é o caso da: 1) indefinição quanto ao clado basal de Doradidae (Wertheimerinae ou Astrodoradinae); 2) não monofiletismo do gênero *Ossancora* (sendo *O. punctata* uma espécie com posição incerta e não relacionada com *O. eigenmanni* + *O. asterophysa* + *O. fimbriata*); 3) complexidade taxonômica existente no gênero *Amblydoras*. Enfim muitas outras questões, além destas, ainda permanecem sem uma resposta adequada, dessa forma uma boa alternativa para buscar o esclarecimento desses problemas taxonômicos seria a utilização de marcadores citogenéticos associados a outras análises moleculares, como é o caso do DNA barcoding.

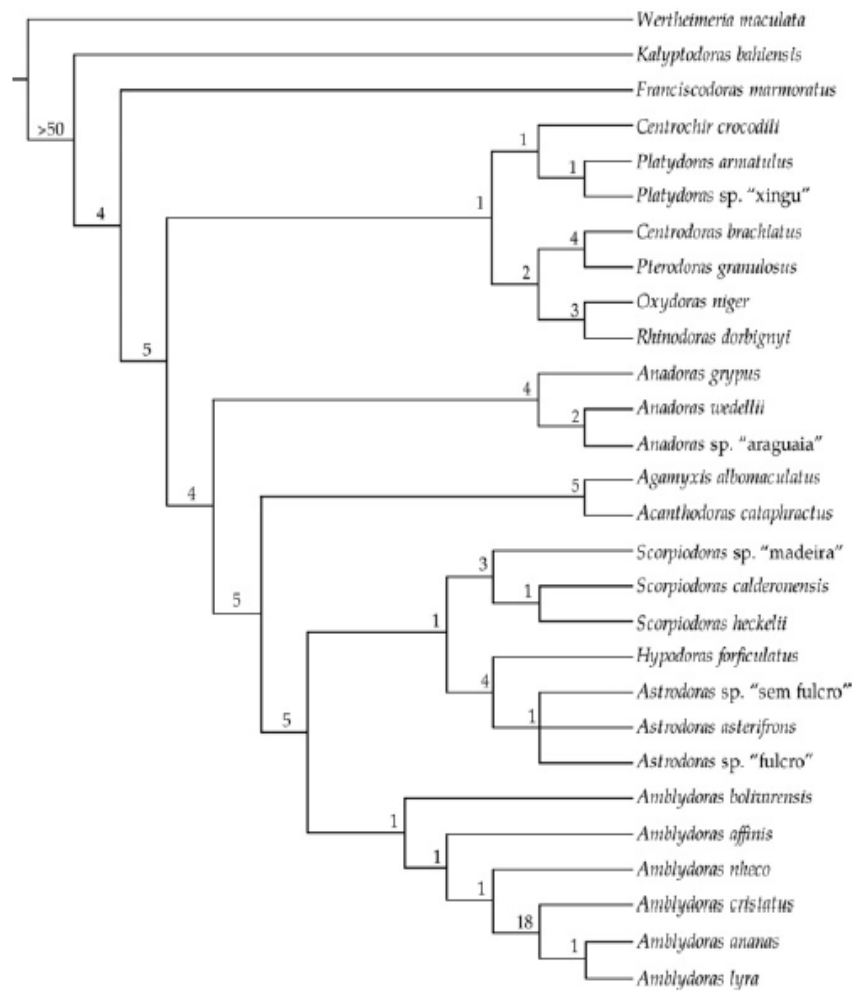


Figura 4 -Arvore filogenética mais parcimoniosa da subfamília Astrodoradinae, construída a partir de marcadores morfológicos por Sousa, (2010).

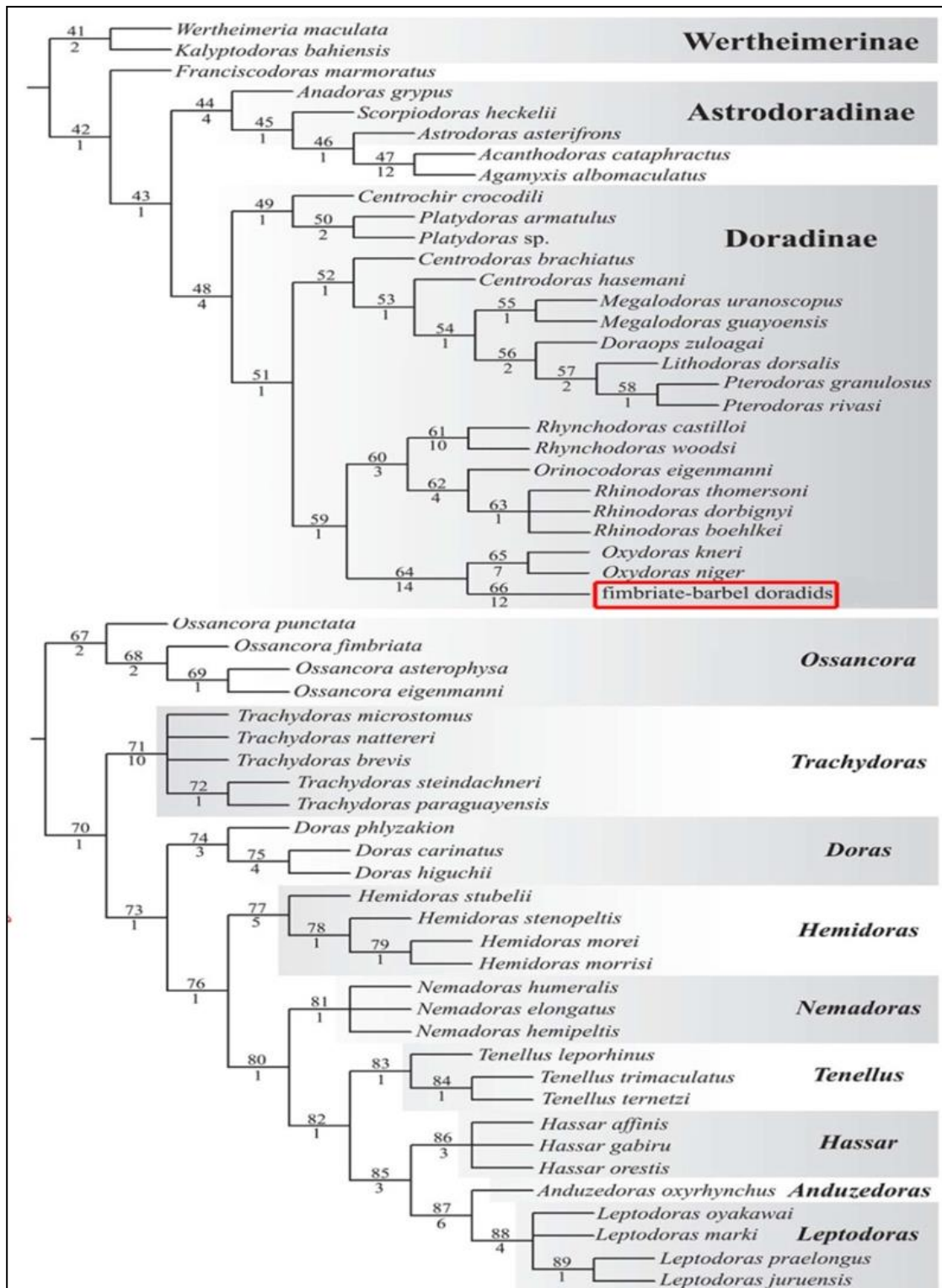


Figura 5 -Arvore filogenética mais parcimoniosa da família Doradidae, obtida a partir de caracteres morfológicos externos e osteológicos. Fonte: Birindelli, (2014).

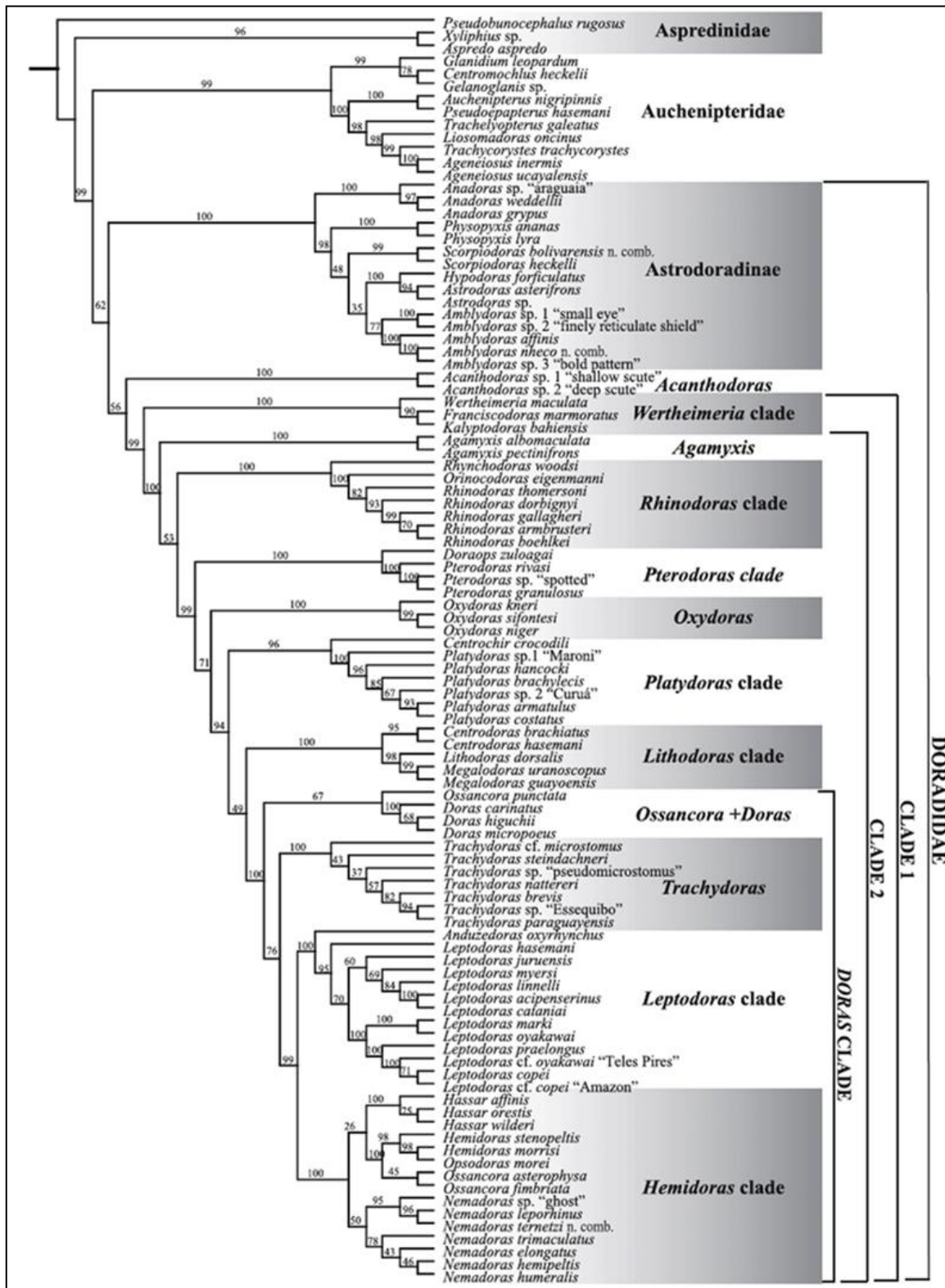
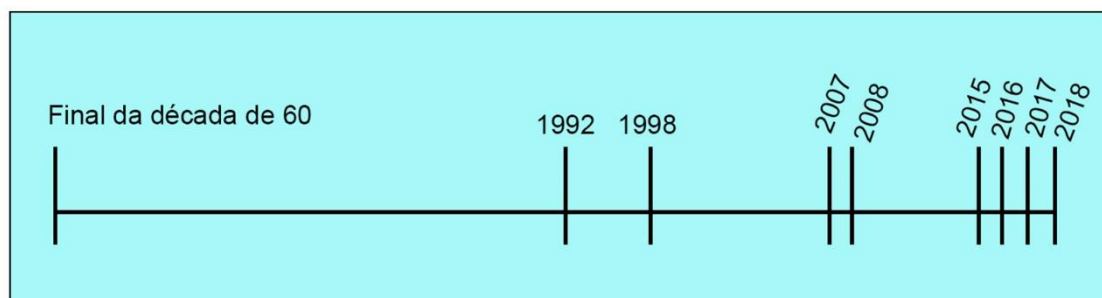


Figura 6 - Arvore filogenética de Máxima Verossimilhança representando as relações entre os Doradidae a partir de marcadores moleculares: nuclear (Rag1) e mitocondriais (mtDNA 16S e COI). Fonte: Arce et al., (2013).

2.9 Estudos Citogenéticos.

A história das análises cromossômicas em Doradidae pode ser dividida em dois momentos, Num primeiro instante, tais estudos baseados somente em técnicas convencionais,

evidenciaram pouca variação na quantidade e morfologia dos cromossomos, de modo que, a maioria das espécies portavam $2n=58$, sendo que apenas *Trachydoras paraguayensis* apresentou 56 cromossomos (Fenocchio et al., 1993). Essa baixa variabilidade sustentou durante muito tempo a hipótese de que esses peixes, embora amplamente distribuído pela América do Sul, seguiam um modelo de evolução cariotípica conservado (Eler et al., 2007; Milhomen et al., 2008).



- Final da década de 60: Primeiros estudos citogenéticos em Peixes no Brasil
- Fenocchio et al. (1992): Primeiras informações cariotípicas em Doradidae
- Venere (1998): Tese com espécies do Rio Araguaia
- Eler et al. (2007): Hipóteses do Cariótipo Ancestral e da Heterocromatina.
- Milhomen et al. (2008): Hipótese da Evolução Cromossômica Conservativa
- Baumgartner (2015) & Takagui (2015): Hipótese da Evolução Cromossômica Divergente
- Baumgartner et al. (2016): Primeiro mapeamento físico dos sítios de DNAr 18S/5S
- Takagui et al. (2017a; 2017b): Cromossomos supranumerários e Sexuais ZW
- Baumgartner et al. (2018): Plesiomorfias ($2n=58$ /RONs terminais/ DNAr sintênicos) e Citotaxonomia

Figura 7 – Esquema demonstrando os todos os estudos citogenéticos em Doradidae em ordem cronológica.

Essa baixa variabilidade cromossômica provavelmente influenciou no fato de que durante muito tempo, poucos estudos foram conduzidos nesse grupo de peixes, que ficaram de certa forma “esquecidos” pelos citogeneticistas. Entretanto, a partir dos estudos de Takagui et al., (2017a; 2017b) e Baumgartner et al., (2016; 2018), um segundo momento se iniciou, evidenciando uma intensa variabilidade cariotípica principalmente nas espécies da bacia

Platina e do rio Araguaia-Tocantins. Tais estudos foram muito importantes, pois derrubaram o modelo de evolução cromossômica conservativa, que até então era proposto para Doradidae.

Nessa família, embora o $2n=58$ cromossomos ainda permaneça como uma característica predominante e hipoteticamente ancestral (Eler et al., 2007; Takagui et al., 2017a; Baumgartner et al., 2018), algumas espécies exibem variações, principalmente em nível estrutural, com fórmulas cariotípicas divergentes e originadas a partir de inversões pericêntricas. Contudo algumas espécies também exibem cariotipos com alterações numéricas devido a Translocações robertsonianas que atuaram tanto na redução do número diplóide para 56 cromossomos em *T. paraguayensis* e *Anadoras* sp. “araguaia”, quanto na origem do $2n=66$ descrito para *O. punctata*, que até o momento é o maior número diplóide descrito para Doradidae (**Tabela 1**).

Em relação ao padrão de distribuição das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), em todas as espécies de Doradidae esses sítios estão restritos a apenas um par cromossômico (**Tabela 1**). Entretanto existe uma variação em relação à posição dessas regiões, de modo que em *Trachydoras paraguayensis* (Baumgartner et al., 2016; 2018) e *Hassar* sp. (Milhomem et al., 2008) foram observadas RONs intersticiais e nas demais espécies, esses sítios foram detectados terminalmente, podendo estar situado no braço curto, como descrito em *Wertheimeria maculata*, *Hassar wilderi* *Platydoras costatus*, *Hassar orestis*, *Tenellus trimaculatus*, *Leptodoras cataniae*, *Platydoras armatulus*, *Rhinodoras dorbignyi*, *Oxydoras niger*, *Ossancora eigenmanni* e *Ossancora punctata* (Fenocchio et al., 1992; Eler et al., 2007; Milhomem et al., 2008; Takagui et al., 2017b; Baumgartner et al., 2018) ou no braço longo como observado em *Tenellus ternetzi* (Milhomen et al., 2008) e *Tenellus leporhinus* (Takagui et al., 2017b).

Estudos utilizando a FISH para mapear os DNAr 18S e 5S foram realizados apenas em nove espécies, um cenário que torna praticamente impossível delinear tendências

evolutivas a respeito da origem e variabilidade observado na distribuição dessa família multigênica no cariótipo de Doradidae. Porém, pode-se notar que em todas as espécies onde o DNAr 18S foi mapeado, os resultados confirmaram os dados obtidos após a impregnação por nitrato de prata, sem a detecção de sítios adicionais e corroborando a hipótese de que o padrão de NOR simples é uma condição frequente nessa família (**Tabela 1**). Vale ressaltar que em alguns grupos a posição e localização dos sítios de DNAr 18S foi importante para fins citotaxonômicos, sendo eficiente para separar espécies simpátricas como observado por Milhomem et al., (2008) em *Hassar orestis* e *Hassar* sp., assim como entre espécies de *Tenellus* oriundas da bacia do rio Alto Araguaia (Takagui et al., 2017b).

Em relação à distribuição dos sítios de DNAr 5S, as espécies de Doradidae, exibem uma variação numérica e também na posição onde estão situados, sendo possível identificar padrões espécie-específicos. Até o momento o DNAr 5S foi mapeado em oito espécies, sendo que o padrão simples foi detectado em *Tenellus leporhinus*, *Leptodoras cataniae* e *Anadoras* sp. “araguaia” todas com sítios no braço curto de cromossomos submetacêntricos, porém de tamanhos distintos. As exceções a esse padrão simples foram descritas em *Trachydoras paraguayensis* que possui quatro sítios terminais (braço curto e longo) localizados num mesmo par cromossômico e *Rhinodoras dorbignye*, *Ossancora eigenmanni*, *Platyodoras armatulus*, *Tenellus trimaculatus* e *Hassar wilderi* que exibiram sítios múltiplos de DNAr 5S (**Tabela 1**), de modo que cada espécie exibiu um padrão particular, o que credencia esse marcador citogenético como uma eficiente ferramenta para estudos taxonômicos.

As informações relativas à quantidade e localização de heterocromatina são ainda preliminares, tornando praticamente impossível definir qual seria o padrão ancestral de Doradidae. Contudo é notável a ocorrência de uma variabilidade em relação à maneira como as regiões heterocromáticas se dispersaram pelo genoma das espécies dessa família,

possibilitando definir pelo menos quatro padrões diferenciados tanto pela quantidade, quanto pela localização. Alguns espécies exibem pouca heterocromatina, como é o caso de *Anadoras* sp. “araguaia”, *Rhinodoras dorbignyi* (Baumgartner et al., 2018), *Platydoras costatus* (Milhomem et al., 2008) e *P. granulatus* (Takagui et al., 2017b), que exibiram blocos de heterocromatina apenas em alguns centrômeros e coincidentes com as RONS.

No entanto tem sido mais comum relatos de espécies com um alto conteúdo heterocromático, com muitos blocos, situados principalmente em regiões terminais no braço curto. Esse padrão, parece ser uma característica comum, principalmente em espécies de Doradinae situadas em posições mais apicais como é o caso de *Tenellus ternetzi*, *Hassar orestis* (Milhomem et al., 2008), *Hassar wilderi* (Eler et al., 2007), *Tenellus trimaculatus*, *Tenellus leporhinus*, *Leptodoras cataniae* e *Ossancora punctata* (Takagui et al., 2017a; 2017b). De fato os elementos repetitivos que constituem regiões heterocromáticas exibem uma acentuado dinamismo no que diz respeito a sua organização genômica em diferentes peixes neotropicais, e isso se deve a sua rápida taxa de evolução que pode gerar alterações cromossômicas detectáveis até mesmo entre espécies que divergiram recentemente (Hughes & Hawley, 2009). Sendo assim, juntamente com o DNAr 5S, a distribuição das regiões heterocromáticas são excelentes marcadores citotaxonômicos para espécies de Doradidae.

Ainda como parte do espectro de variação cariotípica recém descrita para Doradidae, estão os polimorfismos relacionados à presença de cromossomos supranumerários em *Ossancora punctata*, *Pterodoras granulatus* e *Platydoras armatulus*. Em todos os casos foram descritos microcromossomos originados como resquícios de rearranjos cromossômicos e exibindo baixa frequência em células mitóticas e segregação meiótica tardia (Takagui et al., 2017a). Assim como um intrigante sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Tenellus trimaculatus* hipoteticamente originado a partir de eventos de amplificação de elementos heterocromáticos seguidos de inversões paracêntricas (Takagui et al., 2017b).

As informações citogenéticas disponíveis para a família Doradidae estão restritas basicamente á determinação do número diplóide, fórmulas cariotípicas e bandamentos cromossômicos convencionais (impregnação por nitrato de prata e bandamento C). A hibridização *in situ* para o mapeamento físico de genes ribossômicos 18S e 5S foi realizada em poucas espécies, e isso evidencia a necessidade de ampliar o conhecimento a cerca da organização e distribuição dessa importante família de DNA repetitivo, que juntamente com outras classes (genes de histonas, telômeros, transposons, entre outros) podem contribuir com informações de grande importância para a compreensão dos processos evolutivos que tornaram esses peixes um grupo tão diversificado.

Tabela 1 – Dados citogenéticos disponíveis para a Família Dordadidae, baseada somente em Artigos Originais.

GENERA/ SPECIES	2n	KARYOTYPIC FORMULAE	Ag-NORs	18S rDNA	5S rDNA	REFERENCES
Subfamily Wertheimerinae						
<i>Wertheimeria maculata</i>	58	24m+14sm+8st+12a	Pair 20 (p arm)	-	-	Eler et al. (2007)
Subfamily Astrodoradinae						
<i>Anadoras</i> sp. “araguaia”	56	24m+10sm+8st+14a	Pair 28 (q arm)	Pair 28 (q arm)	Pair 15	Baumgärtner et al. (2018)
Subfamily Doradinae						
<i>Platydoras</i> cf. <i>costatus</i>	58	26m+16sm+4st+2a	Pair 20 (p arm)	-	-	Milhomem et al. (2008)
<i>Platydoras armatulus</i>	58	22m+14sm+18st+4a	-	-	-	Takagui et al. (2017a)
<i>Platydoras armatulus</i>	58	24m+14sm+20st	Pair 25 (p arm)	Pair 25 (p arm)	Pairs 18, 25	Baumgärtner et al. (2018)
<i>Pterodoras granulatus</i>	58	16m +16sm+14st+12a	-	-	-	Takagui et al. (2017a)
<i>Oxydoras niger</i>	58	20m+16sm+8st+14a	Pair 15 (p arm)	-	-	Fenocchio et al. (1993)
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	58	20m+20sm+4st+14a	Pair 16 (p arm)	-	-	Fenocchio et al. (1993)
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	58	18m+16sm+12st+12a	Pair sm (p arm)	-	-	Fenocchio et al. (1993)
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	58	24m+12sm+12st+10a	Pair 24 (p arm)	Pair 24 (p arm)	Pairs 18,24,26	Baumgärtner et al. (2018)
<i>Ossancora punctata</i>	66	12m+8sm+6st+40a	-	-	-	Takagui et al. (2017a)
<i>Ossancora eingenmanni</i>	58	30m+14sm+14st	Pair 17 (p arm)	Pair 17	Pairs 10, 17,23	Baumgärtner et al. (2018)
<i>Trachydoras paraguayensis</i>	56	32m+20sm+4st	sm Pair	-	-	Fenocchio et al. (1993)
<i>Trachydoras paraguayensis</i>	56	36m+16sm+4st	Pair 11 (Interstitial)	Pair 11 (Interstitial)	Pair 22	Baumgärtner et al. (2016)
<i>Tenellus leporhinus</i>	58	36m+18sm+4st	Pair 23 (q arm)	Pair 23	Pair 10	Takagui et al. (2017b)
<i>Tenellus trimaculatus</i> (ZZ/ZW)	58	♀ 21m+18sm+12st+7a ♂ 20m+18sm+12st+8a	Pair 22 (p arm)	Pair 22 (p arm)	Four sites	Takagui et al. (2017b)
<i>Tenellus ternetzi</i>	58	44m+12sm+2 a	Pair 24 (q arm)	-	-	Milhomem et al. (2008)
<i>Hassar orestis</i>	58	32m+20sm+6a	Pair 22 (p arm)	-	-	Milhomem et al. (2008)

<i>Hassar cf. orestis</i>	58	32m+18sm+8a	Pair 20 (p arm)	-	-	Milhomem et al. (2008)
<i>Hassar wilderi</i>	58	32m+16sm+10a	Pair 25 (p arm)	-	-	Eler et al. (2007)
<i>Hassar wilderi</i>	58	26m+20sm+12st	Pair 28 (p arm)	Pair 28 (p arm)	Four sites	Takagui et al. (2017b)
<i>Hassar sp.</i>	58	42m+14sm+2a	Pair 7 (p arm)	-	-	Milhomem et al. (2008)
<i>Leptodoras cataniae</i>	58	24m+16sm+14st+4a	Pair 23 (p arm)	Pair 23 (p arm)	Four sites	Takagui et al. (2017b)

Legenda: 2n= número diplóide; m=metacentrico; sm= submetacentrico; st=subtelocentrico; a=acrocentrico; Ag-NORs= Regiões Organizadoras de Nucléolos detectadas por nitrato de prata; rDNA= Acido desoxiribonucleico Ribossômico; p arm= braço curto; q arm= braço longo.

2.10 DNA barcoding em peixes: ênfase em grupos dulcícolas neotropicais.

Em Genética da Conservação, a resolução de incertezas taxonômicas é imprescindível para delinear unidades de manejo e elaborar estratégias de preservação. Na maior parte dos organismos, isso tem sido solucionado por meio da taxonomia tradicional que delimita as espécies considerando apenas as variações de caracteres morfológicos e padrões de distribuição geográfica. Entretanto essa abordagem nem sempre é eficaz, principalmente na identificação de grupos proximamente relacionados (especiação recente) ou aqueles que são morfológicamente indistinguíveis, sendo então denominados de espécies crípticas (Frankham, 2009). Segundo Bickford et al. (2006) as espécies crípticas são unidades taxonômicas independentes que por serem morfológicamente semelhantes, são consideradas a mesma espécie, mas possuem isolamento reprodutivo e podem ser facilmente distinguidas a partir de análises genéticas.

Diante dessa problemática, os marcadores moleculares surgem como ferramentas de grande valor para a taxonomia, visto que permitem avaliar as relações entre diferentes táxons assim como lança pistas sobre sua história evolutiva. Dentre esses marcadores, o DNA barcoding, que se baseia na variação observada em um curto segmento de 648 nucleotídeos da extremidade 5' do gene mitocondrial que codifica a subunidade I da enzima Citocromo Oxidase C, é atualmente o mais utilizado para identificar grupos com problemas taxonômicos. A escolha desse componente do genoma mitocondrial em detrimento á qualquer outra região gênica do DNA nuclear não foi arbitrária, e teve relação direta com pelo menos quatro fatores: (I) herança uniparental na maioria dos filos animais; (II) elevada taxa de Evolução; (III) ausência de íntrons; (IV) número elevado de cópias por célula (Hebert et al., 2003).

Em peixes, existem poucos estudos visando identificação molecular via DNA barcoding, dentre os quais se destacam: (1) Ward et al. (2005) que analisaram 207 espécies de peixes marinhos da costa australiana discriminando todas elas; (2) Hubert et al. (2008) que

numa amostragem de 190 espécies de peixes provenientes de rios canadenses conseguiram discriminar corretamente 93% do total analisado; (3) Valdez-Moreno et al. (2009) que avaliaram 61 espécies dulcícolas oriundas do México e Guatemala, dentre as quais 93% foram distinguidas; (4) Lara et al. (2010) que identificaram via barcode 96% das 27 espécies de peixes de água doce originários de Cuba; (5) Pereira et al. (2011) que ao investigar 231 espécies neotropicais da bacia do Alto rio Paraná conseguiram caracterizar 99,2% do total amostrado; por fim (6) Waugh (2007) elaborou uma revisão abordando questões relacionadas ao potencial e eficácia do DNA barcoding, nesse estudo foi constatado que para mais de 95% das espécies analisadas a técnica proporcionou grau elevado de resolução taxonômica, principalmente em complexos de espécies crípticas.

Dentre os peixes dulcícolas neotropicais as análises citogenéticas revelaram nos últimos anos vários complexos de espécies, sendo que em alguns deles o DNA barcoding teve um papel crucial para esclarecer as relações taxonômicas. Um bom exemplo disso é a traíra *Hoplias malabaricus*, um complexo de espécies caracterizado por apresentar acentuada variação cromossômica, sendo reportado a existência de oito cariomorfos denominados A,B,C,D,E,F,G e H que por vezes ocorrem em simpatria (Bertollo et al. 2000; Vitorino et al. 2011). Marques et al. (2013) analisaram sete populações dessa espécie provenientes do baixo rio Amazonas sendo todas portadoras do cariótipo C ($2n=40/ 20m + 20sm$), nesse estudo o DNA barcoding revelou seis haplogrupos com grande divergência interpopulacional. Tais resultados indicam que a variabilidade do grupo *H. malabaricus* encontra-se subestimada, visto que em um único cariomorfo (nesse caso o C) foram encontradas diferentes linhagens que provavelmente são novas espécies.

Claro (2013) analisou quatro populações de *Eigenmannia* provenientes da bacia hidrográfica Alto Paraná, situadas no estado de São Paulo. Análises citogenéticas evidenciaram a existência de cinco cariomorfos: $2n=36$ (Santa Albertina), $2n=31/32$ X1X2Y

(Botucatu), $2n=38$ XY (São Miguel Arcanjo), $2n=38$ e $2n=28$ (simpatría no rio Araras). Nesse estudo o DNA barcoding propiciou a separação entre todos esses cariomorfos, sendo que a menor distância genética foi observada entre os indivíduos portadores de $2n=38$ e $2n=38$ XY, indicando um processo de especiação recente. Além disso, esses resultados sugerem uma revisão taxonômica para o gênero *Eigenmannia*, pois á cada vez mais evidente que na região superior do rio Paraná existe pelo menos cinco espécies com características cromossômicas e moleculares distintas.

Utsonomia et al. (2014), utilizaram procedimentos citogenéticos e moleculares visando determinar a delimitação de espécies, bem como, inferir sobre os eventos que promoveram diversificação cariotípica em populações do complexo *Synbranchius marmoratus* (mussum). Os autores encontraram diferentes cariótipos ($2n=42$, $2n=44$ e $2n=46$) e variações microestruturais principalmente no padrão de DNAr 5S. Adicionalmente três genes mitocondriais foram empregados, incluindo o DNA barcoding, revelando taxas de divergências nucleotídicas significativas entre os cariomorfos. Tais resultados sugerem que rearranjos cromossômicos ocorreram independentemente nas distintas linhagens de *S. marmoratus*, resultando no surgimento de variantes cariotípicas de forma não linear em relação aos números diplóides e os haplótipos observados após análise do gene COI I.

Maia (2014) testou a eficiência do DNA barcode para identificação de 94 espécies da subfamília Corydoradinae (Callichthyidae), incluindo grupos com alta complexidade taxonômica como é o caso de *Corydoras aeneus* e *Corydoras nattereri*. Os resultados evidenciaram que para 85% das espécies o DNA barcode foi eficiente, mesmo que tais espécies tenham exibido baixas distâncias genéticas (cerca de 30 vezes menor que a distância interespecífica congênica). As demais espécies exibiram valores de divergência menor que 2% o que reflete uma grande similaridade morfológica e consequente dificuldade na identificação por métodos taxonômicos tradicionais.

Na família Doradidae, o DNA barcoding foi utilizado somente por Arce et al. (2014). Nesse estudo os autores aplicaram esse marcador juntamente com outros genes mitocondriais (DNAr 12S e 16S) e o gene nuclear RAG 1, com intuito de propor uma hipótese filogenética para o grupo, ou seja, o foco central do trabalho não foi esclarecer possíveis conflitos taxonômicos, como na maioria dos estudos onde o DNA barcode é aplicado, mas sim, investigar as relações entre todos os gêneros da família Doradidae, bem como espécies de Auchenipteridae e Aspredinidae que foram consideradas grupos irmãos. Esse trabalho foi muito importante não só por se tratar de uma filogenia molecular, mas também pelo fato de que uma grande parte das espécies dessa família já possui suas sequências barcode depositadas no banco de dados, sendo assim, isso pode facilitar a realização de trabalhos futuros, que visam esclarecer os conflitos taxonômicos existentes em alguns clados de Doradidae.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Investigar a estrutura cariotípica de espécies de Doradidae e os processos evolutivos responsáveis por sua variabilidade. Assim como, aplicar o DNA barcoding associado a metodologias clássicas de inferências filogenéticas e algoritmos de delimitação de espécies visando identificar caracteres diagnósticos para esclarecer as relações entre grupos taxonomicamente complexos ou portadores de diversidade críptica.

3.2. ESPECÍFICOS:

1. Investigar as relações e a variabilidade cariotípica de *W. maculata*, *K. bahiensis* e *F. marmoratus*, visando compreender a diversificação cromossômica dessas espécies baseada nos processos geomorfológicos que ocorreram na bacia do rio São Francisco e drenagens costeiras do Leste.
2. Determinar o status taxonômico de *Anadoras* sp. “araguaia” e de populações de *Anadoras weddellii* de diferentes bacias hidrográficas, utilizando marcadores citogenéticos combinados à análises filogenéticas e algoritmos de delimitação de espécies baseados no DNA Barcoding.
3. Caracterizar o cariotipo de 9 espécies de Doradidae visando produzir dados de valor citotaxonômico e principalmente que possibilite inferir tendências evolutivas a partir da reconstrução de caracteres ancestrais utilizando o software Mesquite.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Espécies/Populações analisadas e seus respectivos Locais de coleta

No presente estudo foram analisadas 15 espécies de peixes da Família Doradidae (Siluriformes) provenientes de 7 sistemas hidrográficos brasileiros: Subfamília Wertheimerinae - *Franciscodoras marmoratus*, *Kalyptodoras bahiensis* e *Wertheimeria maculata*; Subfamília Astrodoradinae - *Anadoras grypus*, *Anadoras weddellii*, *Anadoras* sp. “araguaia”, *Astrodoras asterifrons*, *Amblydoras nheco*, *Amblydoras affinis*; Subfamília Doradinae - *Platydoras hancockii*, *Pterodoras granulosus*, *Trachydoras steindachneri*, *Oxydoras niger*, *Centrodoras brachiatus*, *Hemidoras stenopeltis* (**Fig. 9**)

A coleta dos espécimes foi autorizada pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), seguindo a Licença N° 11399-1, utilizando tarrafas, rede de espera, peneiras e rede de arrasto. Os peixes foram acondicionados em aquário bem aerado e eutanasiados de acordo com os princípios bioéticos. Após o processamento do material e posterior fixação, os exemplares foram devidamente identificados utilizando as chaves de identificação construídas por Birindelli (2014) e Sousa (2010) e depositados em coleções ictiológicas como: Museu de Zoologia da Universidade Estadual (MZUEL), Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) e no Museu de Zoologia da Universidade Estadual Feira de Santana (MZUEFS).

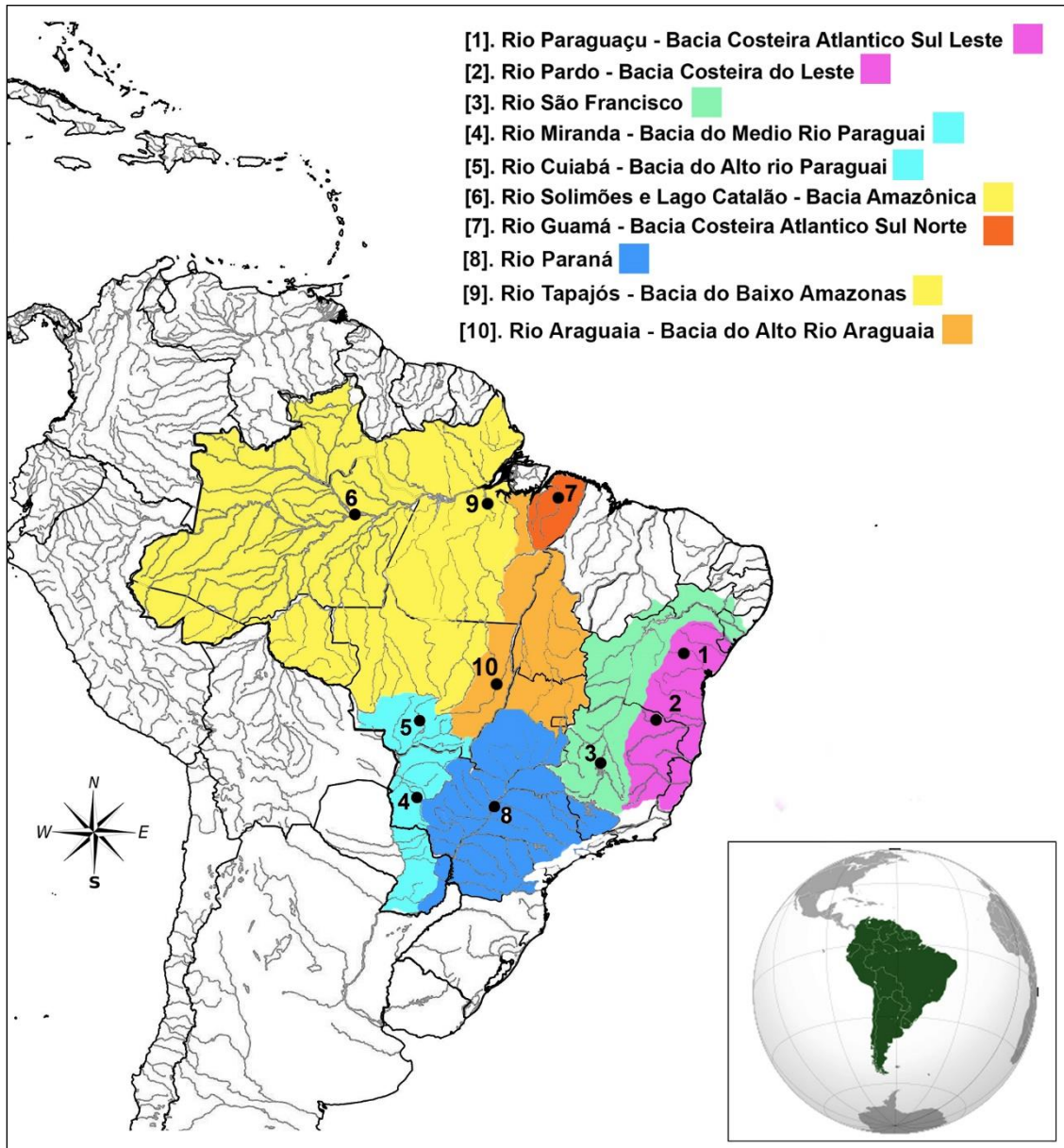


Figura 8 - Mapa evidenciando os Locais onde foram coletados os espécimes analisados no presente estudo, com destaque às Bacias hidrográficas a qual pertencem.

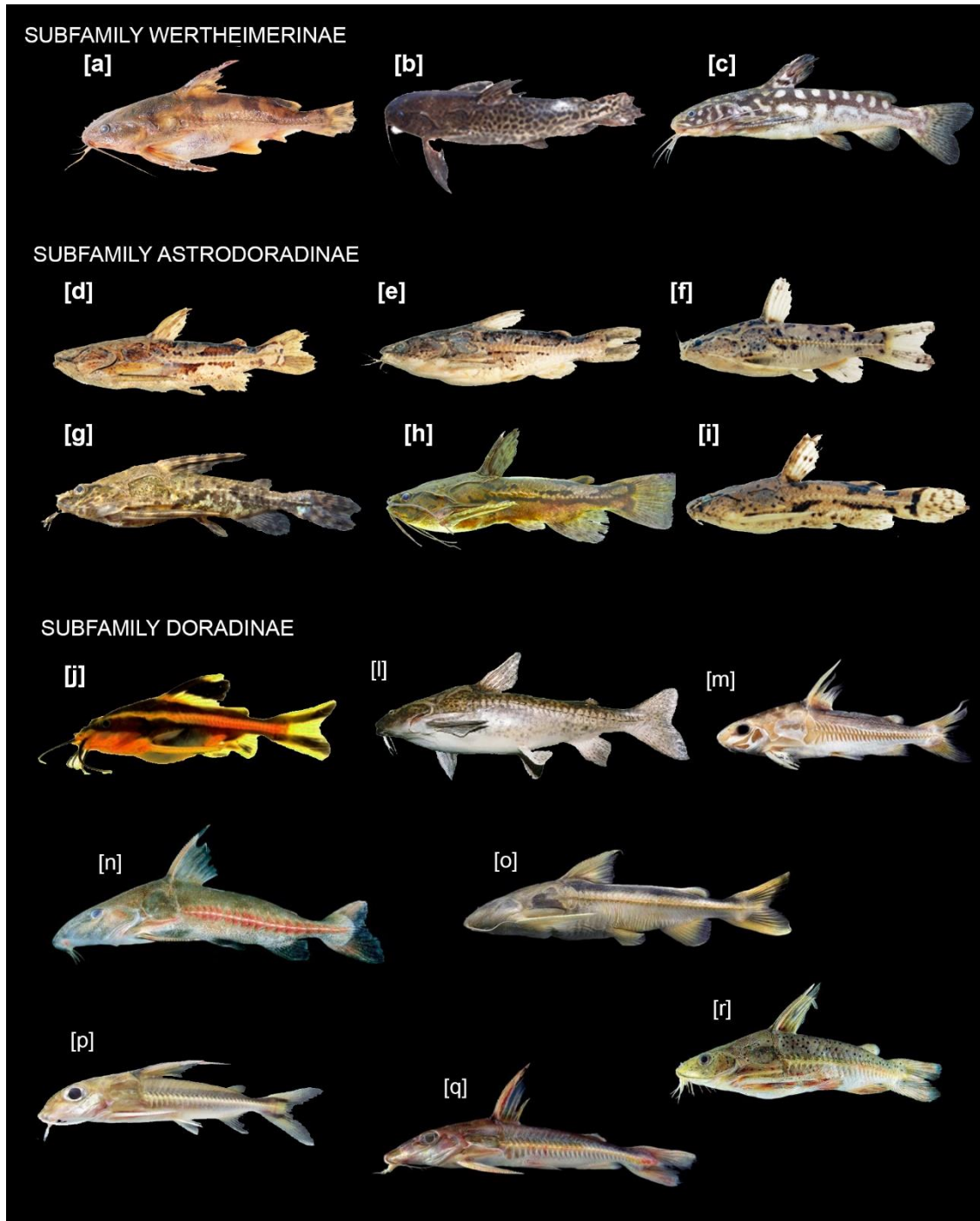


Figura 9- Espécies analisadas no presente estudo: [a] *Franciscodoras marmoratus* [b] *Kalyptodoras bahiensis* [c] *Wertheimeria maculata* [d] *Anadoras grypus* [e] *Anadoras weddellii* [f] *Anadoras* sp. “araguaia” [g] *Astrodoras asterifrons* [h] *Amblydoras nheco* [i] *Amblydoras affinis* [j] *Platydoras hancockie* [l] *Pterodoras granulatus* [m] *Trachydoras steindachneri* [n] *Oxydoras niger* [o] *Centrodoras brachiatus* [p] *Tenellus ternetzi* [q] *Hemidoras stenopeltis* [r] *Ossancora punctata*. **FONTES:** Sousa (2010); José Olivian Birindelli (arquivo pessoal); Queiroz et al. (2013) Capítulo 3 do livro Peixes do Rio Madeira.

Tabela 2 -.Informações sobre as espécies, Local de coleta e Vouchers em Coleções Ictiológicas.

ESPECIES	Nº AMOSTRAL	LOCAIS DE COLETA	COORDENADAS	VOUCHERS
<i>Wertheimeria maculata</i>	5 fêmeas e 2 machos	Rio Pardo – Bacia Costeira Atlantico Sul Leste	S15°31'16.45"/W41°31'07.24"	MZUEL16473
<i>Kalyptodoras bahiensis</i>	3 fêmeas e 2 machos	Rio Paraguaçu - Bacia Costeira Atlantico Sul Leste	S12°45'52.7"/W40°19'38.2"	MZFS17668
<i>Franciscodoras marmoratus</i>	9 fêmeas e 9 machos	Rio São Francisco – Bacia do rio São Francisco	S18°12'32.00"/W45°15'41.24"	MZUSP842240
<i>Anadoras weddellii</i>	4 fêmeas e 5 machos	Rio Miranda – Bacia do rio Paraguai	19°31'24.96"S 57°02'25.51"W	MZUEL11085
	2 femeas	Rio Cuiabá – Bacia do rio Paraguai	16°12'46.12"S 55°59'09.05"W	
<i>Anadoras</i> sp. “araguaia”	5 fêmeas e 3 machos	Lagoa marginal Corrego do Medo – Bacia do Alto rio Araguaia	3°07'06,6" S 50°26'55,9"W	MZUSP110809
<i>Anadoras grypus</i>	3 fêmeas e 2 machos	Lago Catalão – Bacia do rio Amazonas	3°09'49.8"S 59°54'47.5"W	MZUEL17811
<i>Astrodoras asterifrons</i>	2 fêmeas e 2 machos	Rio Solimões – Bacia do rio Amazonas	0°58'31.68"S 62°55'40.79"W	MZUEL17813
<i>Amblydoras affinis</i>	1 fêmea	Rio Tapajós – Bacia do rio Amazonas	2°45'50.70"S 55°05'08.93"W	MZUEL17801
	1 macho e 5 sexo não definido	Rio Guama – Bacia Costeira Atlântico Sul Norte	1°37'32.93"S 47°51'32.32"W	MZUEL19440
<i>Amblydoras nheco</i>	4 sexo não definido	Lagoa marginal do rio Cuiabá – Bacia do rio Paraguai	16°12'46.12"S 55°59'09.05"W	
<i>Platydoras hancockii</i>	3 machos	Rio Solimões – Bacia do rio Amazonas	0°58'31.68"S 62°55'40.79"W	MZUEL17318
<i>Centrodoras brachiatus</i>	2 fêmeas	Rio Negro – Bacia do rio Amazonas	3°14'28.32"S 59°56'29.19"W	MZUEL17831
<i>Pterodoras granulosus</i>	8 machos e 2 fêmeas	Rio Solimões – Bacia do rio Amazonas	3°14'28.32"S 59°56'29.19"W	
<i>Oxydoras niger</i>	6 fêmeas	Lago Catalão – Bacia do rio Amazonas	3°09'49.8"S 59°54'47.5"W	MZUEL17317
<i>Ossancora punctata</i>	3 machos	Rio Solimões – Bacia do rio Amazonas	3°14'28.32"S 59°56'29.19"W	MZUEL17810

<i>Trachydoras steindachneri</i>	5 fêmeas e 1 macho	Rio Solimões – Bacia do rio Amazonas	3°14'28.32''S 59°56'29.19''W	MZUEL17802
<i>Hemidoras stenopeltis</i>	3 fêmeas e 2 machos	Rio Solimões – Bacia do rio Amazonas	0°58'31.68''S 62°55'40.79''W	MZUEL17807
<i>Tenellus ternetzi</i>	2 fêmeas e 1 macho	Rio Solimões – Bacia do rio Amazonas	0°58'31.68''S 62°55'40.79''W	MZUEL14432

Legenda: [S]= Sul; [W]=Oeste; [MZUEL]= Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina; [MZUSP]=Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; [MZFS]=Museu Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Metodologia

4.2 Análises Citogenéticas

Obtenção de cromossomos mitóticos

Com o intuito de elevar a quantidade de células renais em divisão mitótica, em todos os exemplares de pequeno porte foi injetada intra-abdominalmente 0,4 mL de solução de Bronko-vaxon (Lisado bacteriano liofilizado diluído em água destilada) de acordo com Molina et al., (2010). Esse procedimento de estimulação mitótica foi realizado 48 horas antes da eutanásia dos exemplares. Feito isso, os cromossomos metafásicos foram obtidos utilizando-se a tradicional metodologia proposta por Bertollo et al., (1978), que consiste resumidamente em aplicação de solução de colchicina (0,0125%) in vivo; hipotonização das células com KCl (0,075M) e sucessivas lavagens utilizando o fixador Carnoy (metanol 3: 1 ácido acético).

Nas espécies de grande porte, a obtenção dos cromossomos seguiu a metodologia proposta por Foresti et al., (1993). Nesse procedimento o sangue periférico da veia caudal é coletado utilizando-se seringas esterilizadas. O sangue passa então por um período de decantação que permite separar os linfócitos dos demais componentes sanguíneos (hemácias e plasma) que posteriormente são colocados em meio de cultura suplementado com soro bovino fetal, antibióticos e antimicóticos (componentes que garantem a proliferação celular em um ambiente estéril e com ótimas condições de pH e nutrientes). A cultura permaneceu em estufa BOD à 28 –30 °C por 72 horas, sendo que 3 horas antes foi adicionada solução de colchicina (0,0125%) e depois processada de acordo com os passos utilizados no método direto.

A coloração convencionalmente utilizada para visualização dos cromossomos é baseada no corante Giemsa, dissolvido em tampão fosfato pH=6,8 em uma concentração de 5%. Após coloração, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico de campo claro,

sendo que após a contagem de 30 metáfases por exemplar, o número diplóide e o cariótipo foram determinados e os cromossomos classificados de acordo com Levan et al., (1964).

Bandamentos cromossômicos

Foram utilizadas três técnicas de bandamento cromossômico: **Bandamento C**: um tratamento ácido (15 minutos em HCl 0,2M à temperatura ambiente), básico (1 minuto e 10 segundos e 30 minutos em solução de Ba(OH)25% a 60 °C) e salino (em solução salina de citrato de sódio, 2xSSC a 60 °C) que promove alterações na estrutura cromossômica que possibilitam a visualização das regiões heterocromáticas que devido à sua maior compactação são mais resistentes à ação desses componentes (Sumner, 1972). Na etapa de coloração, o Giemsa foi substituído pelo fluorocromo Iodeto de Propidium de acordo com Lui et al. (2012).

Impregnação pelo nitrato de prata (Howell & Black, 1980): com intuito de identificar as regiões organizadoras de nucléolos por meio de sua atividade transcricional que após a interfase deixa resquícios de proteínas acídicas em sítios específicos que, quando em contato com o nitrato de prata, exibem uma coloração mais escura o que possibilita identificá-las nos cromossomos metafásicos.

Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

A FISH foi realizada de acordo com Pinkel et al., (1986), para determinar a localização dos sítios de rDNA, retrotransposons *Rex3* e sítios teloméricos. As sondas de rDNA foram obtidas a partir de Mini-Prep (extração de DNA plasmidial), sendo que a sonda de DNAr 18S foi obtida de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti, 2004) e a de DNAr 5S de *Megaleporinus elongatus* (Martins & Galetti, 1999). A sonda telomérica (TTAGGG)_n

foi preparada usando PCR na ausencia de DNA molde, seguindo as recomendações sugeridas por Ijdo et al., (1991).

O retrotransposon *Rex3* foi isolado a partir do DNA genômico total extraído de tecido muscular de *W. maculata* de acordo com o método de fenol-cloroformio descrito por Almeida et al. (2001). A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar o *Rex3* usando os primers RTX3-F3 (5'-CGG TGAYAA AGG GCA GCC CTG-3') e RTX3-R3 (5'-TGGCAG ACN GGG GTG GTG GT-3') numa reação com volume final igual à 25 µL contendo: DNA genômico (200 ng), 10x tampão com cloreto de magnésio (1.5 mM), Taq DNA polymerase (5 U/µL), dNTPs (1 mM), primers (5 mM), e água Milli-Q. As condições do ciclo de amplificação incluíram os seguintes passos: 95°C por 5 min; 35 ciclo de 95°C por 1 min, 55°C por 40 s, e 72°C por 2 min; e uma extensão final de 72°C à 5 min. Os produtos de PCR foram analisados usando gel de electroforese à 1%, quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

As sondas de DNAr e retrotransposon *Rex3*, foram marcadas com kits de nick translation (Roche®) seguindo as recomendações do fabricante e utilizando os compostos: biotin-16-dUTP e digoxigenina-11-dUTP. Enquanto que as sondas teloméricas foram marcadas por PCR usando digoxigenin-11-dUTP. As Hibridizações foram realizadas sob alta estrigência (77%) exceto para mapear as sondas teloméricas onde foi utilizada uma FISH com baixa estrigência, em torno de 52%. Os sinais fluorescentes foram detectados por anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) e biotinylated anti-avidin (Sigma-Aldrich). Para análise no fotomicroscópio de epifluorescência, os cromossomos foram corados com o fluorocromo 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI, 50µg/ml).

A Hibridização fluorescente *in situ* de alta resolução (Fiber-FISH) foi realizada de acordo com os procedimentos descritos em Barros et al, (2011), com intuito de determinar a

organização genômica dos sítios de DNAr 18S e 5S que em algumas espécies encontram-se em sintenia.

Construção de Ideogramas e Dendograma de Similaridade baseado em caracteres citogenéticos

Os ideogramas foram construídos utilizando o programa Easydeo para uma melhor representação de como os marcadores cromossômicos encontram-se distribuídos no cariótipo das espécies. No artigo 2, referente as espécies de *Anadoras*, a análise dos ideogramas possibilitaram elaborar uma matrix de ausência e presença, baseada em 25 caracteres incluindo dados sobre: número diplóide, morfologia cromossômica e distribuição de heterocromatina e dos sítios de DNAr 18S e 5S. Essa matrix serviu como base para uma análise de clusters no programa Past, considerando o modelo de distância Euclidiana e tendo como base o estudo feito por Tenorio et al., (2013).

Reconstrução de Caracteres ancestrais por meio do programa Mesquite

Para inferir qual seria o número diplóide e o padrão de NORs ancestral de Doradidae, o programa Mesquite foi utilizado (Maddison & Maddison 2011). Para esse tipo de análise evolutiva, foi incorporada a filogenia molecular de Doradidae (análise de Verossimilhança) e dois grupos externos pertencentes a Auchenipteridae: *Trachelyopterus galeatus* e *Ageneiosus inermis* (Arce et al., 2013). Os dados citogenéticos disponíveis na literatura, particularmente referente ao número diplóide e as NORs (Impregnação por nitrato de prata e FISH com sondas de DNAr 18S) foram utilizadas para criar uma matriz que posteriormente foi compilada com os dados filogenéticos utilizando uma análise de Verossimilhança. Os valores probabilísticos que suportam o caráter ancestral hipotético de cada nó foram organizados em tabelas.

4.3 Análises moleculares

Extração de DNA total e Amplificação da região de interesse

Amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de porções de tecido muscular ou hepático fixadas em etanol absoluto, utilizando o protocolo descrito por Almeida et al., (2001). Em seguida, as amostras de DNA foram coradas com azul de bromofenol e GelRed (Biotium) na proporção de 3:1 e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, a 110V por 45 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas e fotodocumentadas com o sistema de captura L-PIX (Loccus Biotecnologia) sob luz UV para avaliação qualitativa e quantitativa do DNA extraído.

O fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers: FishF1 (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') e FishR1 (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') (Ward et al. 2005). Cada PCR teve um volume final de 10µl contendo: 1 µl de DNA molde [5ng/ ml], 0.2 µl de cada primer [20 µM], 5 µl de master mix e 3.6 µl de água deionizada. Os ciclos de amplificação compreenderam em 35 ciclos de: 1 minuto à 94°C, 30 segundos à 54°C e 1.5 minutos à 72 °C; extensão final durante 5 minutos à 72°C e um período de resfriamento à 4°C.

Uma parte dos produtos de PCR foi corada com 3 µl de azul de bromofenol: Gel Red (Biotium) (3:1), inserida em gel de agarose 1% e submetida à eletroforese a 90 V por 15 minutos. As bandas referentes ao fragmento de COI (em torno de 600 pb) foram visualizadas e fotodocumentadas com o sistema de captura L-PIX (Loccus Biotecnologia) sob luz UV (**Figura 10**).

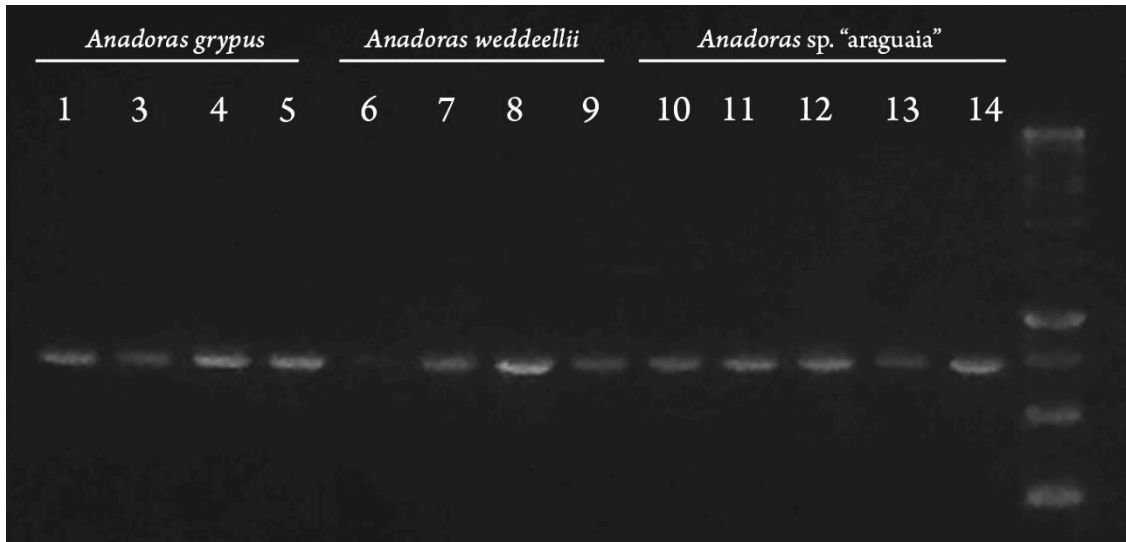


Figura 10 -Gel de Agarose 1% após eletroforese evidenciando as bandas de aproximadamente 600pb contendo os fragmentos do gene COI das três espécies de *Anadoras*.

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit “Big Dye Sequence Terminator” kit (Applied Biosystems), de acordo com os parâmetros descrito pelo fabricante. As condições de amplificação consistiram de: 25 ciclos à 96°C por 30 segundos; 15 segundos à 50°C e 4 minutos à 60°C. Após a reação os produtos foram precipitados e purificados e a leitura dos fragmentos foi realizada por meio sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer da Applied Biosystems/ HITACHI.

Alinhamento das sequências, análises filogenéticas e algoritimos de delimitação de espécies.

Um total de 16 sequências parciais do gene COI (Forward) foram analisadas, incluindo 11 novas sequências: uma de *Anadoras sp. "araguaia"*, cinco de *Anadoras grypus* e cinco de *Anadoras weddellii*. Outras sequências foram obtidas do Genebank: *A. weddellii* (KC555592), *Anadoras grypus* (KC555591), *W. maculata* (KC555709) e uma sequência de *Platydoras armatulus* (GBGCA8981-15) foi obtida do BOLD (Barcode of Life Data System). *W. maculata* e *P. armatulus* foram considerados grupos externos. O dataset com 604 pb foi alinhado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.1.9. (Hall, 1999) usando a

ferramenta Clustal W. No programa MEGA v. 6 program (Tamura et al., 2011) as sequencias foram traduzidas gerando matrizes de distância genética intra/interespecíficas além de também construir a árvore de Neighbor Joining (NJ) baseada no modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) e 1000 replicatas de bootstrap.

Para verificar os agrupamentos entre sequências e seu grau de confiabilidade foram realizadas reconstruções filogenéticas por meio de inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança nos software Mr. Bayes 3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) e RAxML-HPC BlackBox 8.2.10, respectivamente. Para a reconstrução da BI foram utilizadas duas séries independentes com 4 cadeias Markov e 10.000.000 gerações, com 10% de burn-in. e modelo de evolução nucleotídica HKI+I obtido no jModelTest v2.1.6 (Darriba et al., 2012) conforme implementado no CIPRES Science Gateway 3.3 (<http://www.phylo.org/index.php/portal/>). O desempenho dessa análise foi verificado no programa *Tracer* v. 1.6 (Rambaut et al., 2013). As árvores geradas foram editadas nos programas FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2014) e Adobe Photoshop CC v.14.0 para a construção de uma árvore resumo.

Os códigos de barras obtidos no presente estudo foram submetidos à análise de algoritmos para identificação de potenciais novas espécies. Para o *Automatic Barcode Gap Discover* (ABGD) (Puillandre et al., 2012) foi utilizado como arquivo de entrada uma matriz de distancia par a par, obtida no MEGA v. 6 (Tamura et al., 2011), em uma plataforma on-line gratuita (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>). Para a utilização dos demais algoritmos foi utilizado um subconjunto dos dados contendo uma sequência para cada haplótipos. Como arquivo de entrada para os algoritmos Bayesian Poisson Tree Process (bPTP) (Zhang et al., 2013) e Phylogenetic Map PTP (PhyloMap) (Zhang et al., 2011), foi utilizado uma árvore filogenética de máxima verossimilhança construída no RAxML-HPC BlackBox 8.2.10, implementado no CIPRES. O primeiro acrescenta aos ramos da árvore de entrada valores de

suporte de inferência Bayesiana, tornando o resultado ainda mais confiável, enquanto que o segundo combina a análise do PTP (Processos de Poisson Tree) com Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e discriminando espécies a partir de uma árvore filogenética enraizada. Ambos estão disponíveis na plataforma gratuita <https://species.h-its.org/>.

Para os algoritmos mPTP e sPTP também foi utilizada como input uma árvore de ML. Na primeira análise é incorporado diferentes níveis de diversidade genética intraespecífica, derivados de diferenças na história evolutiva ou na amostragem, enquanto que no segundo assume-se um único valor ($p=0,001$) como limiar da diversidade genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELL, R.; THIEME, M.L.; REVENGA, C.; BRYER, M.; KOTTELAT; M., BOGUTSKAYA, N.; COAD, B.; MANDRAK, N.; BALDERAS, S. C.; BUSSING, et al. (2008). Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *Bioscience* 58, 403–414.
- AGOSTINHO A.A.; GOMES L.C; SUZUKI H.I. & JÚLIO Jr H. F. (2003). Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brasil. *Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. IDRC and World Bank. 372p.
- AGOSTINHO, A.A.; PELICICE F.M. & MARQUES E.E. (2009). Reservatório de peixes Angical: bases ecológicas para o manejo da ictiofauna. São Carlos: Rima. 188 pp.
- AGOSTINHO C.S.; MARQUES E.E.; OLIVEIRA R.J. e BRAZ P.S. (2009). Feeding ecology of *Pterodoras granulosus* (Siluriformes, Doradidae) in the Lajeado Reservoir, Tocantins, Brazil. *Inheringia, Série Zoologia*. 99 (3): 301-306.
- ALBERT, J.S. & CARVALHO, T.P. (2011). Neogene assembly of modern faunas. In *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (Albert, J.S. & Reis, R.E., eds), pp.119–136. Berkeley, CA: University of California Press.

- ALBERT, J. S. & REIS, R. E. (2011). Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. Berkeley, CA: University of California Press.
- ALLENDORF, FR. & LUIKART, G. (2007). Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing: Oxford. 642 p.
- ALMEIDA, F.S., FUNGARO M.H.P. & SODRÉ, L.M.K. (2001). RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes, Pimelodidae) from the Tibagi River. Brazilian Journal of Zoology.
- ARCE, M.H; REIS, E.R; GENEVA, A.J.; SABAJ, P.H.M. (2013). Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes:Doradidae). Molecular Phylogenetics and Evolution. 67:560-577.
- BARBOSA T.A.P. (2012). Aspectos ecológicos do bacu-pedra *Lithodoras dorsalis* (Valenciennes,1840) (Siluriformes:Doradidae) na Foz Amazônica, Brasil. Dissertação não publicada. Universidade Federal do Pará. Belém. 73p.
- BARBOSA J.M.; SOARES E.C.; CINTRA I.H.A.; HERMANN M & ARAÚJO A.R.R. (2017). Profile of the fish fauna of the São Francisco river basin. Acta Fish Aquatic Research 5(1): 70-90.
- BARRETO, S.B., NUNES L.A., SILVA A.T., JUCA-CHAGAS R., DINIZ D., SAMPAIO I., SCHNEIDER H. & AFFONSO P.R.A.M. (2016). Is *Nematocharax* (Actinopterygii, Characiformes) a monotypic fish genus? Genome 58: 191–192.
- BERTACO, V.A., JEREP F.C & CARVALHO F.R.. (2011). A new characid fish, *Moenkhausia aurantia* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), from the upper rio Tocantins basin in Central Brazil. Zootaxa 2934:29–38.
- BERTOLLO L.A.C.; TAKAHASHI C.S & MOREIRA-FILHO O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Revista Brasileira de Genetica. 1: 103-120.
- BERTOLLO, L. A. C., G. G. BORN, J. A. DERGAM, A. S. FENOCCHIO & O. M. FILHO. (2000). A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. Chromosome Research, 8: 603-613.

- BICKFORD, D. et al. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 22:3.
- BIRINDELLI, J.L.O. (2006). Revisão taxonômica do gênero *Rhinodoras* Bleeker, 1862 (Siluriformes, Doradidae). Dissertação de Mestrado não publicada, Universidade de São Paulo. São Paulo, 274p.
- BIRINDELLI, J.L.O. (2010). Relações filogenéticas da superfamília Doradoidea (Ostariophysi, Siluriformes). Tese de Doutorado não publicada, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BIRINDELLI, J. L. O. & M. H. SABAJ PÉREZ (2011). *Ossancora*, new genus of thorny catfish (Teleostei: Siluriformes: Doradidae) with description of one new specie. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences*, 161: 117-152.
- BIRINDELLI JLO. (2014). Phylogenetic relationships of the South American Doradoidea (Ostariophysi: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology*. 12(3): 451-564.
- BRITSKI H.A.; SILIMON K.Z.S.; LOPES B.S. (2007). *Peixes do Pantanal: Manual de Identificação* 2a. edição. Brasília: Embrapa. 1: 230.
- BUCKUP, P.A. (2011). The Eastern Brazilian Shield. In: Albert, J.S. & Reis, R.E. (eds). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley: University of California Press. 1:203-209.
- BURGUESS, W.E. (1989). *An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A preliminary survey of the Siluriformes*. Neptune City, T.F.H. publications, 784p.
- CAMELIER, P., ZANATA, A.M. (2015). Biogeography of freshwater fishes from the Northeastern Mata Atlântica freshwater ecoregion: distribution, endemism and area relationships. *Neotropical Ichthyology*, 12: 683-698. doi: 10.1590/1982-0224-20130228.
- CARVALHO, L. N., J. ZUANON & I. SAZIMA. (2007). Natural history of Amazon fishes. In: K. Del-Claro (Ed.), *Tropical Biology and Natural Resources Theme*, In: K. Del-

Claro & R. J. Marquis (Session Eds. the Natural History Session), Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Eolss Publishers, Oxford.

- CARVALHO T.P. & ALBERT J.S. (2011). The Amazon-Paraguay Divide. In: Albert, J. S. & Reis, R. E. Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. Berkeley, CA: University of California Press.
- CATANHÊDE G.; HAHN N.S.; GUBIANI E.A; FUGI R. (2008). Invasive molluscs in the diet of *Pterodoras granulosus* (Valenciennes, 1821) (Pisces, Doradidae) in the Upper Paraná River floodplain, Brazil. Ecology of Freshwater Fish. 17:47-53.
- CLARO-GARCÍA, A. & SHIBATTA O.A. (2013). The fish fauna of streams from the upper rio Tocantins basin, Goiás State, Brazil. Check List 9(1):028–033.
- CLARO FL. (2013). Estudos do DNA repetitivo do gênero *Eigenmannia*. Tese. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- COGHLAN, A.; EICHLER, EE.; OLIVER, S.G.; PATERSON, AH. & STEIN, L. (2005). Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. Trends in Genetics, vol. 21, p. 673–682.
- DAYRAT, B. (2005). Toward integrative taxonomy. Biological Journal of the Linnean Society 85: 407-415.
- DARRIBA, D., TABOADA G. L., DOALLO R. & POSADA D., (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. National Methods 9:772. 10.1038/nmeth.2109.
- ELER E.S., DERGAM J.A., VÊNERE P.C., PAIVA L.C., MIRANDA G.A. & OLIVEIRA A.A. (2007). The karyotypes of the thorny catfishes *Wertemeria maculata* Syeindachner, 1877 and *Hassar wilderi* Kindle, 1895 (Siluriformes, Doradidae) and their relevance in doradids chromosomal evolution. Genetica. 130:99-103.
- FENOCCHIO A.S., Jorge L.C., Venere P.C. & Bertollo L.A.C. (1993). Karyotypic characterization and nucleolous organizer regions in three species of Doradidae (Pisces, Siluriformes). Revista Brasileira de Genetica. 4:1097-1101.
- FERREIRA, E.A.B. & D. J. TOKARSKI. (2007). Bacia Hidrográfica do Alto Tocantins Retrato e Reflexões. Ecodata. WWF – Brasil. 102 p.
- FERREIRA, M.; GARCIA C; MATOSO D.A; ET AL., (2017). The *Bunocephalus*

coracoideus Species Complex (Siluriformes, Aspredinidae). Signs of a Speciation Process through Chromosomal, Genetic and Ecological Diversity. *Frontiers in Genetics* 8:120. doi:10.3389/fgene.2017.00120.

FERREIRA F.S; DUARTE G.S.V; SEVERO-NETO F.; FROEHKICH O.; SÚAREZ Y.R. (2017). Survey of fish species from plateau streams of the Miranda river basin in the Upper Paraguay river region, Brazil. *Biota Neotropica* 17(3):e20170344.

FORESTI F.; OLIVEIRA C.; ALMEIDA-TOLEDO L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810–813.

FRANKHAM, R.; BALOU, J.D.; BRISCOE, D.A. (2008). *Fundamentos de Genética da Conservação*. 1.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.

FUGI R.; AGOSTINHO A.A. e N.S. HAHN. (2007). Trophic morphology of five benthic-feeding fish species of a tropical floodplain. *Revista Brasileira de Biologia*. 61(1):27-33.

GOULDING, M., R. BARTHEM & E.J.G. FERREIRA, (2003). *The Smithsonian atlas of the Amazon*. Washington: Smithsonian Books. 253 p.

HATANAKA, T. & GALETTI JR. P.M. (2004). Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA A.; BALL S.L. & DEWAARD J.R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 313–321.

HEBERT, P. D. N., STOECKLE, M. Y. ; ZEMLAK T. S. & FRANCIS C.M. (2004a). Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biology* 2: e312.

HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H. & HALLWACHS, W. (2004b). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:14812–14817.

HEBERT, P.D.N.,S. RATNASINGHAM & J. R. WAARD (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270:96–99.

- HIGUCHI, H. (1992). A phylogeny of the south American thorny catfishes (Osteichthyes; Siluriformes; Doradidae). Tese de Doutorado não publicada, Harvard University, Boston, 372p.
- HOORN, C.; WESSELINGH, F.P.; STEEGE, H.T.; BERMUDEZ, M.A.; MORA, A.; SEVINK J.; ET AL. (2010). Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science* doi:10.1126/science.1194585.
- HOWELL, W.M & BLACK, D.A.(1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: as 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N. E.; TAYLOR, E.; BURRIDGE, M.; BERNATCHEZ, L. (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS one*, v.3, n.6, pp-2490.
- HUELSENBECK, J.P. & F. RONQUIST, (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- IJDO, J.M., R.A. WELLS, A. BALDINI & S.T. REEDERS, (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19: 4780.
- KIMURA, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, v. 16, p. 111-120.
- KRISTIANSEN, T., SVENNING, J. C., PEDERSEN, D., EISERHARDT, W. L., GRÁNDEZ, C. & BALSLEV, H. (2011). Local and regional palm (Arecaceae) species richness patterns and their cross-scale determinants in the western Amazon. *Journal of Ecology* 99, 1001–1015.
- LARA, A. et al. (2010). DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p. 421-430.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- LOWE-MCCONNELL, R. (1999). *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. Editora da USP, São Paulo.

- LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V.P. (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87(7): 433–438. doi:10.3109/10520295.2012.696700.
- MADDISON WP AND MADDISON DR (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. Available in: <http://mesquiteproject.org>.
- MAIA G.M.G. (2014). Identificação Molecular de espécies da subfamília Corydoradinae (Siluriformes: Callichthyidae). Dissertação. Universidade Estadual Paulista. Botucatu.
- MARQUES D.F., SANTOS F.A., SILVA S.S., SAMPAIO I., RODRIGUES L.R.R. (2013). Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon river. *Neotropical Ichthyology*, 11(2): 459-466.
- MAURUTTO, F.A.M.; MANVAILER, L.F.S.; SCZEPANSKI, T.S.; CESTARI, M.M. & ARTONI, R.F. (2012). Cytogenetic characterization of three allopatric species of *Hypostomus* Lacepede (1803) (Teleostei, Loricariidae). *Caryologia*, 65(4): 340-346.
- MARTINS, C. & P.M.GALETTI Jr., (1999). Chromosomal Localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7:363–367.
- MERONA, B. (1987). Aspectos ecológicos da ictiofauna do Baixo Tocantins. *Acta Amazonica* 17(4): 109–124.
- MILHOMEM S.S.R, SOUZA A.C.P., NASCIMENTO A.L., CARVALHO JR. J.R., FELDBERG E., PIECZARKA J.C. & NAGAMICHI C.Y. (2008). Cytogenetics studies in fishes of the genera *Hassar*, *Platydoras* and *Opsodoras* (Doradidae, Siluriformes) from Jarí and Xingú Rivers, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 31,1:256-260.
- MITTERMEIER, R.A.; N. MYERS; C.G. MITTERMEIER & P.R. GILL, (1999). Hotspots, Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City: Cemex/Conservation International. 431 pp.
- MORLEY, R. J. (2012). A review of the Cenozoic palaeoclimate history of Southeast Asia. In: *Biotic Evolution and Environmental Change in Southeast Asia* (Gower, D. J., Johnson, K. G., Richardson, J. E., Rosen, B. R., Rüber, L. & Williams, S. T., eds), pp. 79–114. Cambridge: Cambridge University Press.
- MOLINA, W.F., D.E.O. ALVES, W.C. ARAÚJO, P.A. MARTINEZ, M.F.M. SILVA &

- G.W.W.F COSTA, (2010). Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. *Genetics and Molecular Research* 9: 1807-1814. doi:10.4238/vol9-3gmr840
- MOYER G.R.; BURR B.M.; KRAJEWSKI C. (2004). Phylogenetic relationship of thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zool J. Linnean Society*, 140: 551-575.
- NELSON J.S; GRANDE T.C.; WILSON M.V.H. (2016). *Fishes of the World: Fifth Edition*. John Wiley & Sons.
- PEREIRA, L. H.; PAZIAN, M. F.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. (2011). DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*, v.22, n.S1, pp.87-96.
- PIGGOTT, M.P.; CHAO N.L. & BEHEREGARAY L.B. (2010). Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. *Biological Journal of Linnean Society*. 102(2):391-403.
- PINKEL D.; STRAUME T. & GRAY J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.83, p.2934-2938.
- PRIZON, A.C., D.P. BRUSCHI, L.A. BORIN-CARVALHO, et al., (2017). Hidden Diversity in the Populations of the Armored Catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná River Basin Revealed by Molecular and Cytogenetic Data. *Frontiers in Genetics*. 8:185. doi:10.3389/fgene.2017.00185.
- Puillandre, N., A. Lambert, S. Brouillet & G. Achaz, 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21: 1864–1877.
- RAMBAUT, A., M.A. SUCHARD, D. XIE & A.J. DRUMMOND, (2014). Tracer v1.6. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- RAMBAUT A. (2013). FigTree version 1.3.1 [computer program] <http://tree.bio.ed.ac.uk> .
- REIS, R. E. (2013). Conserving the freshwater fishes of South America. *International Zoo Yearbook* 47, 65–70.

- REIS, R.E.; ALBERT J.S.; DI DARIO F.; MINCARONE M.M.; PETRY P. & ROCHA L.A. (2017). Fish Biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology* 89:12-47.
- RIBEIRO, A.C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 225-246.
- ROSA, R.S.; MENEZES, N.A.; BRITSKI, H.A.; COSTA, W.J.E.M. & GROTH, F. (2004). Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga. In: Leal, I.R., Tabarelli, M. & da Silva, J.M.C. (eds). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife: EDUFPE 135 – 180.
- ROSA RS & LIMA FCT (2008) Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. In: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP, editors. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília: Fundação Biodiversitas.
- SABAJ M.H. (2002). Taxonomy of the neotropical thorny catfishes (Siluriformes:Doradidae) and revision of the genus *Leptodoras*. Tese não publicada. University of Illinois. Urbana-Champaign. 242 p.
- SABAJ M.H. & FERRARIS C.J. (2003). Family Doradidae. Pp. 456-469. In R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr. (Eds). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 729p.
- SABAJ M.H. (2005). Taxonomy assessment of *Leptodoras* (Siluriformes: Doradidae) with description of three new species. *Neotropical Ichthyology*. 3(4):637-678.
- SANTOS, G.M. DOS, B. MÉRONA, A.A. JURAS & M. JÉGU. (2004). Peixes do baixo Rio Tocantins. Brasília: Eletronorte. 215 p.
- SILVA, J.S.V. & ABDON, M.M. (1998). Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. *Pesq. Agropec. Bras.* 33: 1703-1711.
- SIOLI, H., (1968). Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region. *Amazoniana*, 1(3): pp. 267-277, 1968.
- SIOLI, H. (1991). *Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais*. 3ª edição. Petrópolis, Editora Vozes.

- SOUZA-SHIBATTA, L., L.F. PEZENTI, D.G. FERREIRA, F.S. ALMEIDA, S.H. SOFIA & O.A. SHIBATTA, (2013). Cryptic species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes:Hepetapteridae) from the Miranda River, Paraguay River basin, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology* 11(1): 101-109.
- SOUSA L.M. (2010). Revisão Taxonômica e Filogenia de Astrodoradinae (Siluriformes, Doradidae). Unpublished Ph.D. dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 276p.
- SUMNER A.M.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75: 304-306.
- TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI & S. KUMAR, (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- TERESA, F.B., ROMERO, R.M. & LANGEANI, F. (2010). Pisces, Aquidauana and Miranda drainages, upper Paraguay River basin, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Check List* 6(4): 596-601.
- USSO, M.C., A.R. SANTOS, J.G. GOUVEIA, W. FRANTINE-SILVA, C. ARAYA-JAIME, L.M.M. DE OLIVEIRA, F. FORESTI, L. GIULIANO-CAETANO & A.L. DIAS, (2018). Genetic and Chromosomal differentiation of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) revealed by repetitive molecular markers and Dna Barcoding. *Zebrafish*.16(1):
- UTSONOMIA R, PANSONATO-ALVES JC, COSTA-SILVA GJ, MENDONÇA FF, SCACCHETTI PC, OLIVEIRA C, FORESTI F. (2014). Molecular and cytogenetic analysis of cryptic species within the *Synbranchius marmoratus* Block, 1795 (Synbranchiformes: Synbranchidae) grouping: species delimitations, karyotypic evolution and intraspecific diversification. *Neotropical Ichthyology*, 12 (4): 903-911.
- TAKAGUI, F.H., A.L. DIAS, J.L.O. BIRINDELLI, A.C. SWARÇA, R. ROSA, R.L. LUI, A.S. FENOCCHIO & L. GIULIANO-CAETANO (2017a). First report of B chromosomes in three neotropical thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae). *Comparative Cytogenetics* 11(1): 55-64.

- TAKAGUI, F.H., L.F. MOURA, D.C. FERREIRA, L. CENTOFANTE, C.A. VITORINO, V. BUENO, V.P. MARGARIDO & P.C. VENERE, (2017b). Karyotype diversity in Doradidae (Siluriformes, Doradoidae) and presence of the heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in the family. *Zebrafish* doi:10.1089/zeb.2016.1368.
- TENORIO, R.C.C.O., C.A. VITORINO, I.L. SOUZA, C. OLIVEIRA, P.C. VENERE, (2013). Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the citotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology* 11(3): 553-564.
- VALDEZ-MORENO, M. et al. (2009). Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology*, v. 74, p. 377-402.
- VAN DER SLEEN P.& ALBERT J.S. (2018). *Field Guide to the fishes of the Amazon, Orinoco and Guianas*. Princeton University Press.
- VARI, R.P. & MALABARBA, L. R. (1998). Neotropical ichthyology: an overview. In *Phylogeny and Classification of Neotropical fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z.M. S. & Lucena, C. A. S., eds), pp. 1–11. Porto Alegre: Edipucrs.
- VILLAMIZAR-RIOS E.A.; PIEDADE M.T.F.; COSTA J.G.; ADENEY J.M.; JUNK W.J. (2014). Chemistry of different amazonian water types for river classification: a preliminary review. *WIT Transactions on Ecology and the Environment* 178:20-29.
- VITORINO, C. A., L. I. SOUZA, J. N. ROSA, G. T. VALENTE, C. MARTINS & P. C. VENERE. (2011). Molecular cytogenetics and its distribution to the understanding of the chromosomal diversification in *Hoplias malabaricus* (Characiformes). *Journal of Fish Biology*,78: 1239-1248.
- ZAWADZKI C.H.; PAVANELLI C.S. e FERREIRA Jr H. (1996). Caracterização morfológica e distribuição das espécies da família Doradidae (Pisces: Siluriformes) no Alto e Médio Paraná: registros e comentários. *Arquivos Biológicos e Tecnológicos*. 39 (2): 409–417.
- ZHANG, J., A. M. MAMLOUK, T. MARTINETZ, S. CHANG, J. WANG & R. HILGENFELD, (2011). PhyloMap: an algorithm for visualizing relationships of large sequence data sets and its application to the influenza A virus genome. *BMC bioinformatics* 12: 248–267.

- ZHANG, J., P. KAPLI, P. PAVLIDIS & A. STAMATAKIS, (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29(22), 2869–2876.
- WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. (2005). Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 360, p. 1847–1857.
- WAUGH, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, v. 29, p. 188-97.
- WEITZMAN, S.H., MENEZES, N.A. & WEITZMAN, M.J. (1998). Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: Heyer, W.R. & Vanzolini, P.E. (eds). *Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências 379-427.
- WILL, K.P., B.D. MISHLER, Q.D. WHEELER, (2005). The perils of DNA Barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54:844-851.

CAPÍTULO 1

“Chromosomal diversity of thorny catfishes (Siluriformes-Doradidae): a case of allopatric speciation among Wertheimerinae species of São Francisco and Brazilian eastern coastal drainages”.

Running title: Chromosomal speciation in Wertheimerinae.

Fábio Hiroshi Takagui¹; Lucas Baumgärtner²; Joana Neres Baldissera¹; Roberto Laridondo Lui²; Vladimir Pavan Margarido²; Soraia Fonteles³; Caroline Garcia⁴; José Oliván Birindelli⁵, Fernanda Almeida Simões⁶ and Lucia Giuliano-Caetano¹.

Authors affiliations:

1. Animal Cytogenetics Laboratory; Department of General Biology; CCB; Londrina State University. Celso Garcia Cid Highway, PR 445, km 380, Londrina-Brazil.

2. Cytogenetic Laboratory; Center for Biological and Health Sciences; Western Paraná State University . Universitária street 2069, Cascavel-Brazil.

3. Genetics of Aquatic Organisms Laboratory; Center for Agrarian Environmental and Biological Sciences; Recôncavo of Bahia Federal University of. Rui Barbosa Street 710, Cruz das Almas Bahia-Brazil.

4. Cytogenetic Laboratory; Department of Biological Sciences; State University of Southwest of Bahia. Jose Moreira Sobrinho Avenue, Jequié, Bahia – Brazil.

5. Museum of Zoology; Department of Animal and Plant Biology; CCB; Londrina State University. Celso Garcia Cid Highway, PR 445, km 380, Londrina-Brazil.

6. Genetics and Animal Ecology Laboratory; Department of General Biology; CCB; Londrina State University. Celso Garcia Cid Highway, PR 445, km 380, Londrina-Brazil.

Abstract

The Brazilian eastern coastal drainages and São Francisco River are home of a peculiar ichthyofauna characterized by a high level of endemism, including species threatened of extinction; thus, any type of study that aims to characterize the morphological and genetic biodiversity of this region is relevant. Therefore, a comparative cytogenetic analysis was performed in *Wertheimeria maculata*, *Franciscodoras marmoratus* and *Kalyptodoras bahiensis* (endangered species), aiming to understand cytotaxonomic aspects, karyotypic variability and how geomorphological changes may have influenced in chromosome speciation. All species shared $2n=58$ chromosomes, karyotypic formulas ($24m+12sm+8st+14a$) and pattern of NORs (terminal 18S rDNA sites on pair 22). However, differences were noted in C-banding and in distribution of the 5S rDNA and *Rex3* retrotransposons sites. The chromosome markers applied here, provided support for the inclusion of *F. marmoratus* in the Wertheimerinae subfamily, closely related to *K. bahiensis*, as has already been proposed by molecular phylogenetic studies. The basal cytogenetics characteristics ($2n=58$ and simple NORs on terminal position) remain conserved in Wertheimerinae but changes in heterochromatin distribution were observed and constitute evidences of allopatric speciation. In fact, river captures events are reported in setentrional and north portion of Espinhaço Complex and were crucial for karyotype evolution of this subfamily. Our results represent one more evidence supporting the ancient connectivity between eastern coastal drainages and São Francisco River which were important events for chromosome differentiation in the basal thorny catfishes of the Wertheimerinae subfamily.

Keys-words: Evolution, Heterochromatin, Karyotypes, rDNA, River capture, Vicariance.

Introduction

The Brazilian eastern Atlantic basin is a biodiversity hotspot of fishes, with more than 190 species described for this region; among them, a considerable portion is endemic (Ribeiro, 2006). This watershed is composed by twenty-five independent drainages (geographically isolated), including large rivers, as Paraguaçu, Contas, Jequitinhonha and Doce, as well as small hydrographic systems (Pardo, Una, Mucuri and São Mateus) (Camelier & Zanata 2015). The current ichthyofauna described for these hydrographic basin is originating from a complex process influenced by exchanges between adjacent upland crystalline shield rivers, such as São Francisco (Buckup et al., 2011; Camelier & Zanata 2015; Ribeiro, 2006; Rosa et al., 2004), associated with the sea level changes (marine transgressions and regressions) that occurred during the Late Pleistocene (Weitzman et al. 1988).

The complex geological history associated with the high number of endemic fish species of the eastern coastal basin has made of this drainage an excellent model for biogeographic studies. According to Ribeiro (2006), an interesting feature observed in this hydrographic basin is the presence of ancient lineages of some widespread fish families (Pattern A), as Wertheimerinae subfamily, a basal taxa and sister group of remaining Doradidae species. The thorny catfishes underwent a long evolutionary history and nowadays represent one of the most diverse groups in Trans/Cis-Andean South America rivers (Birindelli, 2014) with more than 95 species (Fricke, Eschemeyer & Fong 2018) popularly known as thorny catfishes, serrate, armado, rique-rique, abotoado. They are easily recognized by the presence of a single or multiple row of scutes with thorns along the lateral line. This family includes species with economic and biological importance, spread throughout the largest hydrographic basins in Brazil; however, they are commonly found in Amazon and Platina Rivers (Ferraris, 2007).

Recently, Birindelli (2014) organized Doradidae into three subfamilies: Wertheimerinae, Astrodoradinae and Doradinae. Wertheimerinae was considered as a basal clade of Doradidae and it includes only two monotypic taxa from Brazilian eastern coastal drainages: *Wertheimeria maculata*, endemic species of Jequitinhonha and Pardo Rivers, and *Kalyptodoras bahiensis*, endemic from Paraguaçu River. This last species is included in the Red List of endangered species, due to the impacts caused by construction of hydroelectric dams, water pollution, devastation of riparian vegetation and introduction of invasive species (Higuchi et al., 1990). Molecular phylogenetic analysis suggests the inclusion of *Franciscodoras marmoratus* (endemic species from São Francisco River) in Wertheimerinae as a sister species of *K. bahiensis* (Arce et al., 2013), in opposition to the morphological data that consider *F. marmoratus incertae sedis* in Doradidae (Birindelli, 2014).

The chromosome data has been an informative tool to contribute to this phylogenetic incongruence. In many groups of plants and animals, the cytotoxic studies has been fundamental for the identification and classification of species, as well as for understanding the phylogenetic conflicts that are essential for evolutionary studies (Resende, 2017). In thorny catfishes, the diploid number ranges from $2n=56$ in *Trachydoras paraguayensis* and *Anadoras* sp. "araguaia" to $2n=66$ in *Ossancora punctata*, but most of the species has 58 chromosomes. The presence of ZZ/ZW sex chromosome system, supernumerary chromosomes and high divergence in both heterochromatin and rDNA distributions reinforce the karyotypic diversity of Doradidae and suggest the occurrence of numeric and structural chromosome rearrangements (Fenocchio et al. 1992; Eler et al. 2007; Milhomem et al. 2008; Baumgärtner et al. 2016; Baumgärtner et al., 2018; Takagui et al., 2017a; Takagui et al., 2017b).

The variation in the amount and distribution of heterochromatin is certainly the main mechanism related to the karyotypic diversification of Doradidae (Baumgärtner et al.,

2018; Takagui et al., 2017b). A remarkable feature of heterochromatin is the heterogeneous composition and its rapid rates of change throughout evolution (Hughes & Hawley 2009). Therefore, it might not be surprising if differences in heterochromatic sequences were responsible for reproductive isolation and played a role in speciation process (Ferree & Bardash, 2009). The transposable elements (TEs) represent a significant portion of the repetitive DNAs in genome of teleostean fishes. These sequences show intragenomic mobility and are related to the diversity of the genome size and the accentuated structure reorganization observed in these primitive lineage of Vertebrata (Volf et al., 2003; Volf et al., 2005).

Considering the potential of karyotypic data to help the establishment of evolutionary relationships among different organisms, the present study provides a comparative analysis using chromosomal markers in *W. maculata*, *K. bahiensis* and *F. marmoratus*, investigating through cytogenetic analysis if *F. marmoratus* should be included in Wertheimerinae, as suggested by molecular data, which diverges from data based on morphology. It is noteworthy that, these three monotypic taxa are the oldest divergent lineages and consequently the sister group of all remaining Doradidae species, thus their karyotypic structure has a high value for the comprehension of the evolutionary history of thorny catfishes.

Material and Methods

Species and collection sites

Altogether, 39 specimens of thorny catfish were analyzed: *W. maculata* (5 females/2 males) collected from Middle Pardo River, Minas Gerais State - Brazil (S15°31'16.45"/W41°31'07.24"); *K. bahiensis* (3 females/2 males) from Middle Paraguaçu River, Bahia State - Brazil (S12°45'52.7"/W40°19'38.2") and *F. marmoratus* (9 females/9 males) from the Upper São Francisco River, Minas Gerais State - Brazil (S18°12'32.00"/W45°15'41.24") (Figure 1). The capture of specimens was authorized by Brazilian environmental agency ICMBIO/SISBIO (License number 1947869) and after processing and subsequent fixation, all specimens were deposited in ichthyological collections under the voucher numbers: *W. maculata* in the Museum of Zoology of State University Londrina (MZUEL16473); *K. bahiensis* in the Museum of Zoology of State University Feira de Santana (MZFS17668) and *F. marmoratus* in the Museum of Zoology of São Paulo University (MZUSP842240).

The experiments followed ethical conducts in accordance with the Ethics Committee for Animal Use of the State University of Londrina, under the protocol number 60/2017.

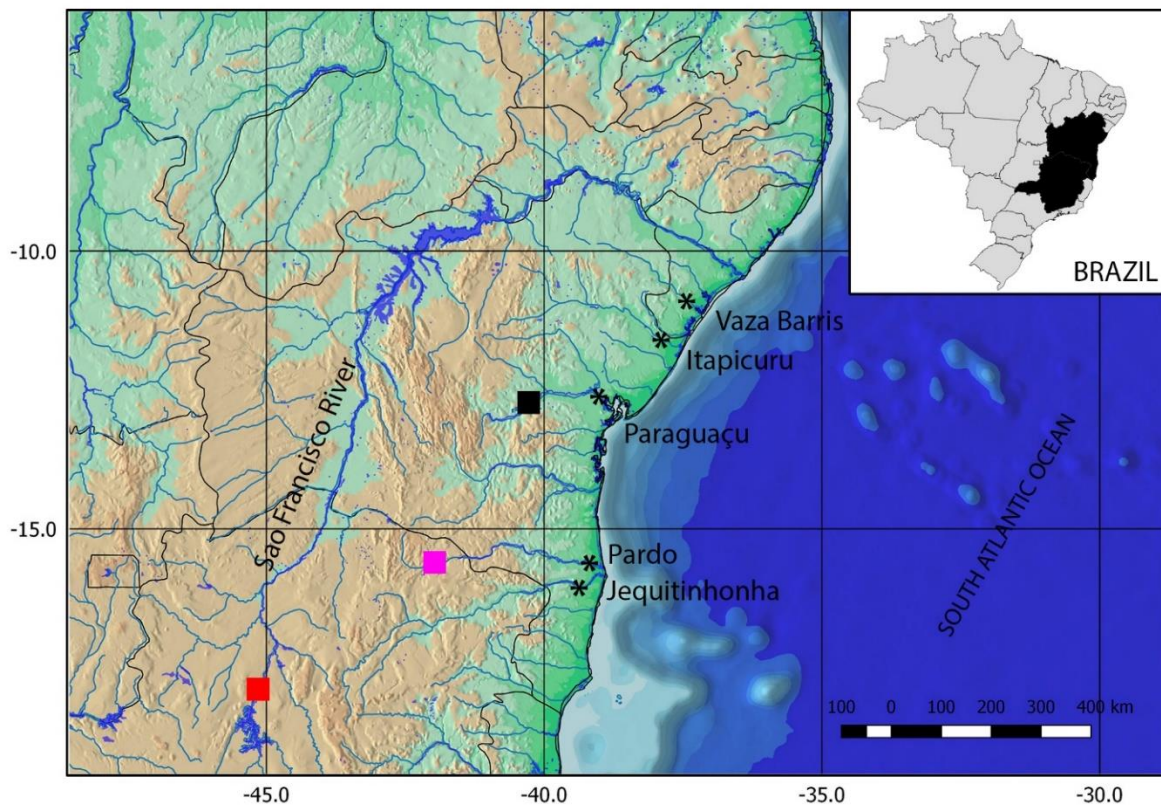


Figure 1. Topographic map showing the São Francisco basin and the Brazilian eastern coastal drainages. The circles indicate the collection sites of *W. maculata* from Pardo River (red circle), *K. bahiensis* from Paraguaçu River (pink circle) and *F. marmoratus* from São Francisco River (yellow circles). The Espinhaço Complex is highlighted between these two hydrographical basins and its geomorphological transformations at over the thousands years influenced the current ichthyofaunistic composition of these adjacent watershed. The red squares are indicating regions where headwater stream-captures have already been recorded.

Mitotic chromosomes preparations and chromosomal banding

Before undergoing euthanasia (48 hours), the specimens received an intraperitoneal injection of 300 μ L of Broncho-vaxom (bacterial lysate) to trigger an inflammatory process and hence increase the number of renal cells in mitotic division (Molina et al., 2010). The mitotic chromosomes were obtained from kidney cells according to Bertolo et al., (1978). The heterochromatin pattern was determined using the C-banding technique proposed by Sumner (1972) with modification in the coloration (Giemsa were replaced by propidium iodide) according to Lui et al. (2012).

The chromosomes were measured using the Easyideo software and classified in metacentric, submetacentric, subtelocentric and acrocentric according to the arm ratio proposed by Levan et al. (1964).

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

The fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was performed according to Pinkel et al. (1986), with modification in chromosome denaturation step (the formamide was replaced by sodium hydroxide) (Margarido & Moreira-Filho 2008), for mapping of the rDNA and retrotransposon *Rex3*. The 18S rDNA probes were obtained from *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti 2004) and labeled with biotin-14-dATP using a Biotin-Nick Translation Mix kit (Roche), whereas the 5S rDNA probe was isolated from *Megaleporinus elongatus* (Martins & Galetti 1999) and labeled with digoxigenin-11-dUTP using a DIG-Nick Translation Mix kit (Roche), according to manufacturer's instructions.

The *Rex3* retrotransposon probe was obtained from total DNA, extracted from muscle tissue of *W. maculata* according to phenol chloroform method described by Almeida et al. (2001). Polymerase chain reaction (PCR) was carried out using primers RTX3-F3 (5'-CGG TGAYAA AGG GCA GCC CTG-3') and RTX3-R3 (5'-TGGCAG ACN GGG GTG GTG GT-3') for *Rex3* and in a reaction with final volume of 25 μ L containing genomic DNA (200 ng), 10x buffer with 1.5 mM magnesium, Taq DNA polymerase (5 U/ μ L), dNTPs (1 mM), primers (5 mM), and Milli-Q water. The cycling condition for the reactions included the following steps: 95°C for 5 min; 35 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 40 s, and 72°C for 2 min; and a final extension at 72°C for 5 min. The PCR products were analyzed using electrophoresis in 1% agarose gels, quantified in a spectrophotometer NanoVue Plus (GE Healthcare) and labeled with digoxigenin-11-dUTP using a DIG-Nick Translation Mix kit (Roche) according to manufacturer's instructions.

Hybridizations were carried out under high stringency (77%) and the detection of signals was performed using anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) for 5S rDNA and *Rex3* retrotransposon probes, while the avidin-FITC with biotinylated anti-avidin for detection of 18S rDNA sites (Sigma-Aldrich). The slides were assembled in 20 μ L antifading solution (90% glycerol, 2.3% DABCO, 2% 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, plus 5 μ L of 2 μ g/mL DAPI and 5 μ L of 2.5 mM $MgCl_2$) and they were analyzed on Leica DM 2000 epifluorescent microscope equipped with digital camera Moticam Pro 282B. All the chromosome images were obtained using the Motic Images Advanced software, version 3.2.

Similarity dendrogram using Cytogenetic data

A binary matrix was constructed based on cytogenetic data of *W. maculata*, *K. bahiensis*, *F. marmoratus* and two outgroups: *Platydoras armaulus* and *Anadoras* sp. “araguaia” (Baumgärtner et al. 2018). Altogether, 40 characters were determined, based on the diploid number, chromosome morphology, heterochromatin distribution and 18S and 5S rDNA pattern (Table 1). This matrix was then used to calculate the Euclidean distance index and for cluster analysis based on the UPGMA algorithm, both available on the PAST software.

Results

All species had $2n=58$ chromosomes, karyotype formula: $24m + 12sm + 8st + 14a$ (for both sexes) and syntenic 18S and 5S rDNA sites on short arm of pair 22 (Figure 2). The C-banding pattern allowed to easily distinguish the three species, according to the following: ***Wertheimeria maculata***: heterochromatic regions detected terminally on both arms of the

metacentric chromosomes pair 4 and on the short arm of the pairs 16, 17 and 22 (Figure 2b); *Kalyptodoras bahiensis*: interstitial blocks on pair 2, two terminal blocks on both arms of the pair 4 and on the short arm of the pairs 19 and 22. The pair 13 had heterochromatin on short arm and in interstitial position the long arm near the centromere (Figure 2d); *Franciscodoras marmoratus*: terminal blocks on both arms of the pair 4, on short arm of the pairs 15, 16, 22 and on long arm of the pairs 10, 13. Interstitial/pericentromeric blocks were detected on the pairs 1, 5, 6, 14 and 19. The submetacentric pair 19 had heterochromatin on short arm and a large block in terminal region on long arm (Figure 2f). The 5S rDNA pattern has also allowed to discriminate *W. maculata* (interstitial sites on short arm of pair 22) from *K. bahiensis* and *F. marmoratus* (multiple sites: interstitial on short arm of pair 22 and terminal on short arm of pair 19) (Figure 2, in box).

FISH with *Rex3* retrotransposon revealed a dispersal distribution of this element in most of the chromosomes, including both heterochromatic and euchromatic segments. However, some heterochromatic regions did not have homology for this repetitive element (Figure 3, boxes).

The cluster analysis based on chromosomal data enabled the construction of the similarity dendrogram shown in **Figure 4**. This analysis reveals a greater karyotype similarity between *F. marmoratus* with *K. bahiensis* and *W. maculata* when compared with the outgroup species.

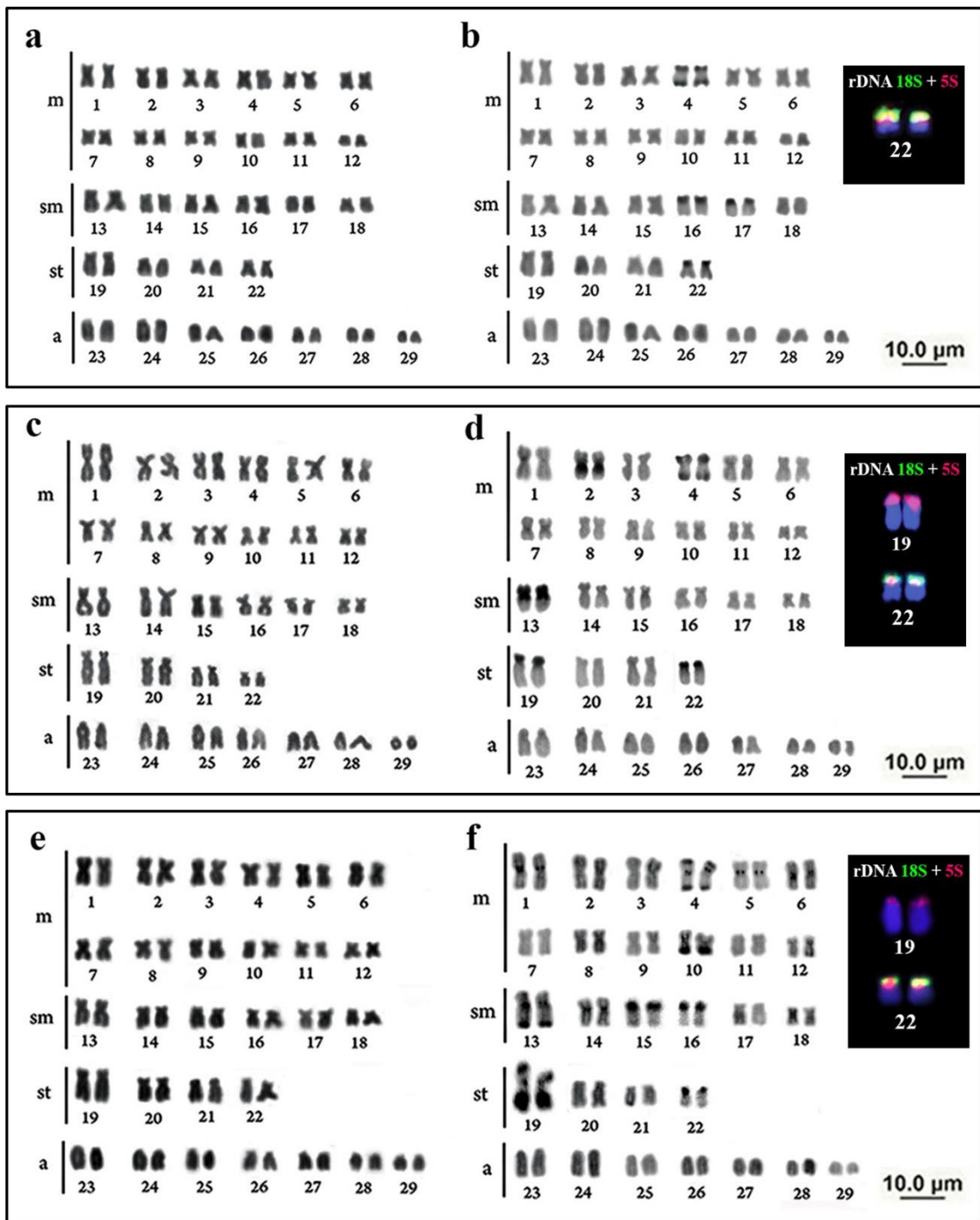


Figure 2. Karyotypes of Wertheimerinae species evidenced the conservation of diploid numbers and karyotypic formulae in contrast with divergences in heterochromatin distribution: *W. maculata* (a) Giemsa staining (b) C-banding; *K. bahiensis* (c) Giemsa staining (d) C-banding; *F. marmoratus* (e) Giemsa staining (f) C-banding. The boxes contain the chromosome pairs bearing the 18S (green signals) and 5S (red/pink signals) rDNA sites.

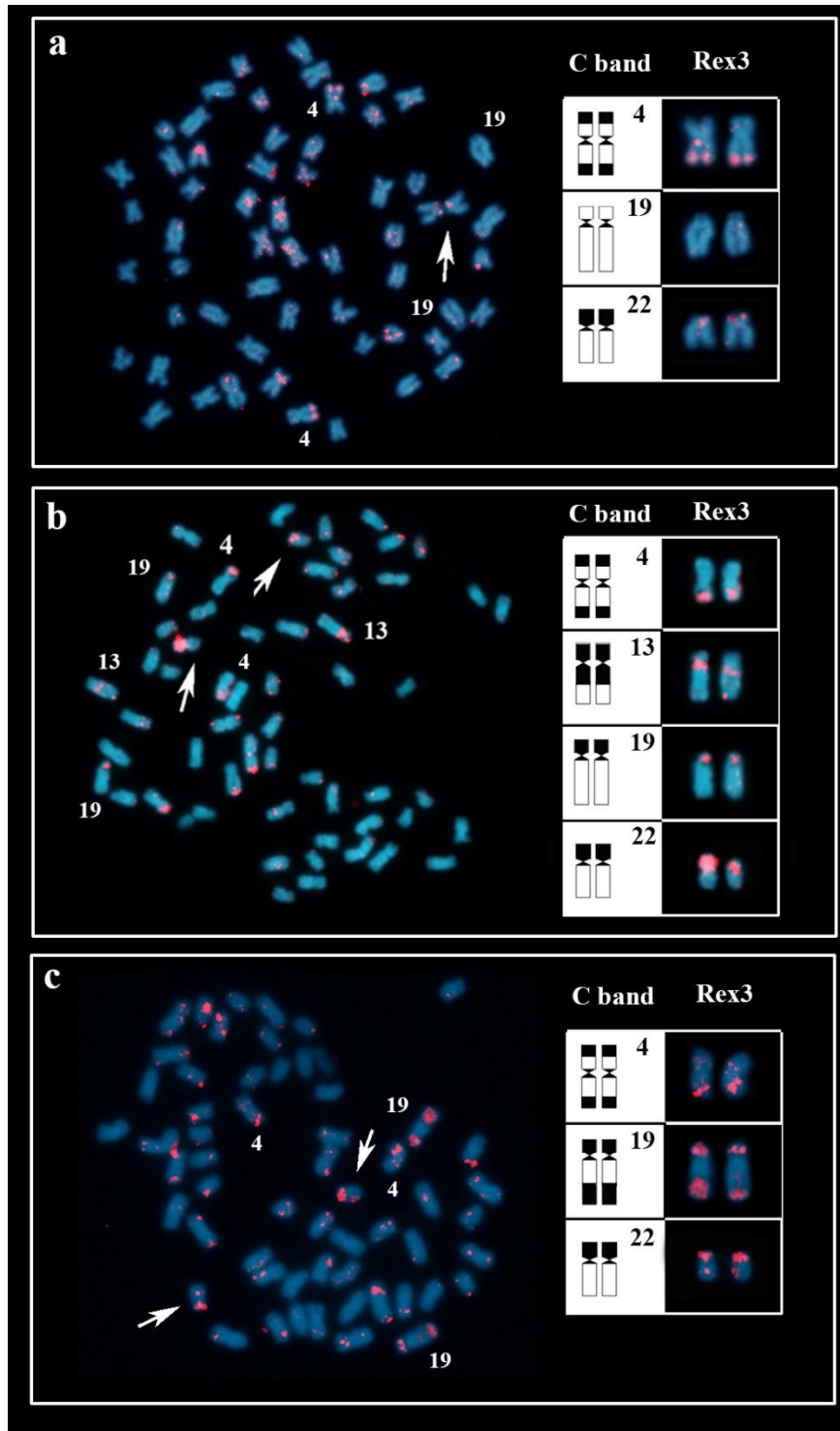


Figure 3. Metaphasis of Wertheimerinae species after FISH with Rex3 retrotransposon (a) *W. maculata* (b) *K. bahiensis* (c) *F. marmoratus*. The arrows indicate the pair bearing the NORs bearing chromosomes which in both species shows homology to the Rex3 retrotransposon. The boxes show some pairs with heterochromatic blocks with partial overlap with Rex3 retrotransposon, suggesting the existence of the other repetitive DNAs types in these sites.

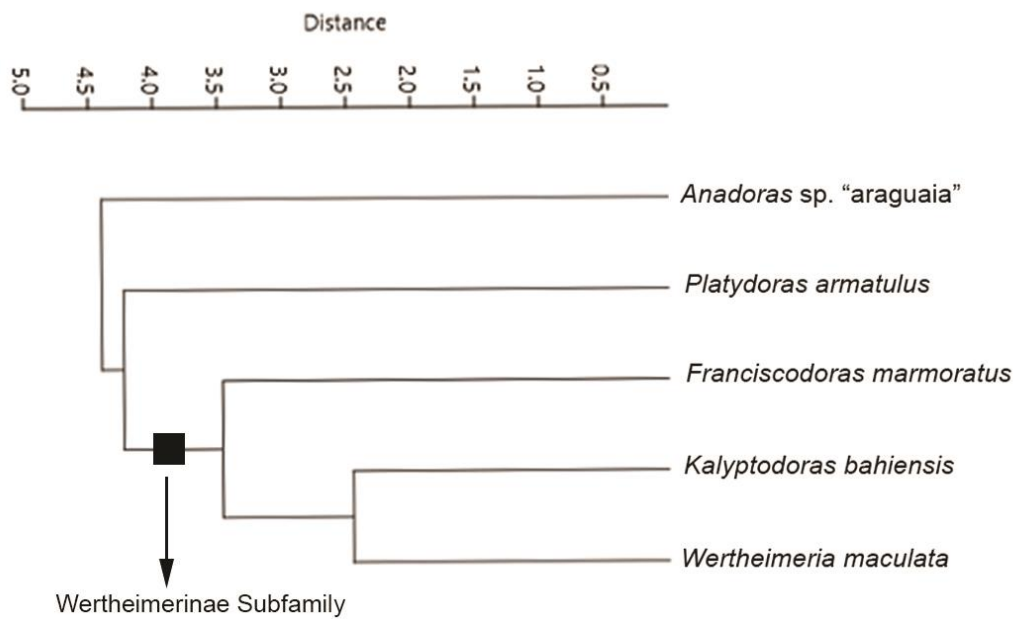


Figure 4. Similarity dendrogram based on Euclidean distances constructed from 40 cytogenetic characters of Wertheimerinae species and two outgroups: *Anadoras* sp. "araguaia" and *Platydoras armatulus*.

Discussion

Cytotaxonomy and chromosome evolution of Wertheimerinae: low variation in macrostructure in contrast with dynamic patterns of repetitive DNAs

The first step for evolutionary studies was to solve eventual phylogenetic incongruences; in Wertheimerinae, for example, although the morphological and molecular data support the monophyletic status, there is no consensus between these two approaches regarding the inclusion of *F. marmoratus* in this subfamily (e.g., Arce et al., 2013; Birindelli, 2014). In these sense, the similarity dendrogram based on Euclidean distance index, evidenced a greater proximity between *F. marmoratus* and Wertheimerinae species when compared to the outgroup members, revealing several shared cytogenetic features, including the same diploid number, karyotypic formulae and syntenic rDNAs on short arm of pair 22. Thus, the chromosomal analysis corroborates the phylogenetic hypothesis based on molecular

markers proposed by Arce et al. (2013) which considered *F. marmoratus* a member of Wertheimerinae subfamily.

Karyotypic studies constitute an important source of information for evolutionary studies in Neotropical fishes, since the chromosome rearrangements are frequently associated to the diversification in different groups. Considering the evolutionary perspective, the most probable ancestor karyotype of Doradidae has 58 chromosomes and terminal NORs in only one chromosome pair (Eler et al. 2007; Takagui et al. 2017a; Takagui et al. 2017b; Baumgärtner et al., 2018). These features remain conserved within the members of Auchenipteridae, which is the sister group of Doradidae (Lui et al. 2009; 2010; 2013a; 2013b; 2015) and in all species of Wertheimerinae subfamily (Eler et al. 2007; Present study). In the other thorny catfishes, this hypothetically ancestral pattern occurs in most species already karyotyped, but exceptions were described in *T. paraguayensis* and *Anadoras* sp. “araguaia”, which have $2n=56$ originated from centric fusions (Baumgärtner et al., 2018) and the in *O. punctata* with a karyotype composed by 66 chromosomes merged due to centric fissions (Takagui et al. 2017a).

Wertheimerinae species here analyzed had syntenic rDNA, this unusual condition has already been observed in *P. armatulus*, *R. dorbignyi* and *Ossancora eignemanni* (Baumgärtner et al., 2018), being that in the six species the synteny was observed in a small subtelocentric pair and that can be considered a homeologue chromosome. According to Martins & Galetti Jr. (2001), the presence of ribosomal genes in different chromosomes pairs is the most common arrangement in fish. In Siluriformes, the syntenic rDNA is seldom described in different groups, but in some families, as in Tricomycetidae and Loricariidae, the synteny is considered a primitive condition (Ziemniczak et al., 2012).

Despite the low variation in diploid number and chromosome morphology, the C-banding pattern is divergent among species of Wertheimerinae. The differential

heterochromatin dispersion is certainly the main mechanism related to the karyotypic diversification of Wertheimerinae species; thus, it is possible to identify at least three events of great importance for this process: (1) increase of heterochromatin (*W. maculata* had few blocks, followed by *K. bahiensis* and *F. marmoratus*); (2) transposition or translocation of 5S rDNA segments from pair 22 to the short arm of the pair 19, giving rise to the multiple system shared by *K. bahiensis* and *F. marmoratus*; (3) a second event of heterochromatin amplification, which has increased and reorganized the repetitive DNAs in *F. marmoratus*.

Two groups of TEs are the most studied among Siluriformes: TC1-mariner (Gouveia et al., 2017) and *Rex* retrotransposable elements (elements of Class I that transpose via RNA intermediate), both exhibited a dispersal pattern and can be found in euchromatic and mainly in heterochromatic regions (Ferreira, 2011; Szczepanski et al., 2013). In the present study, FISH evidenced *Rex3* retrotransposon sites disperse in many chromosomes of Wertheimerinae species and suggests that this repetitive element played a key role in the increase and reorganization of heterochromatin observed between these two species. However, not all heterochromatin exhibited homology with this element. In *K. bahiensis*, the chromosomes 4 and 13, exhibited only a small portion of the blocks constituted by *Rex3*, which leads us to believe that other types of repetitive sequences are present and contributed to the karyotype evolution of this group.

Retrotransposons can be inserted into any genomic region; however, in several Neotropical fishes, these elements have been mainly found in association with the rDNA sites (Borba et al., 2013; Gouveia et al., 2017; Schneider et al., 2013; Szczepanski et al., 2013). In Wertheimerinae, for example, *Rex3* was detected in synteny with rDNA sites on short arm of pair 22. Thus, it is possible that *Rex3* retrotransposon has acted as a scattering agent of rDNA 5S sequences, contributing to the origin of the multiple condition, which is an important cytotoxic feature, shared between *K. bahiensis* and *F. marmoratus*. However, in order to

better understand the origin of this multiple condition, it is necessary to characterize the rDNA 5S sequence. This region usually presents different repetitive DNA types (microsatellites, LINES, SINES, TC1-mariner) in its NTS (Gouveia et al., 2017), as well *Rex3*, and they may also facilitate the displacement of these sites, either by transposition or facilitating non-reciprocal translocations during the interphase.

The role of vicariant events and headwaters stream-captures in chromosome speciation of Wertheimerinae

According to Ribeiro (2006), the current ichthyofaunistic composition of the Brazilian coastal basin reflects the interaction between two factors: (i) vicariant events linked to sea level fluctuations (transgressions/regressions) occurred in the last Pleistocene and (ii) headwaters stream-captures, which allowed the exchange of the ichthyofauna between the São Francisco River with the eastern coastal basin. In fact, the Wertheimerinae species are geographically isolated; even so, *W. maculata* and *K. bahiensis* occur in the same watersheds, these two species are separated by four intermediate hydrographical basins: Contas, Cachoeira, Almada and Una (Figure 1), and members of this subfamily was reported in none of them (Camelier et al., 2015). The populations of *F. marmoratus* are isolated from the others species, due to the presence of the Espinhaço complex, a vast mountain chain that along the 1,000 km separates the the São Francisco River basin from the eastern coastal basin (Buckup, 2011).

The geographical distribution associated to the karyotypic divergences in heterochromatin and 5S rDNA observed among *W. maculata*, *K. bahiensis* and *F. marmoratus* are evidences that support the hypothesis of allopatric speciation. Indeed, the diversification of many species of the Brazilian eastern coastal drainage occurred by successive vicariant process (Ribeiro, 2006). The relatively small areal extent of river basins,

combined with expansions and contractions due to Pleistocene shoreline fluctuations, may have acted in concert to elevate speciation and extinction rates in this region (Beheregaray et al., 2002).

Thus, it can be assumed that the ancestor, through which the present Wertheimerinae diversified at a given time, was widely distributed in this coastal basin; however, successive marine transgressions promoted its fragmentation and originated isolated populations. Faced with this geographic isolation, the populations underwent different evolutionary mechanisms, and in most of the coastal microbasins they were extinct, remaining only in the Jequitinhonha - Pardo Rivers (which during the Pleistocene were still connected) and Paraguaçu. Favorable environmental conditions for development and due to different selective pressures allowed the accumulation of genetic and morphological divergences, which contributed to the speciation between *W. maculata* and *K. bahiensis*. Considering the greater karyotype similarity between *K. bahiensis* and *F. marmoratus*, it is probable that headwater stream-captures occurs between Paraguaçu and Itapicuru or Vaza-Barris Rivers that are ancient tributaries of the São Francisco River (Costa, 2001), which allowed the ancestor of these two species to expand their territory towards the São Francisco River.

Final Remarks

Cytogenetic data reinforce the inclusion of *F. marmoratus* in Wertheimerinae and clearly established the strong relationship of this species with *K. bahiensis*. The three species have 58 chromosomes $24m + 12sm + 8st + 14a$ and syntenic rDNAs on pair 22, while the heterochromatin pattern exhibited an intense reorganization associated with the saltatory activity of transposable elements, so that retrotransposon *Rex3* probably plays an important

role. These chromosomal changes clearly demonstrate an allopatric speciation process, being that the three species occurring in non-overlapping geographical areas. In fact, some biogeographic studies show that during different moments, geomorphological alterations occurred in the Espinhaço Complex that made possible the exchange between the ichthyofauna of the São Francisco River and the Eastern coastal drainages, so our results represent another evidence that corroborates this hypothesis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Biologia Geral for providing the laboratory infrastructure to carry out this work; ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), for permitting the collection of biological material. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Finance Code 001 and Fundação Araucária.

References

Almeida, F.S., Fungaro, M.H.P. & Sodr , L.M.K. (2001). RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes, Pimelodidae) from the Tibagi River. *Brazilian Journal of Zoology*. doi:10.1017/S0952836901000103.

- Arce, M.H., Reis, E.R., Geneva, A.J., Sabaj, P.H.M. (2013). Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes:Doradidae). *Molecular Phylogenetics Evolution*, 67:560-577. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2013.02.021>.
- Barros, A.V., Wolski, M.A., Nogaroto, V., Almeida, M.C., Moreira-Filho, O., Vicari, M.R. (2017). Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role?. *Gene*, 608: 20-27. doi:10.1016/j.gene.2017.01.013.
- Baumgärtner, L., Paiz, L.M., Margarido, V.P., Portela-Castro, A.L.B. (2016). Cytogenetics of the thorny catfish *Trachydoras paraguayensis* (Eigenmann & Ward, 1907), (Siluriformes,Doradidae): evidence of pericentric inversions and chromosomal fusion. *Cytogenetics and Genome Research*,1:201-206. doi:10.1159/000448126.
- Baumgärtner, L., Paiz, L.M., Takagui, F.H.T., Lui, R.L., Moreira-Filho, O., Giuliano-Caetano, L., Portela-Castro, A.L.B., Margarido, V.P. (2018). Comparative Cytogenetics Analysis on Five Genera of Thorny Catfish (Siluriformes, Doradidae): Chromosome Review in the Family and Inferences About Chromosomal Evolution integrated with Phylogenetics Proposals. *Zebrafish*, 15: 270-278. doi:10.1089/zeb.2017.1554.
- Beheregaray, L.B., Sunnucks, P., Briscoe, D.A. (2002). A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in Southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences*, 269: 65-73. doi:10.1098/rspb.2001.1838.

- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genetica*. 1: 103-120.
- Birindelli, J.L.O. (2014). Phylogenetic relationships of the South American Doradoidea (Ostariophysi: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology*, 1:451-564. doi:10.1590/1982-02024-20120027 .
- Borba, R.S., da Silva, E.L., Parise-Maltempi, P.P. (2013). Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in *Leporinus* Spix, 1829 species (Characiformes: Anostomidae) and its relationships among heterochromatic segments and W sex chromosomes. *Mobile Genetic Elements*, 3: 1-6. doi:10.4161/mge.27460.
- Buckup, P.A. (2011). The Eastern Brazilian Shield. In: Albert, J.S. & Reis, R.E. (eds). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley: University of California Press. 1:203-209.
- Camelier, P., Zanata, A.M. (2015). Biogeography of freshwater fishes from the Northeastern Mata Atlântica freshwater ecoregion: distribution, endemism and area relationships. *Neotropical Ichthyology*, 12: 683-698. doi: 10.1590/1982-0224-20130228.
- Costa, W.J.E.M. (2001). The Neotropical annual fish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. *Ichthyological Explorer Freshwaters*, 12(4):333-383.

- Eler, E.S., Dergam, J.A., Venere, P.C., Paiva, L.C., Miranda, G.A., Oliveria, A.A. (2007). The karyotypes of the thorny catfishes *Wertheimeria maculata* Steindachner, 1877 and *Hassar wilderi* Kindle, 1895 (Siluriformes: Doradidae) and their relevance in doradids chromosomal evolution. *Genetica*, 130: 99-103. doi:10.1007/s10709-006-0023-4.
- Fricke, R., Eschmeyer, W.N. & Fong, J.D. (2018). *Catalog of Fishes*. Retrieved from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>.
- Fenocchio, A.S., Jorge, L.C., Venere, P.C., Bertollo, L.A.C. (1993). Karyotypic characterization and nucleolus organizer regions in three species of Doradidae (Pisces, Siluriformes). *Brazilian Journal of Genetics*, 4:1097–1101.
- Ferraris, C.J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalog primary types. *Zootaxa* (1):1-628.
- Ferree, P.M., Barbash, D.A. (2009). Species-specific heterochromatin prevents mitotic chromosome segregation to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *PLoS Biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.1000234.
- Ferreira, D.C., Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Foresti, F. (2011). Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mobile Genetic Elements*, 1: 112-117. doi:10.4161/mge.1.2.16731.

- Gouveia, J.G., Wolf, I.R., Vilas Boas, L., Heslop-Harrison, P., Schwarzacher, T., Dias, A.L. (2017). Repetitive DNA in the Catfish Genome: rDNA, Microsatellites and Tc1-Mariner Transposon sequences in *Imparfinis* species (Siluriformes, Heptapteridae). *Journal of Heredity*, 108: 650-658. doi:10.1093/jhered/esx065.
- Hatanaka, T., Galetti, P.M. (2004). Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 122: 239-244.
- Higuchi, H.A. Britski, H. & Garavello J.C. 1990. *Kalyptodoras bahiensis*, a new genus and species of thorny catfish from northeastern Brazil (Siluriformes, Doradidae). *Ichthyological Explorer Freshwaters*. 1(3):219-225.
- Hughes, S.E., Hawley, R.S. (2009). Heterochromatin: a rapidly Evolving species Barrier. *PLoS Biology*, 7:e1000233. doi: 10.1371/journal.pbio.1000233.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52: 201-220. doi:10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- Lui, R.L., Blanco, D.R., Margarido, V.P., Moreira-Filho, O. (2009). First description of B chromosome in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the Sao Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron*, 552– 559. doi:10.1016/j.micron.2009.03.004.

- Lui, R.L., Blanco, D.R., Margarido, V.P., Moreira-Filho, O. (2010). Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftedwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of Linnean Society*, 648–656. doi:10.1111/j.1095-8312.2009.01389.x.
- Lui, R.L., Blanco, D.R., Moreira-Filho, O., Margarido, V.P. (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry*, 87: 433–438. doi:10.3109/10520295.2012.696700.
- Lui, R.L., Blanco, D.R., Martinez, J.F., Margarido, V.P., Venere, P.C., Moreira-Filho, O. (2013a). The role of chromosomal fusion in the karyotypic evolution of the genus *Ageneiosus* (Siluriformes:Auchenipteridae). *Neotropical Ichthyology*, 327–334. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252013005000004.
- Lui, R.L., Blanco, D.R., Margarido, V.P., Troy, W.P., Moreira-Filho, O. (2013b). Comparative chromosomal analysis and evolutionary considerations concerning two species of genus *Tatia* (Siluriformes, Auchenipteridae). *Comparative Cytogenetics*, 63–71. doi: 10.3897/CompCytogen.v7i1.4368.
- Lui, R.L., Blanco, D.R., Traldi, J.B., Margarido, V.P., Moreira-Filho, O. (2015). Karyotypic variation of *Glanidium ribeiroi* Haseman, 1911 (Siluriformes, Auchenipteridae) along the Iguazu river basin. *Brazilian Journal of Biology*, 75: 215-222. doi: http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.10714
- Margarido, V.P., Moreira-Filho, O. (2008). Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae).

Genetics Molecular Biology, 31:235–238. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572008000200012>.

Martins, C., Galetti, P.M. (2001). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a general rule for fishes?. *Genetica*, 111: 439-446. doi: 10.1023/A: 1013799516717.

Martins, C., Galetti, P.M. (1999). Chromosomal Localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7:363–367.

Milhomem, S.S.R., Souza, A.C.P., Nascimento, A.L., Carvalho, J.R., Feldberg, E., Pieczarka, J.C. (2008). Cytogenetic studies in fishes of the genera *Hassar*, *Platydoras* and *Opsodoras* (Doradidae, Siluriformes) from Jarı and Xingu Rivers. *Brazilian Genetics and Molecular Biology*, 31:256–260. doi:10.1590/S1415-47572008000200017

Molina, W.F., Alves, D.E.O., Araújo, W.C., Martinez, P.A., Silva, M.F.M., Costa, G.W.W.F. (2010). Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. *Genetics and Molecular Research*, 14: 1807-1814. doi:10.4238/vol9-3gmr840.

Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A*, 83:2934-2938.

Resende, K.F.M. (2017). Karyotype Evolution: Concepts and Applications. In: Bhat TA, Wani AA, editors. *Chromosome Structure and Aberrations*. India: Springer 181-198.

- Ribeiro, A.C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 225-246. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252006000200009>.
- Rosa, R.S., Menezes, N.A., Britski, H.A., Costa, W.J.E.M. & Groth, F. (2004). Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga. In: Leal, I.R., Tabarelli, M. & da Silva, J.M.C. (eds). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife: EDUFPE 135 – 180.
- Schneider, C.H., Gross, M.C., Terencio, M.L., Carmo, E.J., Martins, C., Feldberg, E. (2013). Evolutionary dynamics of retrotransposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* in neotropical cichlid genomes. *BMC Evolutionary Biology*, 13:152. doi:10.1186/1471-2148-13-152.
- Sumner, A.M.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306. doi:10.1016/0014-4827(72)90558-7.
- Szczepanski, T.S., Vicari, M.R., de Almeida, M.C., Nogaroto, V., Artoni, R.F. (2013). Chromosomal Organization of Repetitive DNA in *Sorubim lima* (Teleostei;Pimelodidae). *Cytogenetics and Genome Research*, 141: 309-316. doi:10.1159/000353845.
- Takagui, F.H., Dias, A.L., Birindelli, J.L.O., Swarca, A.C., Rosa, R., Lui, R.L. Giuliano-Caetano, L. (2017a). First report of B chromosomes in three neotropical thorny

- catfishes (Siluriformes, Doradidae). *Comparative Cytogenetics*, 55–64. doi: 10.3897/CompCytogen.v11i1.10496.
- Takagui, F.H., Moura, L.F., Ferreira, D.C., Centofante, L., Vitorino, C.A., Bueno, V., Venere, P. (2017b). Karyotype diversity in Doradidae (Siluriformes, Doradidae) and presence of the heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in the family. *Zebrafish*, 14: 236–243. doi:10.1089/zeb.2016.1368.
- Volff, J.F., Bouneau, L., Ozouf-Costaz, C., Fischer, C. (2003). Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics*, 19:674–678. doi: 10.1016/j.tig.2003.10.006.
- Volff, J.N. (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94:280–294. doi: 10.1038/sj.hdy.6800635.
- Weitzman, S.H., Menezes, N.A. & Weitzman, M.J. (1998). Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: Heyer, W.R. & Vanzolini, P.E. (eds). *Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências 379-427.
- Ziemniczak, K., Barros, A.V., Rosa, K.O., Nogaroto, V., Almeida, M.C., Cestari, M.M., Moreira-Filho, O., Artoni, R.F., Vicari, M. (2012). Comparative cytogenetic of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Italian Journal of Zoology*, 79:492-501. doi: 10.1080/11250003.2012.676677.

Table 1 –Binary characters matrix constructed from cytogenetic markers (chromosome quantity and morphology, heterochromatin distribution and 18S rDNA and 5S rDNA patterns). These dataset was used to calculate the Euclidean distance index and for construction of the similarity dendrogram based on and the Paired group (UPGMA) algorithm clustering. (1) Presence (0) Absence.

CHARACTHERS	<i>W.MACULATA</i>	<i>K.BAHIENSIS</i>	<i>F.MARMORATUS</i>	<i>P.ARMATULUS</i>	<i>ANADORAS SP."ARAGUAIA"</i>
58 chromosomes	1	1	1	1	0
56 chromosomes	0	0	0	0	1
24 metacentric chromosomes	1	1	1	1	1
12 submetacentric chromosomes	1	1	1	0	0
8 subtelocentric chromosomes	1	1	1	0	0
14 acrocentric chromosomes	1	1	1	0	1
20 subtelocentric chromosomes	0	0	0	1	0
14 submetacentric chromosomes	0	0	0	1	0
10 submetacentric chromosomes	0	0	0	0	1
Heterochromatic blocks on both arms of pairs 4/5	1	1	1	1	0
Heterochromatic blocks on short arms of pair 16	1	0	0	0	0
Heterochromatic blocks on short arms of pair 17	1	0	0	0	0
Heterochromatic blocks on short arms of pair 22/25	1	1	1	1	0
Interstitial heterochromatic blocks on pair 2	0	1	0	0	0
Heterochromatic blocks on short arms of pair 19	0	1	1	0	0

Heterochromatic blocks on short arm and Interstitial position on the long arm of pair 13	0	1	0	0	0
Heterochromatic blocks on short arms of pair 15	0	0	1	0	0
Heterochromatic blocks on long arms of pair 10	0	0	1	0	0
Heterochromatic blocks on long arms of pair 13	0	0	1	0	0
Interstitial heterochromatin regions on pair 1	0	0	1	0	0
Interstitial heterochromatin regions on pair 5	0	0	1	0	0
Interstitial heterochromatin regions on pair 6	0	0	1	1	0
Interstitial heterochromatin regions on pair 14	0	0	1	0	0
Interstitial heterochromatin regions on pair 19	0	0	1	0	0
Heterochromatic blocks on long arms of pair 19	0	0	1	0	0
Heterochromatin blocks on short arms of pair 18	0	0	0	0	0
Heterochromatin blocks on short arms of pair 24	0	0	0	1	0
Heterochromatin blocks on short arms of pair 28	0	0	0	1	0
Heterochromatin blocks on short arms of pair 29	0	0	0	1	0
Interstitial heterochromatin regions on pair 6	0	0	0	1	0
Interstitial heterochromatin regions on pair 3	0	0	0	1	0
Heterochromatin blocks on short arms of pair 15	0	0	0	0	1

Heterochromatin blocks on short arms of pair 22 (acrocentric)	0	0	0	0	1
Heterochromatin blocks on long arms of pair 28	0	0	0	0	1
Pericentromeric heterochromatin regions on pair 1	0	0	0	0	1
18S rDNA sites in terminal position of short arm of pair 22/25	1	1	1	1	0
18S rDNA sites in terminal position of long arm of pair 28	0	0	0	0	1
5S rDNA sites on short arm of pair 19 (subtelocentric)	0	1	1	0	0
5S rDNA sites on short arm of pair 18 (submetacentric)	0	0	0	1	0
5S rDNA sites on short arm of pair 15 (submetacentric)	0	0	0	0	1
18S and 5S rDNA sites in synteny on short arm of pair 22/25	1	1	1	1	0

Table 2 – Euclidean distance values among Wertheimerinae species and outgroups.

	<i>W. maculata</i>	<i>K. bahiensis</i>	<i>F. marmoratus</i>	<i>P. armatulus</i>	<i>Anadoras sp.</i> “ <i>araguaia</i> ”
<i>W. maculata</i>	0				
<i>K. bahiensis</i>	2,4494897	0			
<i>F. marmoratus</i>	3,6055513	3,3166248	0		
<i>P. armatulus</i>	3,8729833	4,1231056	4,6904158	0	
<i>Anadoras sp.</i> “ <i>araguaia</i> ”	3,8729833	4,1231056	4,8989795	4,6904158	0

CAPÍTULO 2

“Species delimitation of thorny catfishes *Anadoras* (Doradidae-Astrodoradinae): an integrative analysis based on Chromosomal markers and DNA barcoding”.

Fábio Hiroshi Takagui¹; Lucas Baumgärtner²; Patrik Viana³; Moema C.C. Lima⁴; Jamille A. Bitencourt⁵; Roberto Laridondo Lui²; Paulo Venere⁶; Eliana Feldberg³; Fernanda Almeida Simões⁴ and Lucia Giuliano-Caetano¹.

Authors affiliations:

1. Animal Cytogenetics Laboratory; Department of General Biology; CCB; Londrina State University. Celso Garcia Cid Highway, PR 445, km 380, Londrina-Brazil.

2. Cytogenetic Laboratory; Center for Biological and Health Sciences; State University of Western Paraná. Universitária street 2069, Cascavel-Brazil.

3. Animal Genetics Laboratory; National Institute of Amazonian Research. Manaus-Brazil.

4. Genetics and Animal Ecology Laboratory; Department of General Biology; CCB; Londrina State University. Celso Garcia Cid Highway, PR 445, km 380, Londrina-Brazil.

5. Cytogenetic Laboratory; Department of Biological Sciences; State University of Southwest of Bahia. Jose Moreira Sobrinho Avenue, Jequié, Bahia – Brazil.

6. Laboratory of Animal Cytogenetics and Genetics; Federal University of Mato Grosso. Cuiaba-Brazil.

*Esse artigo será enviado para a revista **Hydrobiologia**

Abstract

Anadoras genus is widely distributed throughout the Amazonian and Paraguay river basins, however only two species are formally recognized: *Anadoras grypus* and *Anadoras weddellii*, which likely reflects an underestimated knowledge regarding the diversity in this group. Here, we applied an integrative approach, using chromosomal data, DNA barcoding and four species delimitation algorithms, aiming to investigate the taxonomic status and relationships for *Anadoras* species. For that, we performed in *Anadoras*' species an extensive chromosomal characterization using conventional and molecular cytogenetic procedures, which proved to be efficient only to differentiate *A. grypus* from their congeners, and similarly to morphological approaches, few diagnostic characters could be detected between *A. weddellii* and *Anadoras* sp. "araguaia". In this sense, the species delimitation algorithms based on DNA Barcode data successfully identified the existence of three molecular operational taxonomic units (MOTUs), strongly warranted after Bayesian Inference (BI) and maximum likelihood (ML) analyzes. These results showed low genetic and karyotypic divergence between *A. weddellii* collected in Miranda and Cuiaba rivers; an intrapopulation polymorphism of NOR sites in *A. grypus* and confirm that the *Anadoras* sp. "araguaia" is a valid specie. Our data encourage the description of these new species and assure the importance of cytogenetic and DNA barcoding approaches for biodiversity assessment, mainly in endemic regions threatened by anthropogenic activities, such as the case of Upper Araguaia River.

Key-words: Cytotaxonomy;COI; Karyotypes; Heterochromatin; rDNAs;

Introduction

The morphological characters has been a consensus in the choice as taxonomic criteria for species delimitation for many taxonomists over decades (Higuchi et al., 1992; Fichberg & Chamon, 2008; Birindelli & Sabaj-Perez, 2011; Jardulli & Shibatta, 2013; Birindelli, 2014). However, it is worthwhile emphasize that morphological characters, although useful in many circumstances, they require long time to become stable across lineages (Dayrat, 2005), then, the taxonomy must be pluralistic and integrative to provide a real overview regarding the biodiversity (Will et al., 2005; Pante et al., 2015).

Advances in fine-scale molecular and bioinformatic techniques, such as DNA barcoding have been acting as useful tools in the resolution of taxonomic ambiguities in several vertebrate groups (Herbert et al., 2003a; 2003b; 2004a; 2004b; Ward et al., 2005; Piggott et al., 2011; Souza-Shibatta et al., 2013; 2018). For instance, new methodological tools in DNA barcoding analysis available in online platforms, have been used to ensure data reliability, such as BINs, ABGD, bPTP and GMYC (Barreto et al., 2015). These methods usually provide congruent results and are effective in the identification of species, including fish (Brandão et al, 2016; Souza et al., 2017; Souza-Shibata et al., 2018; Carvalho et al. 2018; Serrano et al., 2018).

The use of molecular and association within cytogenetic tools in an integrative approach, may provide relevant information regarding the process of species differentiation in groups with complex and cryptic taxonomy, as already seen in some fish species (Ferreira et al., 2017; Prizon et al., 2017; Ussó et al., 2018). However, the main limitation of this integrative approach is due the fact that in many fish groups, this kind of information are not extant and when available limited to few species, as in the case of thorny catfishes of Doradidae Family. This family comprises 94 recognized species (Froese & Pauly, 2018) widely distributed throughout South America, being commonly known as arnaus, abotoados,

thorny catfishes, among others. They are easily recognized by the presence of a row of retracted spines formed from the hypertrophy of the lateral line tubules and by exhibiting a cephalic shield and well-developed spines in the dorsal and pectoral fins (Ferraris, 2007; Birindelli, 2014).

The subfamily Astrodoradinae was first proposed by Higuchi et al., (2007) and later recognized by Sousa, (2010), in a huge taxonomic revision, using morphological characters and recognizing 21 species distributed in seven genera: *Anadoras*, *Achanthodoras*, *Agamyxis*, *Amblyodoras*, *Scorpiodoras*, *Hypodoras* and *Astrodoras*. The *Anadoras* genus show a wide geographic distribution, however only two species are formally described: *Anadoras grypus* Cope 1872 which occurs in the Upper and Middle Amazonas river and *Anadoras weddellii* Castelnau, 1855 described for Mamore, Guapore, Madeira, Jari, Oiapoque rivers, in the Lower Amazonas river, as well as in the Pantanal basin.

A third candidate specie (a set of organisms identified as a putative new species) occurs in the Upper Araguaia river basin and was provisionally named as *Anadoras* sp. “araguaia” (Sousa, 2010; Arce et al., 2013). The Araguaia-Tocantins rivers basin, is one of the most important brazilian hydrographic systems, which houses a diverse fish fauna closely related to the Amazon basin, especially in the lower course (Goulding et al., 2003), but also home to many endemic species, especially in its Upper portion nearly to their waterheads (Claro & Shibatta, 2013; Jardulli et al., 2014). Additionally, about 80% of this hydrographic system is located in the Cerrado biome, which although it is considered a biodiversity hotspot, is one of the 25 most threatened ecosystems on the planet (Mittermeier et al., 1999). In this sense, the expansion of agricultural frontiers, introduction of exotic species and construction of hydroelectric dams are the main anthropogenic activities that threaten the itiofaunistic biodiversity of Araguaia-Tocantins hydrographic basin (Ferreira & Tokarski, 2007).

As, *Anadoras* sp. "araguaia", many other species of Araguaia-Tocantins basin remains undescribed or with undefined taxonomic status, which makes it difficult to estimate the biodiversity of this region, as well as to elaborate management strategies and conservation of this fish fauna (Claro & Shibatta, 2013). Considering the absence of DNA barcoding data for *Anadoras* sp. "araguaia" and their high morphological similarity with *A. weddelli*, the present study consists in a comparative analysis including all *Anadoras* species, using cytogenetic markers and species delimitation algorithms. Based in this interactive approach, its expected to answer the following questions: *Anadoras* sp. "araguaia" is really a valid species or simply a interpopulational variation of *A. weddelli*? Also, are DNA barcoding analysis together the cytogenetic data efficient in the delimitation of taxonomic units in the *Anadoras* genus?

Material and Methods

Species and collection sites

In this study we analyzed *A. grypus* (3 females and 2 males) from Catalão Lake, Manaus City, Amazonas State – Brazil (3°09'49.8"S 59°54'47.5"W) and two populations of *A. weddelli* from temporary lagoons of Miranda River (4 females and 5 males), Corumbá City, Mato Grosso do Sul State - Brazil (19°31'24.96"S 57°02'25.51"W) and Cuiabá river, Cuiabá, Mato Grosso State-Brazil (16°12'46.12"S 55°59'09.05"W). The *Anadoras* sp. "araguaia" (5 females and 3 males) was collected in a marginal lagoon of Medo stream, a small tributary of Araguaia River basin, in São Miguel do Araguaia City, Goiás State, Brazil (3°07'06,6'' S 50°26'55,9''W) (**Fig.1**).

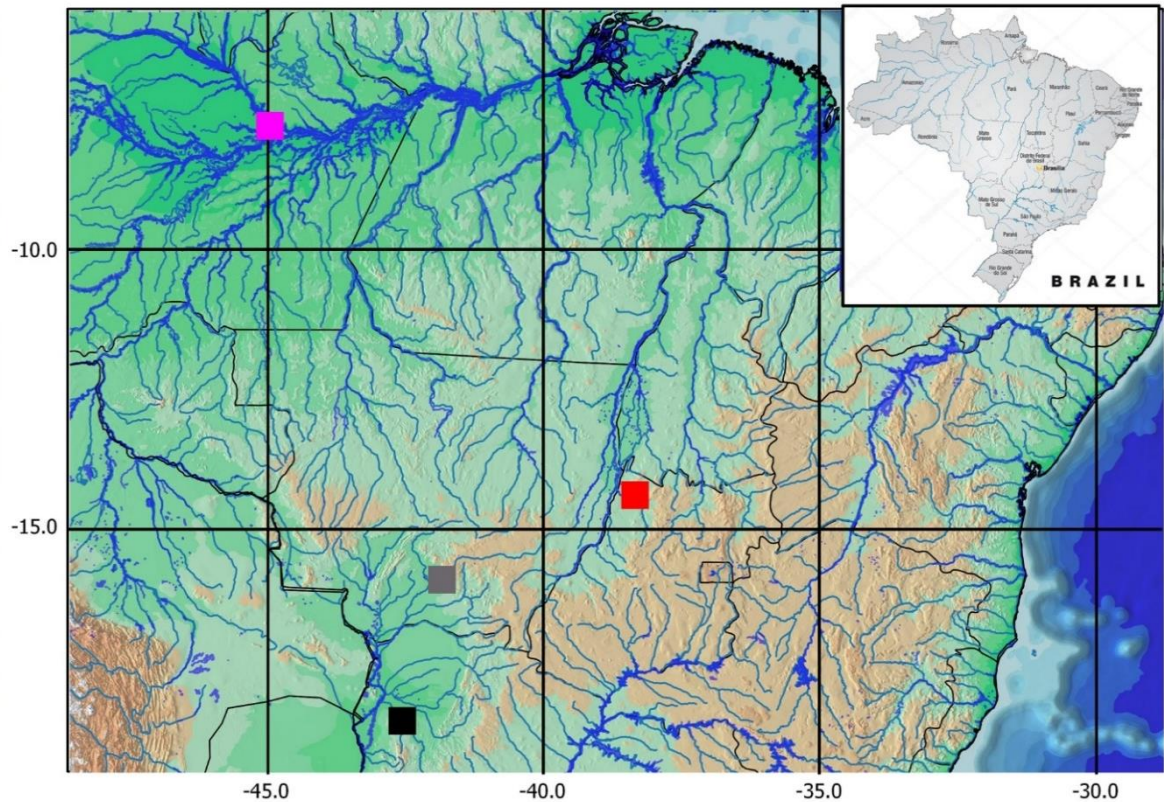


Figure 1 - Topographic map showing the localities where the *Anadoras* species was collected. *Anadora grypus* was collected in Catalão Lake, in Central Amazon basin (Pink square); *Anadoras* sp. "araguaia" was collected in a marginal Lagoon near to Medo stream a small tributarie of Araguaia river (Red square); *Anadoras weddellii* was collected in two different points in Paraguay river basin: marginal lagoon of Cuiaba river (Gray square) and in marginal lagoons of Miranda river (Black square).

The collection of specimens was under authorization of ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). After processing and subsequent fixation of the material, the specimens were deposited in the Museum of Zoology of the Londrina State University (MZUEL) under the voucher numbers MZUEL17811 (*A. grypus*) and MZUEL11085 (*A. weddellii*). The *Anadoras* sp. "araguaia" specimens are deposited in Museum of Zoology of the Sao Paulo University (MZUSP) under the voucher MZUSP110809 (**Fig.2**).

The experiments were performed accordingly to Ethics Committee for Animal Use of the Londrina State University, under the protocol number 60/2017.

Probes for Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) Experiments

The Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) was performed according to Pinkel et al., (1986). The rDNA probes was obtained by Mini-Prep (extraction of plasmidial DNA), being that 18S rDNA probe from *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti, 2004) and 5S rDNA from *Megaleporinus elongatus* (Martins & Galetti, 1999). The telomeric (TTAGGG)_n probe was prepared by PCR, following Ijdo et al., (1991).

The rDNA probes were labelled by nick translation (Roche®) (according to the manufacturer's instructions) using biotin-16-dUTP and digoxigenina-11-dUTP. Whereas the telomeric probes were labeled by PCR using digoxigenin-11-dUTP. Hybridizations were carried out under high stringency (77%), except for telomeric probes which were mapped by FISH with low stringency (52%). The detection of the signals were performed using anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) and biotinylated anti-avidin (Sigma-Aldrich). The chromosomes were counterstained with fluorochrome 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI, 50µg/ml).

The high-resolution fluorescence in situ hybridization on stretched DNA (Fiber-FISH) was performed according to protocol described by Barros et al., (2011), aiming to thoroughly investigate the organization of syntenic 18S and 5S rDNAs in *Anadoras grypus*.

Similarity dendrogram using Cytogenetic data

We constructed ideograms and a matrix of presence and absence based on 25 cytogenetics characters including diploid number, chromosome morphology, heterochromatin distribution and 18S and 5S rDNA pattern (**Table 1**). This matrix was used for a cluster analysis using the program *Past* based on Euclidean distances according to Tenorio et al., (2013).

Extraction of total DNA, amplification and sequencing of Cytochrome Oxidase subunit I (mtDNA COI) gene

Genomic DNA was extracted from muscle and liver tissue (stored in absolute ethanol) of *Anadoras* species, according to phenol-chloroform method described by Almeida et al., (2001). A fragment of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers: FishF1 (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') and FishR1 (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') (Ward et al., 2005). For sequencing reaction, it was used a "Big Dye Sequence Terminator" kit (Applied Biosystems), following the manufacturer instructions. The amplification conditions consisted of 25 cycles at 96°C for 30 seconds; 15 seconds at 50°C; and 4 minutes at 60°C. After the reaction, the products were precipitated and the reading performed using the sequencer model ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer from Applied Biosystems/made by HITACHI.

Sequence Alignment and Phylogenetic Analysis

In this study a total of 16 sequences of COI gene (Forward) were analyzed, including 11 new sequences from *Anadoras* species (Table 2), 3 sequences obtained from Genebank: *A. weddellii* (KC555592) from Lower Amazon river, *Anadoras grypus* (KC555591), *W. maculata* (KC555709) from Jequitinhonha river and 1 sequence from *Platydoras armatulus* (GBGCA8981-15), obtained from BOLD (Barcode of Life Data System). *W. maculata* and *P. armatulus* were used as outgroups. The dataset with 604pb were aligned on BioEdit Sequence Alignment Editor 7.1.9. (Hall, 1999) using the Clustal W tool. In MEGA v. 6 program (Tamura et al., 2011) the sequences were translated generating intra/interspecific genetic distances matrices, besides the construction of the Neighbor Joining

(NJ) tree, based on the nucleotide substitution model Kimura-2-Parameters (K2P) (Kimura, 1980) and 1000 bootstrap replicates.

To verify the groupings between sequences and their degree of reliability, phylogenetic reconstructions were carried out by means of Bayesian inference and Maxime Likelihood using the software Mr. Bayes 3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) and RAxML-HPC BlackBox 8.2.10, respectively. For the reconstruction of BI, two independent series with 4 chains were used: Markov and 10.000.000 generations, with 10% of burn-in. and nucleotide evolution model HKI+I obtained in the jModelTest v2.1.6 (Darriba et al. 2012) as implemented in the CIPRES Science Gateway 3.3 (<http://www.phylo.org/index.php/portal/>). These analyzes was verified in the Tracer v. 1.6 (Rambaut et al., 2013). The generated trees were edited in the FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2014) and in the Adobe Photoshop CC v.14.0 for the construction of a consensus tree.

The bar codes obtained here were submitted to an analysis of algorithms for the identification of potential species. For the Automatic Barcode Gap Discover (ABGD) (Puillandre et al., 2012) a matrix of distance pairwise, obtained in the MEGA v. 6 (Tamura et al., 2011), in a free online platform (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>). For the use of the other algorithms a subset of the data was constructed, containing one sequence for each haplotype. As an input file for the Bayesian Poisson Tree Process (bPTP) (Zhang et al., 2013) and Phylogenetic Map PTP (PhyloMap) algorithms (Zhang et al., 2011), a maximum likelihood phylogenetic tree was constructed in the RAxML- HPC BlackBox 8.2.10 and implemented in CIPRES. The first one adds to the branches of the input tree Bayesian inference support values, making the result even more reliable, while the second combines the analysis of the PTP (Poisson Tree Processes) with Principal Coordinate Analysis (PCoA) and discriminating species at from a rooted phylogenetic tree. Both are available on the free platform <https://species.h-its.org/>.

Results

Conventional staining, Chromosome Banding and FISH with rDNA probes

Anadoras weddellii: The diploid number found for this species was equal 56, distributed in $24m + 10sm + 22st/a$ for both sexes (**Fig.3a**). The C-banding technique revealed heterochromatic blocks on both arms of the pair 2, on short arm of the pair 15, long arm of the pair 17 and interstitially on the long arm of the pair 28 (**Fig.3b**). The FISH revealed two sites of 18S rDNA in terminal position on the long arm of pair 28 and two sites of 5S rDNA on short arm of pair 15 (**Fig.3c**).

Anadoras sp. “araguaia”: This species showed 56 chromosomes and the same karyotypic formulae described for *A. weddellii* (**Fig.3d**). The C-banding revealed few heterochromatic blocks, mainly on the short arms of the pair 15 and 20, as well as in the long arm of the pair 28 (**Fig.3e**). The FISH revealed sites of 18S rDNA in terminal position on the long arm of pair 28 and, sites of 5S rDNA on short arm of pair 15, similar to *A. weddellii* (**Fig.3f**).

Anadoras grypus: All specimens showed 56 chromosomes and karyotypic formula: $16m + 18sm + 22 st/a$ for both sexes (**Fig. 3g**). The C-banding pattern was located mainly in the terminal position on the long arm of the pairs: 3, 5, 7, 11, 19 and 20; on short arm of pair 11 and interstitially on the pairs 9 and 13 (**Fig. 3h**). FISH with rDNA probes revealed the coexistence of two patterns: (I) two specimens presented three 18S rDNA sites: two in terminal position coincident with secondary constriction on the short arm of pair 11, syntenic with interstitial 5S rDNA sites, and in terminal position on the long arm of only one chromosome from the 28 pair (**Fig.3i**) (II) three individuals exhibited only syntenic rDNA sites corresponding to the pair 11 (**Fig.3j**).

On the majority of the metaphases and nucleus was possible to detect the association between the chromosomes bearing the 18S rDNA sites (**Fig. 4a-boxed**), and often, one of the chromosomes of the pair 28, was associated to pair 11 (**Fig. 4a**). The NORs mapping revealed transcriptional activity in the three sites involving this region, as attested by FISH (**Fig. 4b**). Fiber-FISH with rDNA probes showed an adjacent organization of 18 and 5S rDNA sites on short arm of pair 11(**Fig. 4c**) and detected only 18S sites on chromosome 28 (**Fig. 4d**).

Hybridization *in situ* Fluorescent (FISH) using Telomeric probes

The mapping of telomeric motifs [TTAGGG]_n, evidenced in the three *Anadoras* species bright signals on all telomeric regions of the chromosomes and no Interstitial Telomeric Sites (ITS) (**Fig. 4e; Fig. 4f; Fig. 4g**).

Similarity dendrogram using Cytogenetic data

The cluster analysis based on chromosomal data enabled the construction of the similarity dendrogram shown in **Figure 5**. This analysis revealed synapomorphic and apomorphic features among the *Anadoras* species here analyzed, evidencing a karyotype similarity between *A. weddellii* and *Anadoras* sp. “araguaia”.

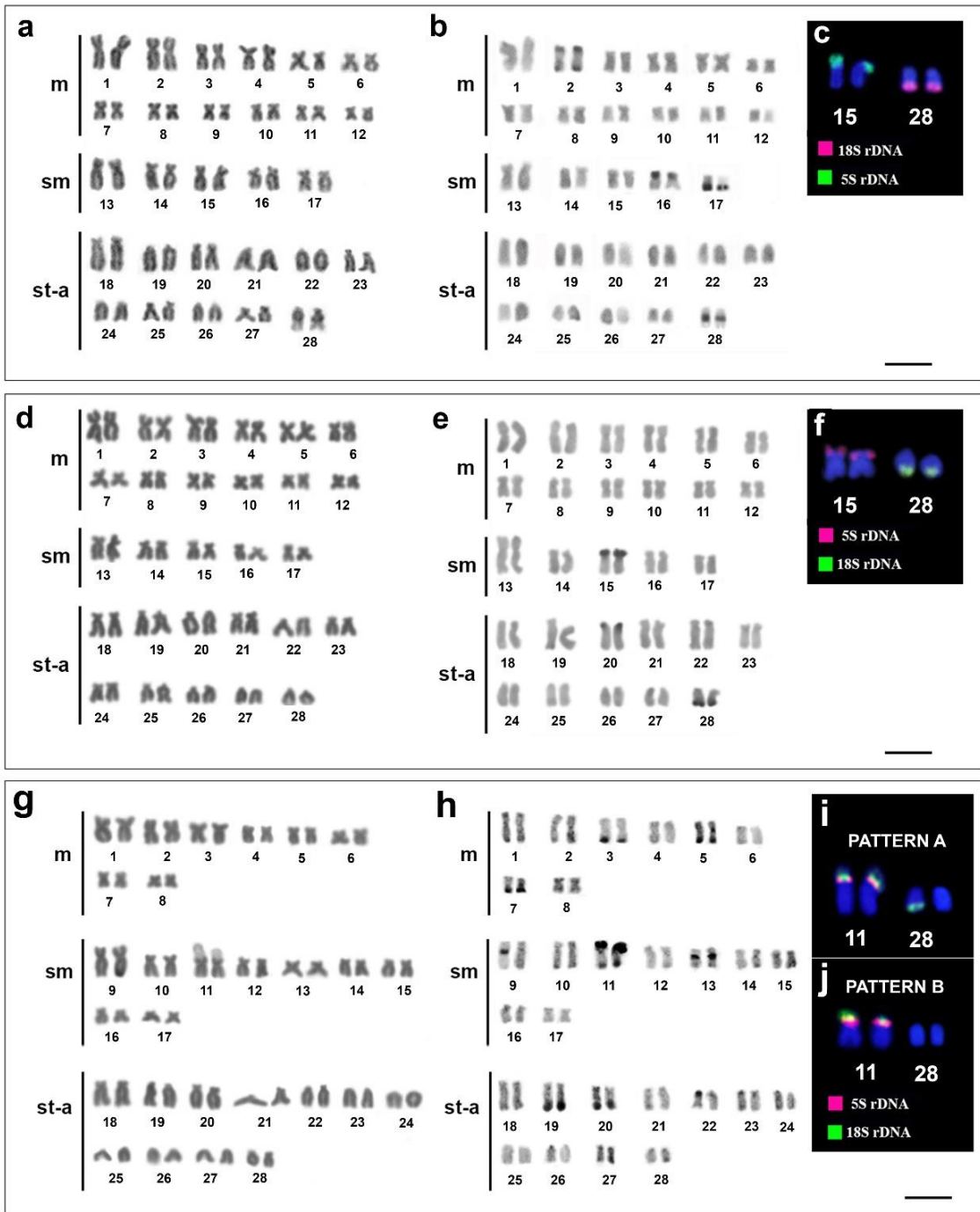


Figure 3 - Karyotypes of *Anadoras* species after conventional and molecular cytogenetics analysis: *A. weddellii* (a) Giemsa staining (b) C-banding (c) FISH with rDNAs probes; *Anadoras* sp. “araguaia” (d) Giemsa staining (e) C-banding (f) FISH with rDNAs probes; *A. grypus* (g) Giemsa staining (h) C-banding (i) (j) FISH with rDNAs probes, note the presence of two patterns of rDNAs, named **A** (only two sites of 18S rDNAs on short arm of pair 11) and **B** (Multiple sites of 18S rDNA). The scale bar corresponds at 10 μ m.

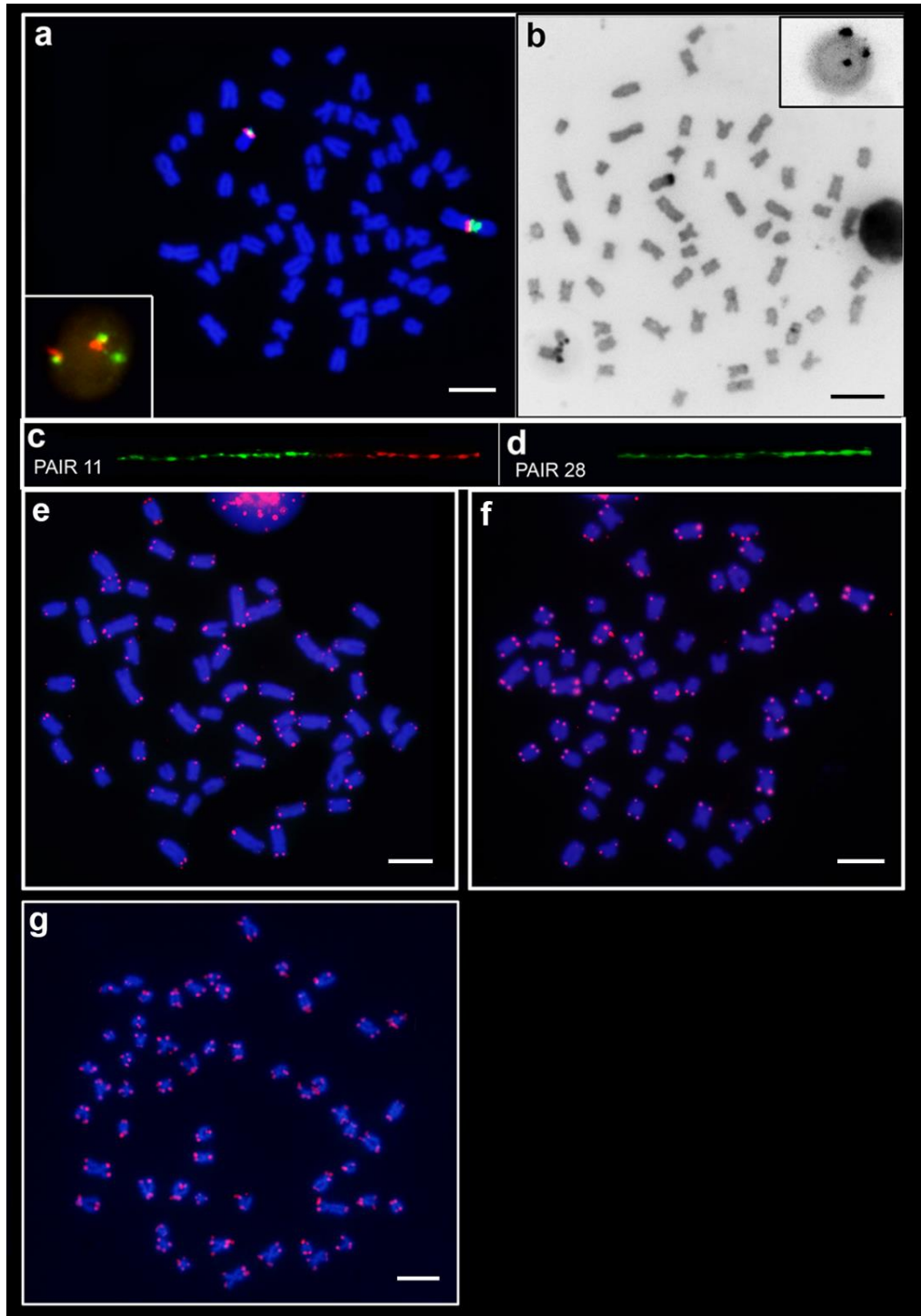


Figure 4 – Metaphasis of *Anadoras* species: (a) after double FISH with 18S (green signals) and 5S (pink signals) rDNAs probes showing the association between chromomes 11 and 28 in metaphasis and nucleus of *Anadoras grypus* (b) after Ag-NORs evidencing transcriptional activity in all NORs sites of *Anadoras grypus*; (c) Fiber-FISH with 18S (green) and 5S (red) rDNAs probes shows the adjascent organization on short arm of pair 11 and (d) the absence of 5S rDNA sites on chromosome 28; FISH with telomeric [TTAGGG] $_n$ in metaphasis of (e) *A. weddellii* and (f) *A. grypus*, (g) *Anadoras* sp. “araguaia”. The scale bar corresponds at 10 μ m.

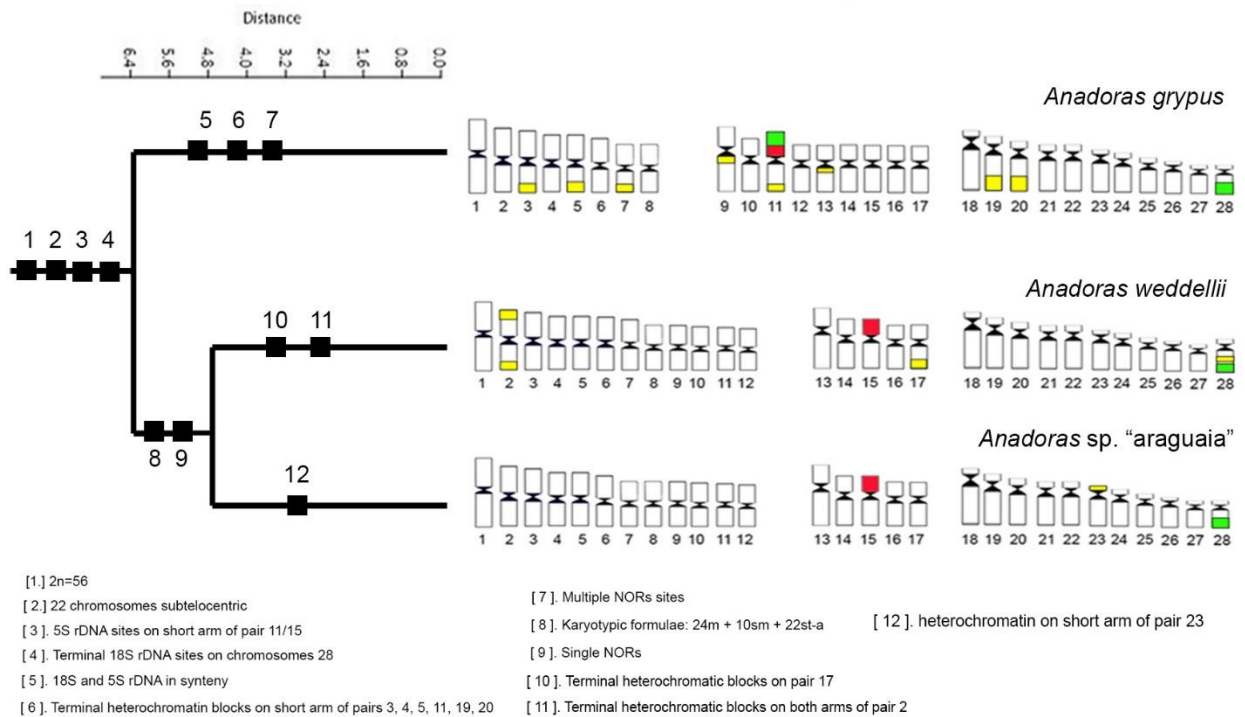


Figure 5 – Similarity dendrogram based on Euclidean distances constructed from 25 cytogenetic characters of *Anadoras* species. The colors means: Green=18S rDNA; Red=5S rDNA; Yellow=Heterochromatin; Black=Centromeres. The black squares indicates only some cytogenetic characters used for construction of this dendrogram.

DNA barcode (mtDNA COI) analyzes

The sequencing of COI gene from eleven *Anadoras* specimens and four sequences obtained from Genebank and BOLD systems, generated a dataset composed by 604 bp, where no deletions, insertions or stop codons were found, which means that this region corresponds to a functional portion of the COI gene.

The NJ tree as well as the reconstructions based on the MP and BI analyzes produced a similar topology, evidencing three clades (*Anadoras* sp. “araguaia”, *Anadoras weddellii* and *Anadoras grypus*) and two regarding the outgroups (*Weithermeria maculata* and *Platydoras armatulus*), with high support values in at least two of the analyzes (above 90% bootstrap and 0.9 posterior probability) (**Fig. 6**). These results were corroborated by all species delimitation algorithms used (ABGD, bPTP, PhyloMap, sPTP).

Among the congeneric species, the intraspecific genetic distance values were 0.4% and 0.5% in *A. weddellii* and *A. grypus*, respectively. While the interspecific distance ranged from 5.37% between *Anadoras* sp. “araguaia” and *A. weddellii*, to 6.65% between *Anadoras* sp. “araguaia” and *A. grypus*. The distances between genera ranged from 16.7% between *P. armatulus* and *W. maculata* to 22% between *P. armatulus* and *Anadoras* sp. “araguaia” (**Table 3**).

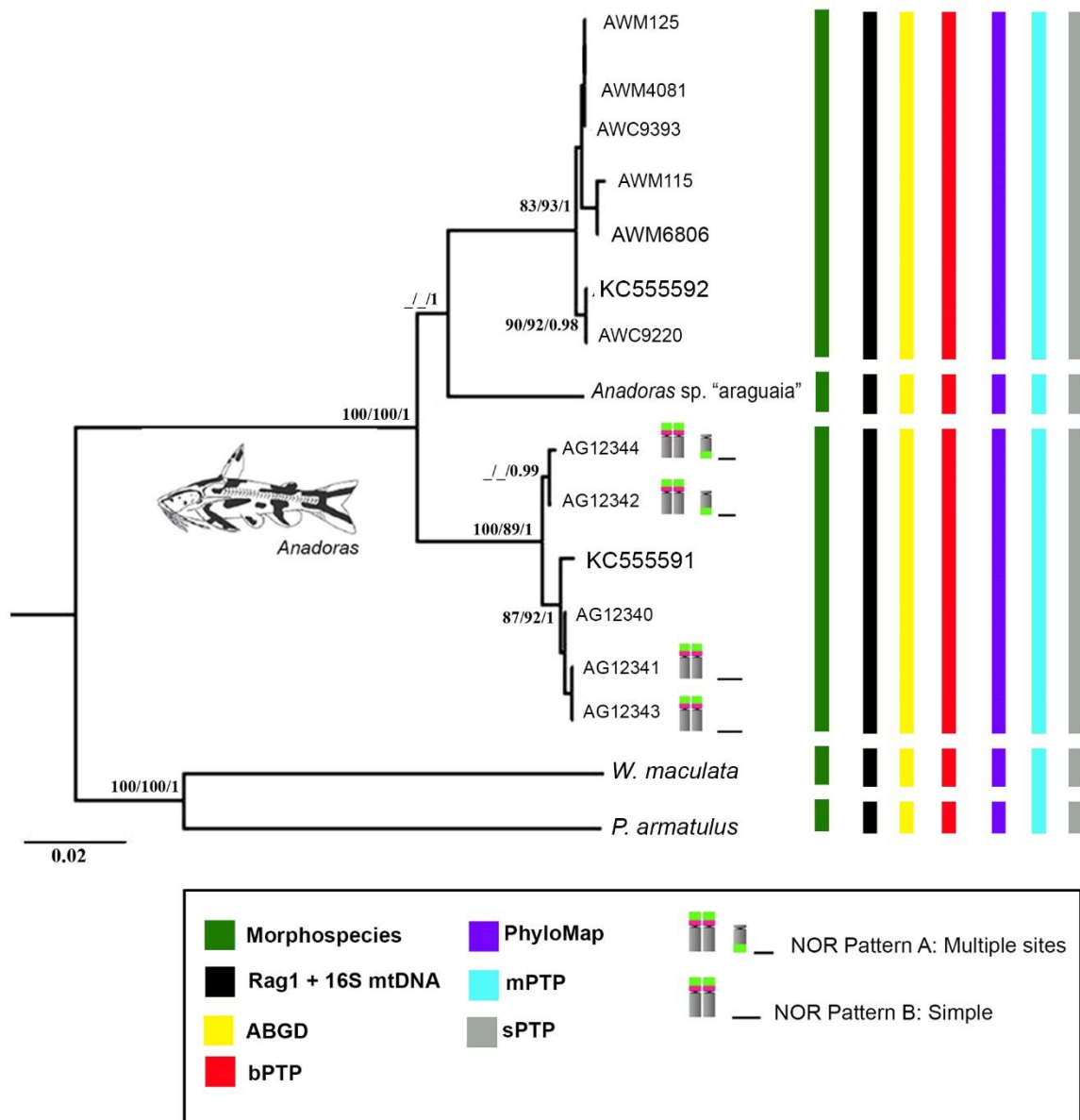


Figure 6 – Consensus tree (NJ neighbor-joining, ML maximum likelihood and BI Bayesian inference) based on COI sequences from samples of *Anadoras weddelli*, *A. grypus*, *Anadoras* sp. “araguaia” and related species *W. maculata* and *P. armatulus*. Only bootstrap (NJ, ML) and a posteriori probability (BI) values above 80% and 0.9, respectively, are shown on branches. The vertical bars indicate the results from the species delimitation analyses.

Discussion

At light of the traditional taxonomy, the two *Anadoras* species formally described: *A. grypus* and *A. weddellii*, can be easily discriminated by external and internal morphological features. However, few diagnostic characters was identified for validation of *Anadoras* sp. “araguaia”, which are morphologically very distinct to *A. grypus*, but shared many features with *A. weddellii*, of which differs only in the number of gill traces and in some osteological characters (Sousa, 2010) (**Fig. 2**). The traditional taxonomic approach, describe new taxa based only in morphological variations and geographical distribution, these method not always efficient, (as demonstrated in *Anadoras*) (Dayrat, 2005; Pante et al., 2015). In these sense, several kinds of molecular markers, including chromosomes, nuclear and mitochondrial genes have been associated with morphological data providing a broader understanding of biodiversity and phylogenetic relationships in different neotropical fishes (Souza-Shibata et al., 2013; Carvalho et al., 2018; Serrano et al., 2018)

Based on this assumption, the efficiency of two types of molecular markers: cytogenetic and DNA Barcoding were tested in these work, revealing interesting conclusions about the diversity and taxonomic status of *Anadoras* species. Regarding the cytogenetic aspects, a similarity dendrogram was constructed based in 25 characters and revealed several features shared by all *Anadoras* species. It is a consensus that the hypothetical ancestral karyotype for Doradidae was composed by $2n = 58$ chromosomes (Takagui et al. 2017a; Baumgärtner et al. 2018), which suggests that $2n = 56$ observed in *Anadoras* species is likely product of a derived condition due centric fusions from the common ancestor. According to Ocalewicz (2013), telomeric sequences in pericentromeric or interstitial regions are potential vestiges of chromosome fusions, however in the present study, all analyzed species showed telomeric signals only on terminal regions, without any ITS.

The other shared characteristics, which in phylogenetic studies are referred to as synapomorphies, will be better discussed in future works on the chromosomal evolution of Doradidae. Here, we focused on cytotaxonomic questions and in this sense, what really matters are the diagnostic characteristics, which distinguish one species from the others, or also called apomorphy. The heterochromatin pattern proved to be an excellent specific chromosomal feature, which easily separated all *Anadoras* species here analyzed, including *Anadoras* sp. “araguaia”. The heterochromatic components have heterogeneous composition and rapid rates of change throughout evolution, promoting detectable chromosomal changes in species whose diversification occurred recently (Hughes & Hawley, 2009).

In thorny catfishes, the heterochromatin is a strong specie-specific marker, for example, in four species which also occurs in Araguaia river basin was possible identify several diagnostic features based on heterochromatin distribution (Takagui et al., 2017b). Species of Wertheimerinae subfamily, despite shows the same diploid number and karyotypic formulae, can be easily discriminated by the C band pattern analysis (see Chapter 1). Heterochromatin variations also was detected among populations of *Platydoras armatulus* from Middle Paraguay river basin and Lower Parana basin (Takagui et al., 2017a; Baumgärtner et al., 2018). Likewise, a similar scenario was already seen in other neotropical fish species, where the heterochromatic pattern was an useful tool for identification of cryptic species (Prizon et al., 2017) or even detecting allopatric speciation (Bitencourt et al., 2011).

The physical mapping of ribosomal sequences, as 18S and 5S, highlighted a notable similarity between *A. weddellii* and *Anadoras* sp. “araguaia”, whose pattern was similar to those previously described for some Doradidae (Takagui et al., 2017b), Auchenipteridae (Lui et al., 2009; 2013a; 2013b; 2015) and Aspredinidae species (Ferreira et al., 2016; 2018), which are recognized to be related groups. However, in *A. grypus*, the 18S and 5S rDNAs are syntenic on the short arm of pair 11, an uncommon condition in

neotropical fishes, but has already been described in other species of thorny catfishes (Baumgärtner et al. 2018). Numerical variation in the NOR pattern in *A. grypus* was also observed, such polymorphism had never been reported in Doradidae before, being the first report of multiple NORs in the family.

The existence of individuals of the same species harboring different NORs patterns in sympatry, usually is related to be different chromosomal rearrangements, mainly pericentric inversions and translocations (Mariotto et al., 2006; Porto et al., 2011; Konerat et al., 2015) and saltatory activity of transposable elements (Porto et al., 2014a; 2014b). In *A. grypus*, the probably origin of this numeric variation can be results of non-reciprocal translocations between terminal segments of the pairs 11 and 28. During the interphase, the chromosomes are less condensed and occupying specific nuclear domains due to the existent interactions between telomeres and the nuclear envelope. This conformation, named Rabl's model guarantees a close arrangement among non-homologous chromosomes and consequently promote translocations involving these regions (Cremer et al., 1982; Schweizer & Loidl, 1987; Cremer & Cremer, 2006). A strong evidence supporting this hypothesis is the recurrent association of one of the chromosomes of pair 28 with the pair bearing the synthetic sites of rDNA, such association was also confirmed by the analysis of the interphase nuclei and for Fiber-FISH which reveals only 18S rDNA sites on chromosome 28, confirming that the translocation involving only the terminal segment of the chromosomes 11 and 28.

In this sense, such chromosomal rearrangements seem to have occurred independently and / or separately in the different lineages of the group, once some of the results do not support the previously proposed phylogenetic relationships, as observed in *A. grypus*. In general, the independent origin of karyotypic differentiation mechanisms produces autapomorphy, which are unique and efficient characteristics in the diagnosis of the species. However, the fact that some groups share a conserved pattern for NORs (*A. weddellii* and

Anadoras sp. “araguaia”), some divergent patterns (e.g. *A. grypus*) demonstrate that for *Anadoras*, the RONS are not efficient for this purpose.

The cytogenetic approach like the morphology as an informative tool for discriminated only *A. grypus* of their congeners, being inefficient to detect diagnostic features that clearly separate *A. weddellii* e *Anadoras* sp. “araguaia”. Considering the high morphological and karyotypic similarity between *A. weddellii* and *Anadoras* sp. “araguaia”, the following question arises: Does *Anadoras* sp. “araguaia” would really be a valid species? or simply a variant *A. weddellii* in initial differentiation process? To fill in this gap, an molecular analysis using DNA barcode was performed, and confirmed that *Anadoras* sp. “araguaia” indeed is a genetically distinct species, as corroborated by the NJ, BI, ML and delimitation algorithms (ABGD, bPTP, PhyloMap and sPTP).

It is worthwhile highlight that DNA barcode is a precise and comprehensive tool for species delimitation, assisting in the elucidation of divergent lineages (Hebert et al., 2003a; 2003b; 2004a; 2004b). This methodology is based on the fact that, in order to discriminate apparently similar species, intraspecific genetic variation must be significantly lower than interspecific variation. This lack of overlap between intra and interspecific variation creates the barcode gap, leading to the distinction of the taxa. Indeed, the intra and interspecific average distances within *Anadoras* species was 0,45% and 5,9%, evidencing clearly a gap, with an interspecific differentiation 13 times greater than the intraspecific variation.

Moreover, many authors assumed that the threshold of genetic divergence intraspecific $\geq 2\%$ for marine and freshwater fish represents an evidence of cryptic diversity in morphologically similar species (Ward et al, 2009; Brandão et al, 2016; Ribeiro et al., 2018). In the present study, *A. grypus* and *A. weddellii* presented intraspecific distances of 0.5% and 0.4%, respectively, reinforcing that they are divergent species. These results,

evidenced low interpopulation variability among individuals from Miranda, Cuiaba rivers and Lowe Amazon river, whereas in *A. grypus* from Catalao Lake, confirming that the numeric variation in 18S rDNA is an intrapopulation polymorphism, and not a cryptic species in sympatry.

Differences in morphological, genetic, chromosomal and ecological characters arises multiple times along the speciation process, leading to divergent conclusions about which groups deserve to be recognized as species (De Queiroz, 2007). The set of these properties forms the so-called Gray Zone, where the alternative concepts of species become conflicting. In the other hands, the problem is not when the species are well defined but when the lineages are undergoing for divergence until they become phenotypically distinguishable, diagnosable, mutually monophyletic, reproductively incompatible, ecologically distinct (see De Queiroz, 2005; 2007). In this sense, it is possible that populations of *A. grypus*, although shows specific cytogenetic differences, have recently diverged and due this reason, not accumulated morphological and molecular differences to be considered distinct taxonomic units.

Anadoras is one of the few genera of thorny catfishes that occupy ecosystems beyond the Amazon basin (Birindelli, 2014). This wide distribution may be associated with the fact that about 10 million years ago, there was the Pan-Amazon basin that extended to the northeast region of the current Paraná river basin. At different times and mainly due to tectonic events and the formation of the Andes, this vast system was undergoing changes, so that previously connected basins became isolated. During a long time, the Amazon basin remains divided in two macro-regions, isolated by the Purus arch (Hoorn et al., 2010). However, this geographical barrier was gradually transposed due mainly to the accumulation of sediments originating from the processes responsible for the Andes Mountains orogenesis. This process was responsible for the current configuration of the Amazon basin that has most

of its rivers draining towards the Atlantic Ocean. Contextualizing with our results, the Purus arch was in the Central Amazon, where there is also the Catalao Lake. This region may have initially been a major center of exchange between fish fauna previously isolated, such as *A. grypus* populations, which although in Catalão Lake are still the same species, the chromosomal polymorphism described may be an indication of secondary contact between populations previously isolated by the Purus arch.

Among the neotropical Siluriformes, the association within karyotypes data and DNA Barcoding, emerge which an important source of information for delimitation of species in groups with complex taxonomy, cryptic species or underestimated diversity. In these way, we can highlight some studies: (a) the group *Bunocephalus coracoideus*, a complex of cryptic species consisting of four well supported Evolutionary Significant Units (ESUS), under allopatric and sympatric speciation processes in Amazon rivers (Ferreira et al., 2018). (b) the validation of *Rhamdia voulezi* and *Rhamdia branneri*, which for many years were considered as synonymous junior of *Rhamdia quelen* (Abucarma & Martins-Santos, 2001; Garcia et al., 2010; Ribolli et al., 2017). (c) *Ancistrus cirrosus* has for long been considered the only species of *Ancistrus* found in Parana River basin, but by means of cytogenetics markers and DNA Barcode, Prizon et al., (2017) evidenced five distinct evolutionary lineages are probably coexisting in these basin.

In the present study, the cytogenetic procedures were efficient only to discriminated *A. grypus* to their congeners, while the DNA barcoding recognized three MOTUs strongly supported by BI and ML phylogenetic approaches and for species delimitation algorithms, revealing the non-existence of cryptic diversity among populations of *A. weddellii* and sympatric specimens of *A. grypus* cytogenetically differentiated. Finally, *Anadoras* sp. “araguaia” was recognized as a valid species with a high genetic divergence value in relation to the others. Thus, our data encourage the description of this new species

and reaffirms the importance of cytogenetic and DNA barcoding for biodiversity assessment, mainly in endemic regions threatened by anthropogenic activities, as is the case of Upper Araguaia River.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Biologia Geral and Instituto Nacional de Pesquisa da Amazonia (INPA) for providing the laboratory infrastructure to carry out this work and ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), for permitting the collection of biological material. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Finance Code 001 and Fundação Araucária.

.

Table 1 – Matrix of characters constructed from cytogenetic markers (chromosome quantity and morphology, heterochromatin distribution and 18S rDNA and 5S rDNA patterns). This dataset was used for construction of the similarity dendrogram based on Euclidean distance.

CARACTERES		<i>A. grypus</i>	<i>A. weddellii</i>	<i>Anadoras sp. "araguaia"</i>
(1)	56 chromosomes	1	1	1
(2)	16 metacentric chromosomes	1	0	0
(3)	24 metacentric chromosomes	0	1	1
(4)	18 submetacentric chromosomes	1	0	0
(5)	10 submetacentric chromosomes	0	1	1
(6)	22 subtelo/acrocentrics chromosomes	1	1	1
(7)	Terminal heterochromatic block on long arm of pair 3	1	0	0
(8)	Terminal heterochromatic block on long arm of pair 5	1	0	0
(9)	Terminal heterochromatic block on long arm of pair 7	1	0	0
(10)	Terminal heterochromatic block on long arm of pair 11/15	1	1	1
(11)	Terminal heterochromatic block on long arm of pair 16	0	1	0
(12)	Terminal heterochromatic block on long arm of pair 19	1	0	0
(13)	Terminal heterochromatic block on long arm of pair 20	1	0	0
(14)	Terminal heterochromatic block on long arm of pair 28	1	0	1
(15)	Terminal heterochromatic block on short arm of pair 23	0	0	1
(16)	Interstitial heterochromatic block on long arm of pair 9	1	0	0
(17)	Interstitial heterochromatic block on long arm of pair 13	1	0	0
(18)	Interstitial heterochromatic block on long arm of pair 28	0	1	0
(19)	Terminal heterochromatic blocks in both arms of pair 2	0	1	0
(20)	Two terminal 18S rDNA sites on short arm of pair 11	1	0	0
(21)	Multiple terminal 18S rDNA sites	1	0	0
(22)	Terminal 18S rDNA sites on long arm of pair 28	1	1	1
(23)	Two interstitial 5S rDNA sites on short arm of pair 11	1	0	0
(24)	Two terminal 5S rDNA sites on short arm of pair 15	0	1	1
(25)	Synteny between 18S and 5S rDNAs	1	0	0

Legend: 1= Presence, 2=Absence; Red numbers= cytogenetic features shared between all species.

Table 2 – Collection sites, cytogenetic and morphological identification codes of *Anadoras* specimens here analyzed.

species	Cytogenetic code	Morphological code (voucher specieslink)	Locality
<i>Anadoras</i> sp. “araguaia”	AAR702	MZUSP110809	Upper Araguaia River – Tocantins basin
<i>Anadoras weddellii</i>	AWM115	MZUEL11085	Miranda River – Middle Paraguay basin
<i>Anadoras weddellii</i>	AWM4081	MZUEL11085	Miranda River – Middle Paraguay basin
<i>Anadoras weddellii</i>	AWM125	MZUEL11085	Miranda River – Middle Paraguay basin
<i>Anadoras weddellii</i>	AWC9393	MZUEL11085	Cuiaba River – Upper Paraguay basin
<i>Anadoras weddellii</i>	AWC9220	MZUEL11085	Cuiaba River – Upper Paraguay basin
<i>Anadoras grypus</i>	AG12340	MZUEL17811	Catalao Lake – Central Amazon basin
<i>Anadoras grypus</i>	AG12341	MZUEL17811	Catalao Lake – Central Amazon basin
<i>Anadoras grypus</i>	AG12342	MZUEL17811	Catalao Lake – Central Amazon basin
<i>Anadoras grypus</i>	AG12343	MZUEL17811	Catalao Lake – Central Amazon basin
<i>Anadoras grypus</i>	AG12344	MZUEL17811	Catalao Lake – Central Amazon basin

Legends: MZUSP= São Paulo University Museum; MZUEL= Londrina State University Museum; mtDNA= Mitochondrial DNA.

Table 3 – Kimura’s Two-Parameters Model Genetic Distance among populations of *Anadoras grypus*, *Anadoras weddellii* and *Anadoras* sp. “araguaia” from different South American hydrographic basins.

	Interspecific Genetic Distance				Intraespecific Genetic Distance
	[ARA]	[AGR]	[AWD]	[WML]	[PAR]
<i>Anadoras</i> sp. “araguaia” [ARA]					
<i>Anadoras grypus</i> [AGR]	6,3%				0,5%
<i>Anadoras weddellii</i> [AWD]	5,4%	5,9%			0,4%
<i>Wertheimeria maculata</i> [WML]*	19,2%	19,9%	21,0%		
<i>Platydoras armatulus</i> [PAR]*	22,0%	20,2%	20,3%	16,7%	

References

- Abucarma, M. & I.C. Martins-Santos, 2001. Karyotype and B chromosomes of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguaçú basin. *Cytologia* 66:299–306. doi:10.1508/cytologia.66.299.
- Almeida, F.S., M.H.P. Fungaro & L.M.K. Sodr , 2001. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes, Pimelodidae) from the Tibagi River. *Brazilian Journal of Zoology*. doi:10.1017/S0952836901000103.
- Arce, M.H., E.R. Reis, A.J. Geneva & P.H.M. Sabaj, 2013. Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 560-577. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2013.02.021
- Baumgärtner, L., L.M. Paiz, F.H.T. Takagui, R.L. Lui, O. Moreira-Filho, L. Giuliano-Caetano, A.L.B. Portela-Castro & V.P. Margarido, 2018. Comparative Cytogenetics Analysis on Five Genera of Thorny Catfish (Siluriformes, Doradidae): Chromosome Review in the Family and Inferences About Chromosomal Evolution integrated with Phylogenetics Proposals. *Zebrafish* 15: 270-278. doi:10.1089/zeb.2017.1554.
- Baumgärtner L., L.M., Paiz, V.P. Margarido, A.L.B. & Portela-Castro, A.L.B, 2016. Cytogenetics of the thorny catfish *Trachydoras paraguayensis* (Eigenmann & Ward, 1907), (Siluriformes, Doradidae): evidence of pericentric inversions and chromosomal fusion. *Cytogenetic Genome and Research* 149 (3): 201-2016. doi: 10.1159/000448126.
- Barreto, S.B., L.A. Nunes, A.T. Silva, R. Juca-Chagas, D. Diniz, I. Sampaio, H. Schneider & P.R.A.M. Affonso, 2016. Is *Nematocharax* (Actinopterygii, Characiformes) a monotypic fish genus? *Genome* 58: 191–192.
- Barros, A.V., M.A. Wolski, V. Nogaroto, M.C. Almeida, O. Moreira-Filho & M.R. Vicari 2017. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role?. *Gene* 608: 20-27. doi:10.1016/j.gene.2017.01.013.
- Bertollo L.A.C., C.S. Takahashi & O. Moreira-Filho, 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genetica* 1: 103-120.
- Bertollo, L.A.C., G.G. Born, J.A. Dergam, A.S. Fenocchio & O. Moreira-Filho, 2000. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research* 8:603–613.

- Birindelli, J. L. O. & M. H. Sabaj Pérez, 2011. *Ossancora*, new genus of thorny catfish (Teleostei: Siluriformes: Doradidae) with description of one new species. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences*, 161: 117-152.
- Birindelli, J.L.O. 2014. Phylogenetic relationships of the South American Doradoidea (Ostariophysi: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology* 12: 451-564. doi:10.1590/1982-0224-20120027
- Bitencourt, J.A., P.R.A.M. Affonso, L. Giuliano-Caetano, P.L. S. Carneiro & A. L. Dias, 2012. Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Research* 11: 933–943.
- Claro-García, A. & O.A. Shibatta, 2013. The fish fauna of streams from the upper rio Tocantins basin, Goiás State, Brazil. *Check List* 9(1):028–033.
- Cremer, T., C. Cremer, H. Baumann, E.K. Luedtke, K. Sperling, V. Teuber & C. Zorn, 1982. Rabl's Model of the Interphase Chromosome Arrangement Tested in Chinese Hamster Cells by Premature Chromosome condensation and Laser-UV-Microbeam Experiments. *Human Genetics* 60: 46-56.
- Cremer, T. & M. Cremer, 2010. Chromosome Territories. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2: a003889.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo & D. Posada, 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *National Methods* 9:772. 10.1038/nmeth.2109.
- Dayrat, B., 2005. Toward integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415.
- De Queiroz, K., 2005b. Different species problems and their resolution. *BioEssays* 27(12): 1263-1269.
- De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *System Biology* 56:879–886.
- Ferraris, C.J., 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalog primary types. *Zootaxa*.1418p.
- Ferreira, M., C. Garcia, D.A. Matoso, I.S. de Jesus & E., Feldberg 2016. A new multiple sex

chromosome system X1X1X2X2/X1Y1X2Y2 in Siluriformes: cytogenetic characterization of *Bunocephalus coracoideus* (Aspredinidae). *Genetica* 144:591–599.

- Ferreira, M., C. Garcia, D.A. Matoso, et al., 2017. The *Bunocephalus coracoideus* Species Complex (Siluriformes, Aspredinidae). Signs of a Speciation Process through Chromosomal, Genetic and Ecological Diversity. *Frontiers in Genetics* 8:120. doi:10.3389/fgene.2017.00120.
- Ferreira, E.A.B. & D. J. Tokarski. 2007. Bacia Hidrográfica do Alto Tocantins Retrato e Reflexões. ECODATA. WWF – Brasil. 102 p.
- Fichberg, I. & C.C. Chamon, 2008. *Rineloricaria osvaldoi* (Siluriformes: Loricariidae): a new species of armored catfish from rio Vermelho, Araguaia basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6(3): 347-354.
- Froese, R. & Pauly, D., 2017. FishBase: World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org> [accessed 02 february 2019].
- Garcia, C., C. Oliveira & L.F. Almeida-Toledo, 2010. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics Molecular Research* 9:365–384. 10.4238/vol9-1gmr750.
- Goulding, M., R. Barthem & E.J.G. Ferreira, 2003. The Smithsonian atlas of the Amazon. Washington: Smithsonian Books. 253 p.
- Hatanaka, T. & P.M Galetti Jr., 2004. Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. Dewaard, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hebert, P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemlak & C. M. Francis, 2004a. Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biology* 2: e312.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen & W. Hallwachs, 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:14812–14817.

- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham & J. R. Waard, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270:96–99.
- Higuchi, H.A., 1992. Phylogeny of South American thorny catfishes (Osteichthyes: Siluriformes, Doradidae). Ph.D. dissertation, Harvard University.
- Higuchi, H., J.L. Birindelli, L. Sousa & H. Britski, 2007. *Merodoras nheco*, new genus and species from Rio Paraguay basin, Brazil (Siluriformes, Doradidae), and nomination of the new subfamily Astrodoradinae. *Zootaxa* 1446:31-42
- Hoorn, C., F.P. Wesselingh, H.T. Steege, M.A. Bermudez, A. Mora, J. Sevink et al. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science* doi:10.1126/science.1194585.
- Howell, W.M. & D.A. Black, 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: as 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Huelsenbeck, J.P. & F. Ronquist, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Hughes, S.E. & R.S. Hawley, (2009). Heterochromatin: a rapidly Evolving species Barrier. *PLoS Biology* 7:e1000233. doi: 10.1371/journal.pbio.1000233.
- Ijdo, J.M., R.A. Wells, A. Baldini & S.T. Reeders, 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19: 4780.
- Jardulli, L.R., A. Claro-Garcia & A.O. Shibatta, 2014. Ichthyofauna of the rio Araguaia basin, states of Mato Grosso and Goiás, Brazil. *Check List*. 10(3): 483-515. doi: 10.15560/10.3.483.
- Jarduli, L.R. & O.A. Shibatta, 2013. Description of a new species of *Microglanis* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from the Amazon basin, Amazonas State, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 11: 507-512.

- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111–120.
- Konerat, J.T., V. Bueno, V.P. Margarido, A.L.B. Portela-Castro, I.C. Martins-Santos, 2015. Diversity of Sex Chromosome Systems in Ancistrini (Loricariidae, Hypostominae): ZZ/ZW in *Ancistrus taunayi* Miranda Ribeiro, 1918. *Cytogenetics and Genome Research* 146:306-310.
- Levan, A., K. Fredga & A.A. Sandberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220. doi:10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- Lui, R.L., D.R. Blanco, V.P. Margarido & O. Moreira-Filho, 2009. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40: 552–559. doi:10.1016/j.micron.2009.03.004.
- Lui, R.L., D.R. Blanco, V.P. Margarido & O. Moreira-Filho, 2010. Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of Linnean Society* 99: 648–656.
- Lui, R.L., D.R. Blanco, O. Moreira-Filho, V.P. Margarido, 2012. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87(7): 433–438. doi:10.3109/10520295.2012.696700
- Lui, R.L., D.R. Blanco, V.P. Margarido, M.P. Troy & O. Moreira-Filho, 2013a. Comparative chromosomal analysis and evolutionary considerations concerning two species of genus *Tatia* (Siluriformes, Auchenipteridae). *Comparative Cytogenetics* 7(1): 63-71.
- Lui, R.L., D.R. Blanco, J.L. Martinez, V.P. Margarido, P.C. Venere & O. Moreira-Filho, 2013b. The role of chromosomal fusion in the karyotypic evolution of the genus *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae). *Neotropical Ichthyology* 2013b 11:327-334.
- Lui, R.L., D.R. Blanco, J.B. Traldi, V.P. Margarido & O. Moreira-Filho, 2015. Karyotypic variation of *Glanidium ribeiroi* Haseman, 1911 (Siluriformes, Auchenipteridae) along the Iguazu river basin. *Brazilian Journal of Biology*, 75: 215-222. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.10714>

- Mariotto, S. & C.S. Miyazawa, 2006. *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of sexual chromosomes of type XX/XY, in the pantanal basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia* 59:299–304.
- Martins, C. & P.M. Galetti Jr., 1999. Chromosomal Localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363–367.
- Mittermeier, R.A., N. Myers, C.G. Mittermeier & P.R. Gill, 1999. Hotspots, Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City: Cemex/Conservation International. 431 pp.
- Molina, W.F., D.E.O. Alves, W.C. Araújo, P.A. Martinez, M.F.M. Silva & G.W.W.F Costa, 2010. Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. *Genetics and Molecular Research* 9: 1807-1814. doi:10.4238/vol9-3gmr840
- Ocalewicz, K., 2013. Telomeres in fishes. *Cytogenetics and Genome Research* 141: 114–125.
- Pante, E., C. Schoelinck & N. Puillandre, 2015. From Integrative taxonomy to species description: One Step Beyond. *Systematic Biology* 64:152-160.
- Piggott, M.P., N.L. Chao & L.B. Beheregaray, 2010. Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. *Biological Journal of Linnean Society*. 102(2):391-403.
- Pinkel, D., T. Straume, J.W. Gray, 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of National Academy Science of USA* 83: 2934-2938.
- Porto, F.E., A.L. Portela-Castro & I.C. Martins-Santos, 2011. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná river basin. *Ichthyological Research* 58: 225-231. doi:10.4238/2014.March.12.15
- Porto, F.E., B.S. Gindri, M.M. Vieira, L.A. Borin, A.L. Portela-Castro & I.C. Martins-Santos, 2014a. Polymorphism of the nucleolus organizing regions in *Loricaria cataphracta* (Siluriformes, Loricariidae) of the upper Paraguay River basin indicate an association with transposable elements. *Genetic and Molecular Research*, doi: 10.4238/2014.March.12.15.
- Porto, F.E., M.M.R. Vieira, L.M. Barbosa, L.A. Borin-Carvalho, M.R. Vicari, A.L.B. Portela-Castro, I.C. Martins-Santos, 2014b. Chromosomal polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay basin (Mato

Grosso do Sul, Brazil): evidence of fusions and their consequences in the population. *Zebrafish* 11:318-324

- Prizon, A.C., D.P. Bruschi, L.A. Borin-Carvalho, et al., 2017. Hidden Diversity in the Populations of the Armored Catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná River Basin Revealed by Molecular and Cytogenetic Data. *Frontiers in Genetics*. 8:185. doi:10.3389/fgene.2017.00185
- Puillandre, N., A. Lambert, S. Brouillet & G. Achaz, 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21: 1864–1877.
- Rambaut, A., M.A. Suchard, D. Xie & A.J. Drummond, 2014. Tracer v1.6. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rambaut A. 2013. FigTree version 1.3.1 [computer program] <http://tree.bio.ed.ac.uk> .
- Ribolli, J.L., B.M. Scaranto, O.A. Shibatta, R.A. Bombardelli & E. Zaniboni-Filho, 2017. DNA barcoding confirms the occurrence of *Rhamdia branneri* and *Rhamdia voulezi* (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguacu river basin. *Neotropical Ichthyology* 15:e160147.doi:10.1590/1982-0224-20160147.
- Sousa L.M., 2010. Revisão Taxonômica e Filogenia de Astrodoradinae (Siluriformes, Doradidae). Unpublished Ph.D. dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 276p.
- Souza, C.R., P.R.A.M. Affonso, J.A. Bitencourt, I. Sampaio & P.L.S. Carneiro, 2018. Species validation and cryptic diversity in the *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 complex (Teleostei, Cichlidae) from Brazilian coastal basins as revealed by DNA analyses. *Hydrobiologia* 809:309-321. doi: 10.1007/s10750-017-3482-y.
- Souza-Shibatta, L., L.F. Pezenti, D.G. Ferreira, F.S. Almeida, S.H. Sofia & O.A. Shibatta, 2013. Cryptic species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes:Heptapteridae) from the Miranda River, Paraguay River basin, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology* 11(1): 101-109.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.

- Schweizer, D. & J. Loidl, 1978. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-banding patterns. *Chromosomes Today* 9: 61-74.
- Serrano, E.A., B.F. Melo, D. Freitas-Souza, M.L.M. Oliveira, R. Utsonomia, C. Oliveira & F. Foresti, 2018. Species delimitation in Neotropical fishes of the genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes). *Zoologica Scripta*.doi:10.1111/zsc.12318.
- Sousa L.M., 2010. Revisão Taxonômica e Filogenia de Astrodoradinae (Siluriformes, Doradidae). Dissertação não publicada. Universidade de São Paulo, São Paulo. 276 .
- Souza-Shibatta, L., J.F.R. Tonini, V.P. Abrahão, L.R. Jarduli, C. Oliveira, L.R. Malabarba, et al., 2018. Reappraisal of the systematics of *Microglanis cottoides* (Siluriformes, Pseudopimelodidae), a catfish from southern Brazil. *PLoS ONE* 13(7): e0199963.
- Sumner, A.M.T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306. doi:10.1016/0014-4827(72)90558-7
- Takagui, F.H., A.L. Dias, J.L.O. Birindelli, A.C. Swarça, R. Rosa, R.L. Lui, A.S. Fenocchio & L. Giuliano-Caetano, 2017a. First report of B chromosomes in three neotropical thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae). *Comparative Cytogenetics* 11(1): 55-64.
- Takagui, F.H., L.F. Moura, D.C. Ferreira, L. Centofante, C.A. Vitorino, V. Bueno, V.P. Margarido & P.C. Venere, 2017b. Karyotype diversity in Doradidae (Siluriformes, Doradidae) and presence of the heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in the family. *Zebrafish* doi:10.1089/zeb.2016.1368.
- Tenorio, R.C.C.O., C.A. Vitorino, I.L. Souza, C. Oliveira, P.C. Venere, 2013. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology* 11(3): 553-564.
- Uso, M.C., A.R. Santos, J.G. Gouveia, W. Frantine-Silva, C. Araya-Jaime, L.M.M. de Oliveira, F. Foresti, L. Giuliano-Caetano & A.L. Dias, 2018. Genetic and Chromosomal differentiation of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) revealed by repetitive molecular markers and Dna Barcoding. *Zebrafish*.16(1):
- Zhang, J., A. M. Mamlouk, T. Martinetz, S. Chang, J. Wang & R. Hilgenfeld, 2011. PhyloMap: an algorithm for visualizing relationships of large sequence data sets and its application to the influenza A virus genome. *BMC bioinformatics* 12: 248–267.
- Zhang, J., P. Kapli, P. Pavlidis & A. Stamatakis, 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29(22), 2869-2876.

Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last & P. D. N. Hebert, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 360: 1847–1857.

Ward, R.D.; R. Hanner & P.D.N. Hebert, 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* 74(2): 329–356.

Will, K.P., B.D. Mishler, Q.D. Wheeler, 2005. The perils of DNA Barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54:844-851.

CAPÍTULO 3

“Karyoevolution of thorny catfishes (Siluriformes-Doradidae): a dynamic process based on pericentric inversions, Robertsonian translocations and heterochromatin divergence”.

Fábio H. Takagai¹; Lucas Baumgartner²; Luis P. Santana¹; Patrik Viana³; Jamille A. Bitencourt⁴; Paulo C. Venere⁵; Eliana Feldberg³ and Lucia Giuliano-Caetano¹.

Authors affiliations:

1. Animal Cytogenetics Laboratory; Department of General Biology; CCB; Londrina State University. Londrina-Brazil.
2. Cytogenetic Laboratory; Center for Biological and Health Sciences; Western Paraná State University. Cascavel-Brazil.
3. Animal Genetics Laboratory; National Institute of Amazonian Research. Manaus-Brazil.
4. Cytogenetic Laboratory; Department of Biological Sciences; Southwest of Bahia State University. Jequié, Bahia – Brazil.
5. Animal Cytogenetics and Genetics Laboratory; Mato Grosso Federal University. Cuiaba-Brazil.

*Este artigo será enviado para revista **Review in Fish Fisheries**

Abstract

The thorny catfishes of Family Doradidae is widespread fish group in freshwaters systems of South America, specially in the Amazon basin, where they play ecologic roles that are fundamental for the homeostasis of the ecosystem. Cytogenetics studies evidenced that the $2n=58$ chromosomes and terminal NORs on short arm are the most common features in karyotype of Doradidae, however these data was obtained for only 15 species among the 95 species described for this family. Thus, in the present study, nine species of thorny catfishes from different subfamilies was cytogenetically analyzed aiming to propose evolutionary inferences using the Mesquite software to explain the origin of the current karyotype diversity of Doradidae. A remarkable variation in the diploid number was observed: $2n = 44$ in *Amblydoras nheco*, $2n = 46$ in *Amblydoras affinis*, $2n = 52$ in *Astrodoras asterifrons*, $2n = 58$ in *Platydoras hancockii*, *Pterodoras granulatus*, *Centrodoras brachiatus*, *Oxydoras kneri*, *Hemidoras stenopeltis* and $2n = 60$ in *Trachydoras steindachneri*. Cryptic species were identified in *Amblydoras affinis* as well as an unprecedented system of multiple NORs in *P. hancockii*. The reconstruction of the ancestral character corroborated previous studies and estimated $2n=58$ chromosomes and simple terminal NORs in the short arm of subtelocentric as basal, these characteristics remain conserved in different clades of Doradidae, however it also occurs in derived karyotypes due to chromosomal rearrangements (pericentric inversions, Fission and Centric Fusion and translocations) and also by the differential accumulation of heterochromatic.

Keys-words: Karyotypes, heterochromatin, NORs, 5S rDNA.

Introduction

Within the Neotropical Siluriformes, Doradidae family represents one of the most diverse groups, with more than 95 species (Eschemeyer and Fong 2018) popularly known as thorny catfishes, serrate, armado, rique-rique, abotoado. They are easily recognized by the presence of a single or multiple row of scutes with thorns along the lateral line. This family includes species with economic and biological importance, spread throughout the largest hydrographic basins in Brazil, however they are commonly found in Amazon and Platina rivers (Birindelli 2014, Ferraris 2007). In the last decade many phylogenetic studies corroborated the monophyletic status of Doradidae, both molecular (Arce et al. 2013) and morphological (Birindelli 2014) analysis classify the thorny catfishes in three subfamilies: Wertheimerinae, Astrodoradinae and Doradinae.

The history of chromosome analysis in Doradidae can be divided into two moments. At first, such studies based only on conventional techniques, showed little variation in the quantity and morphology of the chromosomes, so that most species carried $2n = 58$, being that only *Trachydoras paraguayensis* Eigenmann & Ward 1907 presented 56 chromosomes (Fenocchio et al. 1993). This low variability sustained for a long time the hypothesis that these fishes, though widely distributed throughout South America, followed a conserved karyotype evolution model (Eler et al., 2007, Milhomen et al. 2008). However, from the studies of Takagui et al. (2017a, 2017b) and Baumgartner et al. (2016, 2018), a second moment began, evidencing an intense karyotypic variability mainly in the Platina and Araguaia-Tocantins River basin species. Such studies were very important, since they overturned the model of conservative chromosome evolution, which until then was proposed for Doradidae.

In this family, although $2n = 58$ chromosomes still remain as a predominant and hypothetically ancestral trait (Eler et al. 2007, Takagui et al. 2017b), some species exhibit

variations, mainly at structural level, with karyotypic divergent formulas originated from pericentric inversions. However, some species also exhibit karyotypes with numerical alterations due to robertsonian translocations that had both a reduction in the diploid number for 56 chromosomes in *T. paraguayensis* and *Anadoras* sp. "araguaia", and in the origin of $2n = 66$ described for *Ossancora punctata* Kner 1853 which to date is the largest diploid number described for Doradidae (**Table 1**).

Also as part of the karyotypic variation spectrum just described for Doradidae are polymorphisms related to the presence of supernumerary chromosomes in *O. punctata*, *Pterodoras granulosus* Valenciennes 1821 and *Platydoras armatulus* Valenciennes 1840. In all cases, microchromosomes originated as remnants of chromosomal rearrangements and exhibited low frequency in mitotic cells and late meiotic segregation (Takagui et al. 2017a). As well as an intriguing ZZ/ZW sex chromosome system in *Tenellus trimaculatus* Boulenger 1898, hypothetically originated from amplification of heterochromatic elements followed by paracentric inversions (Takagui et al. 2017b).

Considering the aforementioned karyotype variations, the present study aims to evaluate the existence of karyotype patterns in Doradidae, as well as to reconstruct the ancestral states of the diploid number and NORs, evaluating whether these cytogenetic data are useful for evolutionary or cytotaxonomic studies. Thus the chromosome data obtained from the literature together with those of the present study will be discussed in light of a molecular phylogenetic hypothesis previously proposed by Arce et al. (2013) for the family.

Material and Methods

Species and collection sites

Altogether, 47 individuals of 9 thorny catfish species from different hydrographic basins of Brazil were cytogenetically analyzed (**Table 2**). The capture of specimens was authorized by ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), and after processing and subsequent fixation, all specimens were deposited in ichthyological collections under the voucher numbers available on digital platform specieslink.

The experiments followed ethical conducts in accordance with the Ethics Committee for Animal Use of the Londrina State University, under the protocol number 60/2017.

Mitotic chromosomes preparations, chromosomal banding and Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

Before undergoing euthanasia (48 hours), the specimens received an intraperitoneal injection of 2ml of Broncho-vaxom (bacterial lysate) to trigger an inflammatory process and hence increase the number of renal cells in mitotic division (Molina et al. 2010). The mitotic chromosomes were obtained from kidney cells according to Bertolo et al. (1978). The heterochromatin pattern was determined using the C-banding technique proposed by Sumner (1972) with modification in the staining step (Giemsa were replaced by Propidium iodide) according to Lui et al. (2012).

Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) was performed according to Pinkel et al., (1986). The rDNA probes was obtained by Mini-Prep (extraction of plasmidial DNA), being that 18S rDNA probe from *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829 (Hatanaka and Galetti 2004) and 5S rDNA from *Megaleporinus elongatus* Valenciennes, 1850 (Martins and

Galetti 1999). The telomeric (TTAGGG)_n probe was prepared by PCR, following Ijdo et al. (1991).

The rDNA probes were labelled by nick translation (Roche®) (according to the manufacturer's instructions) using biotin-16-dUTP and digoxigenina-11-dUTP. Whereas the telomeric probes were labeled by PCR using digoxigenin-11-dUTP. Hybridizations were carried out under high stringency (77%), except for telomeric probes which were mapped by FISH with low stringency (52%). The detection of the signals were performed using anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) and biotinylated anti-avidin (Sigma-Aldrich). The slides were assembled in 20 µL antifading solution (90% glycerol, 2.3% DABCO, 2% 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, plus 5 µL of 2 µg/mL DAPI and 5 µL of 2.5 mM MgCl₂) and they were analyzed on Leica DM 2000 epifluorescent microscope equipped with digital camera Moticam Pro 282B. All the chromosome images were acquired using the Motic Images Advanced software, version 3.2.

The karyotypes were previously constructed in Adobe Photoshop program and after edition, the Easyvideo software v. 3.0 (Diniz & Xavier, 2006), it was used to determine the chromosome morphology considering the arm ratio proposed by Levan et al. (1964). The chromosomes were measured and classified as metacentric, submetacentric, acrocentric and telocentric (some modifications in this nomenclature was adopted: the telocentric are considered as acrocentric).

Reconstruction of ancestral characters using the Mesquite software

For reconstruction of the ancestral chromosome numbers (2n) and NORs patterns, we used the Mesquite software (Maddison and Maddison 2011). For these evolutionary analyses, we incorporated the molecular species-level phylogeny of the Doradidae family and two outgroups belonging the Auchenipteridae (sister group), *Trachelyopterus galeatus* and

Ageneiosus inermis (Arce et al. 2013). The ancestral state was inferred using Max Likelihood analysis and the Markov model 1 state (Mk1), which considers that all changes are equally likely.

The cytogenetic data used in the reconstruction were obtained from the literature (**Table 1**) along with those of the present study. The characters were treated as non-ordered and multi-staked, with seven states being considered for the diploid number ($2n=44$; $2n=46$; $2n=52$; $2n=56$; $2n=58$; $2n=60$; $2n=66$) and ten states for the RONS named: [A] Terminal NORs on short arm of subtelocentric chromosome; [B] Interstitial NORs on p arm of submetacentric chromosome; [C] Terminal NORs on q arm of acrocentric chromosome; [D] Terminal NORs on p arm of acrocentric chromosome; [E] Interstitial NORs on q arm of metacentric chromosome; [F] Terminal NORs on q arm of submetacentric chromosome; [G] Multiple sites in submetacentric and acrocentric chromosomes; [H] Terminal NORs on p arm of submetacentric chromosome; [I] Multiple sites in terminal position on p arm of subtelocentric chromosomes; [J] Terminal NORs on q arm of subtelocentric chromosomes. The probable ancestor character was determined for each node, and the probabilistic values are organized in **Table 3** and **Table 4**.

Results

Subfamily Astrodoradinae

Amblydoras nheco Higuchi 2007: shows $2n=44$ chromosomes ($18m + 18sm + 8st-a$). The heterochromatic blocks was detected only in some pericentromeric regions, in both arms of pair 5 and in short arm of pair 19 (coincident with secondary constriction). The rDNA sites was mapped by FISH in synteny on short arm of pair 19, being the 5S rDNA interstitial and the 18S rDNA in terminal position (**Fig.1**).

Amblydoras affinis Kner, 1855 (**Tapajós river**): the specimen exhibited $2n=46$ chromosomes ($20m + 14sm + 12st-a$). C banding detected heterochromatin regions in terminal position on long arm of pairs 1, 21 and 23; on short arm of pairs 18 (coincident with heteromorphic secondary constriction) and 19 and in pericentromeric regions of pairs 6 and 8. FISH with rDNAs reveals 18S rDNA sites on short arm of pair 18 and 5S rDNA sites on short arm of pair 19, both coincident with heterochromatic blocks (**Fig.1**).

Amblydoras affinis (**Guamá river**): the diploid number found for all individuals was 46 chromosomes ($16m + 10sm + 16st-a$). The heterochromatic regions was detected in most of centromeres; in terminal position on short arm of pairs 12 and 20; on long arm of pairs 14, 15, 16, 18 and 21; on both arms of pairs 11; interstitial (nearly to centromeres) on short arms of pairs 5 and 8 and on long arm of pairs 3, 6, 10, 11, 12 and 14. The 18S rDNA was detected in terminal position on long arm of pair 16, while the 5S rDNA was detected on short arm of pair 20. FISH with [TTAGGG] $_n$ repeats detected interstitial telomeric sites (ITS) in pairs 2 and 5 (**Fig1**).

Astrodoras asterifrons Kner 1853: shows $2n=52$ chromosomes with karyotypic formulae: $16m + 18sm + 18st-a$. The C banding reveals heterochromatic blocks in interstitial position on long arm of pairs 2,4, 21 and short arm of pair 9; in terminal position on short arm of pairs 8, 13 and 24. FISH with rDNA probes evidenced a syntenic arrangement of rDNAs sites on short arm of pair 24, being the 18S rDNA in terminal position while the 5S rDNA sites in interstitial position. FISH with [TTAGGG] $_n$ motifs detected interstitial telomeric sites (ITS) only on long arm of pair 9 (**Fig.1**).

Subfamily Doradinae

Platydoras hancockii Valenciennes 1840: shows $2n=58$ chromosomes (26m + 14sm + 18st-a). The heterochromatin was detected in terminal position on short arms of pairs 13, 15, 16, 20, 26, 28 and on long arm of pair 6; in both arms of pair 4; interstitially on short arm of pair 2. FISH detected multiple 18S rDNA sites in terminal position on short arms of pairs 26 and 28, while the 5S rDNA sites was detected in synteny with 18S rDNA sites on short arm of pair 26 (**Fig.2**).

Centrodoras brachiatus Cope 1872: the diploid number found for this specie was 58 chromosomes, with karyotypic formulae: 22m + 18sm + 18st-a. The C banding evidenced heterochromatin blocks in terminal position on short arms of pairs 10, 16, 19, 23 and 27; interstitially on long arm of pairs 21 and 26; in both arms of pair 5; in pericentromeric and terminal region on short arm of pair 3. FISH reveals syntenic 18S and 5S rDNA sites on short arm of pair 16, being the NORs sites on terminal position, while the 5S rDNA was mapped on interstitial position (**Fig.2**).

Pterodoras granulatus Valenciennes 1821: shows 58 chromosomes distributed in 22m + 18sm + 18st-a. The heterochromatic blocks was observed in terminal position on short arms of pairs 9, 16, 25; long arms of pairs 1, 2, 26 and on both arms of pairs 3, 5, 8. The 18S rDNA sites was detected in terminal position on short arm of pair 16, in synteny with 5S rDNA sites (detected on interstitial position) (**Fig.2**).

Oxydoras niger Valenciennes 1821: shows $2n=58$ chromosomes (22m + 18sm + 18st-a). C banding evidenced heterochromatic block in terminal position on short arms of pairs 5, 6, 16 and on long arm of pair 22, on both arms of pair 3 and interstitially on long arm of pair 24. FISH reveals syntenic 18S and 5S rDNA sites on short arm of pair 16, being the NORs sites on terminal position, while the 5S rDNA was mapped on interstitial position (**Fig.2**).

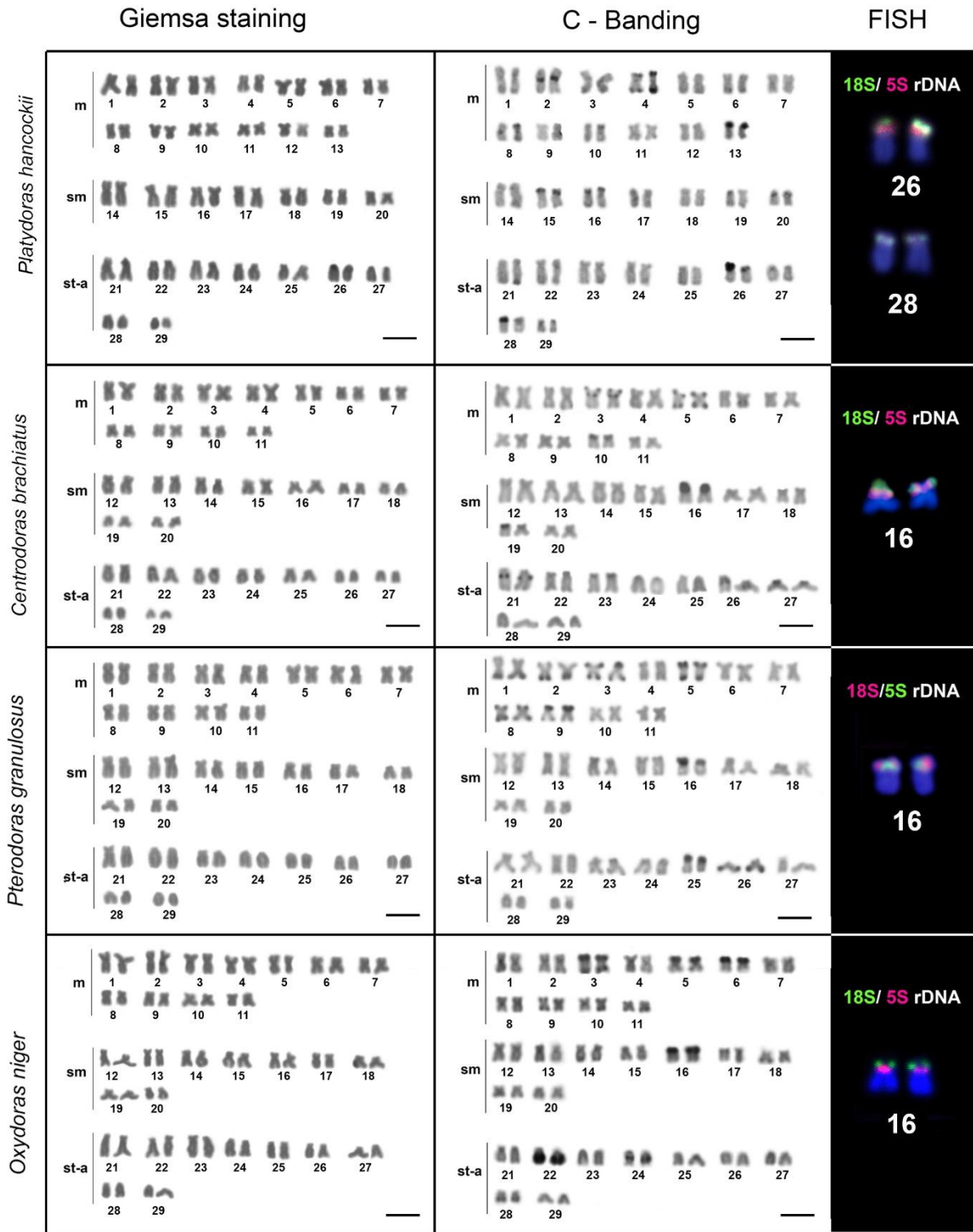


Figure 2 – Karyotypes of Doradinae subfamily “Large thorny catfishes clade”: after Giemsa staining, C banding and FISH with 18S, 5S rDNA and Telomeric probes. The scale bar corresponds at 10µm.

Hemidoras stenopeltis Kner 1855: shows $2n=58$ chromosomes (34m + 16sm + 8a). The heterochromatin was detected in terminal position on short arms of pairs 3, 5, 7, 8, 21, 22; on long arm of pair 28; pericentromeric region of pairs 2, 18, 19, 27 and on both arms of pair 4. The 18S rDNAs sites was mapped by FISH in terminal position on long arm of pair 28, whereas the 5S rDNA was detected on short arms of pairs 7 and 8 (**Fig.3**).

Trachydoras steindachneri Perugia 1897: shows 60 chromosomes with karyotypic formulae: 30m + 14sm + 16a. The C banding evidenced terminal heterochromatic blocks on short arms of pairs 18 and 28; on long arms of pairs 6, 15, 23, 24, 27, 29; pericentromeric in pairs 5, 10, 11 and 16; in both arms of pairs 3, 7, 26; on short arm of pair 1 in pericentromeric and terminal position. FISH reveals 18S rDNA sites on short arms of pair 28 and 5S rDNA sites on short arms of pair 18 (**Fig.3**).

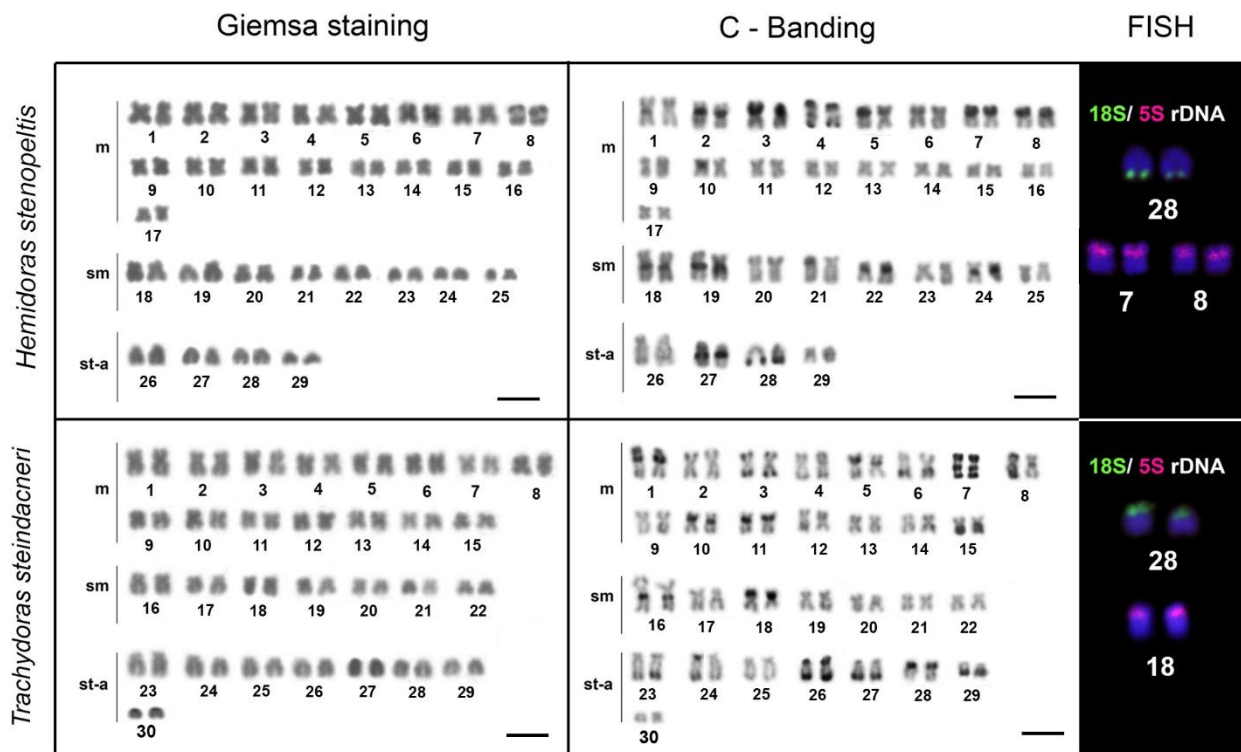


Figure 3 – Karyotypes of Doradinae subfamily “Fimbriate barbells thorny catfishes clade”: after Giemsa staining, C banding and FISH with 18S, 5S rDNA and Telomeric probes. The scale bar corresponds at 10 μ m.

Reconstruction of ancestral characters

The most probably ancestral diploid number of Doradidae is $2n=58$ chromosomes, because this diploid number occurs with high support value (99,9%) in most of the nodes. These feature is ancestral condition in Wertheimerinae subfamily which 99.9% and in the most of clades included in Doradinae, with the exception of node 20, where the species of *Trachydoras*. In Astrodoradinae the ancestral diploid number is $2n=56$ chromosomes, however the support value for this feature is low (51.8%), being that only in *Anadoras* the $2n=56$ can be considered a ancestral condition with 99.9% of support. In others clades of Astrodoradinae, it was not possible to determine the ancestral diploid number (**Fig. 4; Table 3**).

Regarding to the basal NORs pattern, ten states of the character were determined, among them, the pattern A (terminal NORs on short arm of subtelocentric) is considered ancestral in most nodes with high probabilistic support (up to 80%). In nodes 16, 17, 18 and 19 the pattern 1 remains with ancestral character but showed a reduction in support values. In the node 5 and 6, which correspond to the *Anadoras* clade, the pattern C (terminal NORs on long arm of acrocentric) is the ancestral feature with 99% . In the node 15 wich corresponds to the *Oxydoras* clade, the pattern H is the ancestral condition, whereas in the *Tenellus* clade (node 23) the ancestral NORs pattern is the F (Table 2). In some nodes, as is the case of 20 and 27 which corresponds to *Trachydoras* and *Ossancora-Hemidoras* clades respectively, it was not possible to determine the ancestral NORs pattern (**Fig.5; Table 4**).

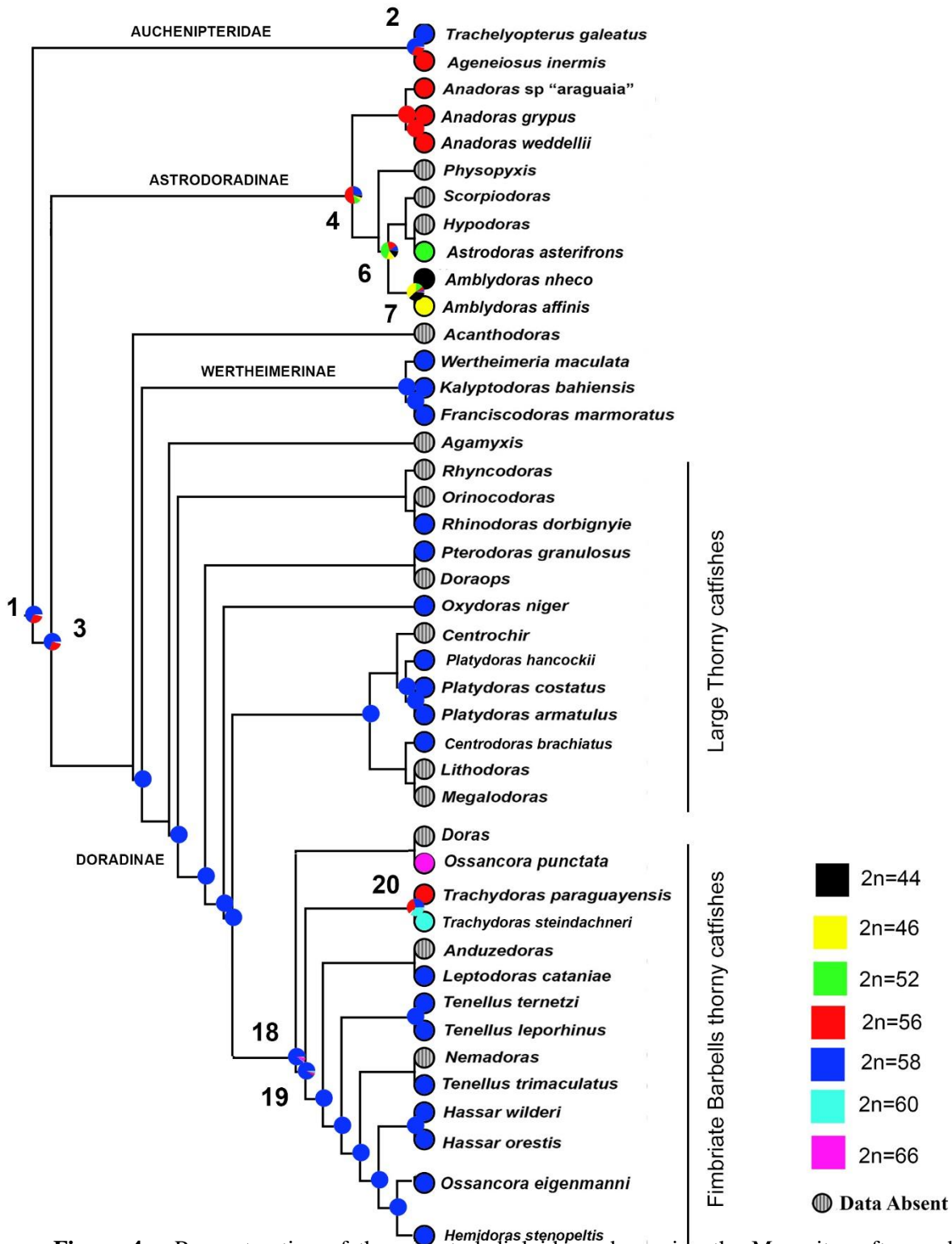


Figure 4 – Reconstruction of the ancestral diploid number using the Mesquite software, based in cytogenetic data available for Doradidae species (including the present work) and two Auchenipteridae species (sister group) integrated with the Molecular phylogeny of Arce et al., (2013).

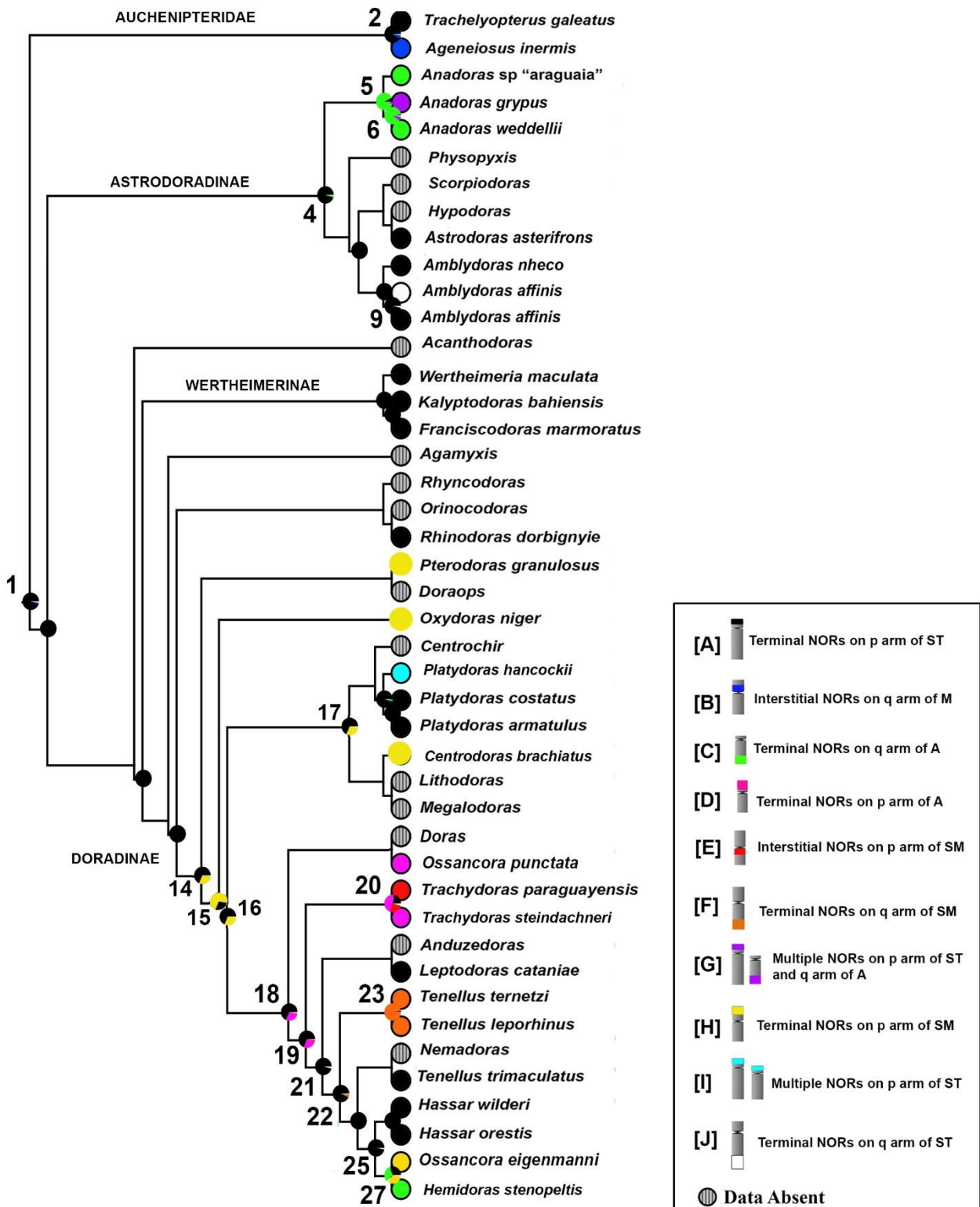


Figure 5 – Reconstruction of the ancestral NORs patterns, using the Mesquite software, based in cytogenetic data available for Doradidae species (including the present work) and two Auchenipteridae species (sister group) integrated with the Molecular phylogeny of Arce et al., (2013)

Discussion

Currently, Doradidae species are believed to have diversified from an ancestral karyotype consisting of $2n=58$ chromosomes, since this $2n$ occurs in the sister group Auchenipteridae (Lui et al. 2009; Lui et al. 2010; Lui et al. 2013a; Lui et al. 2013b; Lui et al. 2015). Moreover, the reconstruction of the ancestral characters evidenced with high probabilistic value (over to 80%) that the $2n=58$ are the plesiomorphic condition of most clades of thorny catfishes (**Table 3; Figure 4**). This plesiomorphic feature remains conserved in most of the species included in Doradidae family, occurring since the endemic thorny catfishes of Wertheimerinae subfamily (Eler et al. 2007, Takagui 2019-Chapter 1) at the more apical clades, as is the case of *Hassar*, *Leptodoras* and *Tenellus* (Milhomen et al. 2008, Takagui et al. 2017b).

The Wertheimerinae subfamily are composed by only three endemic species from São Francisco and Eastern coastal drainages (Birindelli 2014), regarding the cytogenetic features, all species shows $2n=58$ and the same karyotypic formulae, diverging only in rDNA and heterochromatin pattern. The differential heterochromatin dispersion is certainly the main mechanism related to the karyotypic diversification of Wertheimerinae species, thus, it is possible identify at least three events of great importance for this process: (1) increase of heterochromatin (*W. maculata* showed few blocks, followed by *K. bahiensis* and *F. marmoratus*); (2) transposition or translocation of 5S rDNA segments from pair 22 to the short arm of pair 19, giving rise to the multiple system shared by *K. bahiensis* and *F. marmoratus*; (3) a second event of heterochromatin amplification which increased and reorganized the repetitive DNAs in *F. marmoratus* (Takagui 2019 – Chapter 1).

Unlike Wertheimerinae, the subfamily Astrodoradinae exhibits greater karyotypic variation, with diploid numbers ranging from $2n=44$ in *A. nheco*, $2n=46$ in *A. affinis*, $2n=52$ in *Astrodoras asterifrons* and $2n=56$ in all *Anadoras* species (Baumgartner et al. 2018; Takagui

2019- Chapter 2; Present study). According to the character reconstruction, the ancestral $2n$, for this subfamily would be 56 chromosomes, however the probabilistic values were considered low (51,8%) to support this feature. Perhaps, this reflects the high karyotype variability, that being the $2n=56$ its the ancestral condition only in *Anadoras*, in the most divergent clades such as *Amblydoras* and *Astrodoras* the Mesquite software revealed very low support values (around 40%), which makes it very difficult to infer what would be the ancestor diploid number in these clades, considering only the data available at the time.

Astrodoradinae contains the species with the smallest $2n$ when compared to the other subfamilies of *Doradidae*. Regardless of not knowing what would be the ancestral condition for this feature, is the fact that centric fusions played an important role in the group diversification. Chromosome fusions can occur either through loss of the capping function, when telomeric repeats are still present, or loss of telomeric repeats that maintain a functional telomere (Murnane 2006). According to Ocalewicz (2013), telomeric sequences in pericentromeric or interstitial regions are potential vestiges of chromosome fusion. Pericentric ITS were detected in *Amblydoras affinis* (Guama River) and in *Astrodoras asterifrons*, but in species of *Anadoras* that have 56 chromosomes, no ITS was observed. Thus, the reduction of $2n$ in these species occurred as independent chromosomal fusions, being that in *Amblydoras affinis* and *Astrodoras asterifrons*, some ITS probably remained due to inactivation of telomeres, unlike *Anadoras* where it was not possible to detect ITS possibly due to the elimination of the telomeric sequences or a low copy content, making it impossible to identify through after fluorescent *in situ* hybridization.

Amblydoras species, exhibited the smaller diploid numbers already described for thorny catfishes, considering the hypothetically ancestral karyotype ($2n = 58$), it was necessary seven and six centric fusions events, to originate the karyotypes described for *A. nheco* and *A. affinis* respectively. However, FISH with telomeric probes detected ITS only in

two chromosome pairs in *A. affinis*, the other ITS that were expected were probably not detected due to (i) mechanisms of fusions related to total elimination of telomeric motifs, similar to which must have occurred in *Anadoras*; (ii) post-fusion repair mechanisms, since the presence of telomeric sites in interstitial regions is not a usual condition; (iii) a small amount of motifs [TTAGGG]_n that makes it impossible to detection by FISH.

The presence of such peculiar karyotypes associated with broad phenotypic plasticity and taxonomic problems, makes *Amblydoras* a very interesting group for cytogenetic studies. Less than a decade ago, Sousa (2010) taxonomically reviewed the subfamily Astrodoradinae, and proposed that the species *A. hancockii*, *A. gonzalezi*, *A. nauticus*, *A. inculpitus*, *A. monitor* and *A. truncatus* are synonyms of *A. affinis*. This finding remains controversial considering the molecular markers that do not recognize this grouping as monophyletic (Arce et al. 2013), as well as the cytogenetic data, which allowed to easily distinguish two a priori populations classified as *A. affinis* by means of the position of the NORs and also by the distribution of heterochromatin (present study).

The subfamily Doradinae includes most species thorny catfishes and can be divided into two groups: the large and the barbells fimbriate thorny catfishes. In both groups, $2n = 58$ is a strongly supported ancestral condition (greater than 80%), and occurs in most species, whose differentiation is possible only by karyotype formulas, heterochromatic distribution and rDNA pattern. In this sense, the pericentric inversions are the rearrangement with major importance for karyotypic divergence in Doradinae (Eler et al. 2007, Takagui et al. 2017a, 2017b, Baumgärtner et al. 2016, 2018). This structural rearrangement often interferes in gene expression, causing some damage in the structure of the gene or inhibiting its activity due to the position effect (Snustad 2013, Kasahara 2009). These consequences are evolutionarily very important, because they not only give rise to genetic variability but also

enhance the occurrence of reproductive isolation, which contributes significantly to the process of speciation (King et al. 1993, Noor et al. 2001).

The majority of the fimbriate barbells thorny catfishes species also shows $2n=58$ chromosomes, however can be easily discriminated by the heterochromatin and rDNA sites distribution (Table 1). A remarkable feature of this group are the presence of many metacentric chromosomes and high content of heterochromatin as observed in *T. steindachneri* and *H. stenopeltis*. In these clade also occurs species with the high diploid numbers described for Doradidae: *T. steindachneri* with $2n=60$ chromosomes and *O. punctata* with 66 chromosomes, both originated by one and three centric fission events.

In addition to the chromosomal rearrangements, heterochromatic components also play an important role in karyotypic diversification of Doradinae. In the large thorny catfishes clade, the species *C. brachiatus*, *P. granulatus* and *O. niger* showed that $2n = 58$ ($22m + 18sm + 18st-a$) and syntenic rDNAs sites on short arm of pair 16. These high similarity reinforce the close relationship between these species which were discriminated only by the distribution of the heterochromatic regions. The comparative analysis of the C band observed in doradids reveals a gradual increase in the amount of heterochromatin (Eler et al. 2007). The localization and amount of heterochromatin blocks are an excellent species-specific marker for thorny catfishes (Takagui et al. 2017b), and its variability suggests the act of different families of repetitive DNAs, as is the case, of the Rex3 retrotransposons which associated with others types of repetitive DNAs, promotes chromosome rearrangements such the pericentric inversions that are important mechanisms contributing to karyotype evolution in different clades of the Doradidae family.

Within the repetitive DNAs, the rDNA is the main group investigated in Doradidae. In these family, the 18S rDNA sites have only been restricted to one chromosome pair with variations in arm position and chromosome type (**Table 1**). Analysis based on

Mesquite software evidenced that among the ten character states of NORs observed in Doradidae, the terminal NORs on short arm of subtelocentric chromosome is an ancestral feature of Doradidae with high probabilistic values (over to 80%) in most of the nodes (**Table 3, Figure 5**). Then it is evident that the variability described for the NORs distribution arose from heterochromatin amplification, pericentric and paracentric inversions or non-reciprocal translocations. Moreover, the NORs multiple systems were observed in *A. grypus* and *P. hancockii*, and probably had its origin due to reciprocal translocations involving only terminal segments containing the 18S rDNA sites in both species (Takagui 2019 – Chapter 2, present study).

According to Martins and Galetti Jr. (2001), the presence of ribosomal genes in different chromosomes pairs is the most common arrangement in fishes. In Siluriformes, the syntenic rDNA is sporadically described in different groups, but in some families, as in Tricomycetidae and Loricariidae, the synteny is considered a primitive condition (Ziemniczak et al. 2012). In Doradidae, syntenic 18S and 5S rDNA sites was observed in Wertheimerinae species, *A. asterifrons*, *A. nheco*, *A. grypus*, *P. armatulus*, *P. hancockii*, *R. dorbignyi*, *C. brachiatus*, *P. granulatus*, *O. niger* and *O. eigenmanni*, being that in the seven species the synteny was observed in a small subtelocentric pair and that can be considered a homeologue chromosome (**Table 1**). In *O. eigenmanni* and in large thorny catfishes clade, the syntenic rDNA sites was detected in a submetacentric pair (Baumgartner et al. 2018; present study), although it is morphologically differentiated, this chromosomal pair is nothing more than a derived state from the subtelocentric pair which arose due to amplification of the 5S rDNA sites, an event that may have been triggered by some kind of transposable element.

When compared with the 18S rDNA distribution, the 5S rDNA is very variable, showing numerical and structural variability representing an excellent cytotaxonomic marker for Doradidae (**Table 1**). The presence of different multigene families in non-transcribed

regions (NTS) of 5S rDNA is common in fish, including transposable elements such as LINES, SINES and non-LTR retrotransposons (Gouveia et al. 2017; Rebordinos et al. 2013), as well as in histones DNA (Hashimoto et al. 2011; Piscor et al. 2018), small nuclear RNA (Duilio et al. 2015) and in different microsatellites (Gouveia et al. 2017). These multigenic families may be important for transcriptional activity or for genomic dispersion of 5S rDNA (Barros et al. 2017). The available cytogenetic data about the physical mapping of rDNA sequences in thorny catfishes are scarce, and future analyses in species belonging to different clades are necessary for better understanding of the evolutionary dynamics of this repetitive DNA.

The ancestral character reconstruction, confirm that the $2n=58$ chromosomes and terminal NORs on short arm of one subtelocentric pair are the basal feature of Doradidae, corroborating previous studies (Eler et al. 2007; Milhomem et al. 2008; Takagui et al. 2017a; 2017b; Baumgartner et al. 2018). Being that our results suggest that the karyotypic diversification of Doradidae is a dynamic process, promoted under the influence of three chromosome rearrangements: (1) pericentric inversions responsible for the variability in chromosome morphology in species bearing 58 chromosomes, such observed in the large and fimbriate barbells thorny-catfishes of Doradinae subfamily; (2) chromosomal fusions that led to the reduction of the diploid numbers in species of Astrodoradinae subfamily and (3) centric fissions that gave rise to $2n=60$ and $2n=66$ described for *Trachydoras steindacneri* and *Ossancora punctata*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Acknowledgements

The authors are grateful to the Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Biologia Geral for providing the laboratory infrastructure to carry out this work; ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), for permitting the collection of biological material. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Finance Code 001 and Fundação Araucária.

Table 1 – Cytogenetic data available for the Neotropical freshwater Doradidae family.

GENERA/ SPECIES	2n	KARYOTYPIC FORMULAE	Ag-NORs	18S rDNA	5S rDNA	REFERENCES
DORADIDAE						
Subfamily Wertheimerinae						
<i>Wertheimeria maculata</i>	58	24m+14sm+8st+12a	Pair 20 (p arm)	-	-	Eler et al. (2007)
<i>Wertheimeria maculata</i>	58	24m + 12sm + 8st + 14st-a	-	Pair 22 (p arm)	Pair 22 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 1
<i>Kalyptodoras bahiensis</i>	58	24m + 12sm + 8st + 14st-a	-	Pair 22 (p arm)	Pair 22 (p arm)/ Pair 19 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 1
<i>Franciscodoras marmoratus</i>	58	24m + 12sm + 8st + 14st-a	-	Pair 22 (p arm)	Pair 22 (p arm)/ Pair 19 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 1
Subfamily Astrodoradinae						
<i>Anadoras</i> sp. “araguaia”	56	24m+10sm+8st+14a	Pair 28 (q arm)	Pair 28 (q arm)	Pair 15 (p arm)	Baumgärtner et al. (2018)
<i>Anadoras grypus</i>	56	16m + 18sm + 22st-a	Pair 11 (p arm)/One chromosome 28 (q arm)	Pair 11 (p arm)/One chromosome 28 (q arm)	Pair 11 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 2
<i>Anadoras weddellii</i>	56	24m + 10sm + 22st-a	-	Pair 28 (q arm)	Pair 15 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 2
<i>Astrodoras asterifrons</i>	52	16m + 18sm + 18st-a	-	Pair 24 (p arm)	Pair 24 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 3
<i>Amblydoras affinis</i> (Tapajós River)	46	20m + 14sm + 12st-a	-	Pair 18 (p arm)	Pair 19 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 3
<i>Amblydoras affinis</i> (Guamá River)	46	16m + 10sm + 16st-a	-	Pair 16 (q arm)	Pair 20 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 3
<i>Amblydoras nheco</i>	44	18m + 18sm + 8st-a	-	Pair 19 (p arm)	Pair 19 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 3
Subfamily Doradinae						
<i>Platydoras</i> cf. <i>costatus</i>	58	26m+16sm+4st+2a	Pair 20 (p arm)	-	-	Milhomem et al. (2008)

<i>Platydoras armatulus</i> (Miranda River)	58	22m+14sm+18st+4a	-	-	-	Takagui et al. (2017a)
<i>Platydoras armatulus</i> (Paraná River)	58	24m+14sm+20st	Pair 25 (p arm)	Pair 25 (p arm)	Pairs 18, 25	Baumgärtner et al. (2018)
<i>Platydoras hancockie</i>	58	26m + 14sm + 18st-a	-	Pairs 26 and 28 (p arms)	Pair 26 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 3
<i>Centrodoras brachiatus</i>	58	22m + 18sm + 18sm	-	Pair 16 (p arm)	Pair 16 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 3
<i>Pterodoras granulatus</i> (Upper Paraná River)	58	16m + 16sm + 14st + 12a	-	-	-	Takagui et al. (2017a)
<i>Pterodoras granulatus</i> (Solimões River)	58	22m + 18sm + 18sm	-	Pair 16 (p arm)	Pair 16 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 3
<i>Oxydoras niger</i> (Tocantins River)	58	20m+16sm+8st+14a	Pair 15 (p arm)	-	-	Fenocchio et al. (1993)
<i>Oxydoras niger</i> (Catalão Lake)	58	22m + 18sm + 18sm	-	Pair 16 (p arm)	Pair 16 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 3
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	58	20m+20sm+4st+14a	Pair 16 (p arm)	-	-	Fenocchio et al. (1993)
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	58	18m+16sm+12st+12a	Pair sm (p arm)	-	-	Fenocchio et al. (1993)
<i>Rhinodoras dorbignyi</i> (Miranda River)	58	24m+12sm+12st+10a	Pair 24 (p arm)	Pair 24 (p arm)	Pairs 18,24,26	Baumgärtner et al. (2018)
<i>Ossancora punctata</i> (Miranda River)	66	12m+8sm+6st+40a	-	-	-	Takagui et al. (2017a)
<i>Ossancora eingenmanni</i>	58	30m+14sm+14st	Pair 17 (p arm)	Pair 17	Pairs 10, 17,23	Baumgärtner et al. (2018)
<i>Trachydoras paraguayensis</i> (Lower Paraná River)	56	32m+20sm+4st	sm Pair	-	-	Fenocchio et al. (1993)
<i>Trachydoras paraguayensis</i> (Lower Paraná River)	56	36m+16sm+4st	Pair 11 (Interstitial)	Pair 11 (Interstitial)	Pair 22	Baumgärtner et al. (2016)
<i>Trachydoras steindacneri</i>	60	30m + 14sm + 16st-a	-	Pair 28 (p arm)	Pair 18 (p arm)	Takagui 2019 – chapter 3
<i>Tenellus leporhinus</i>	58	36m+18sm+4st	Pair 23 (q arm)	Pair 23	Pair 10	Takagui et al. (2017b)

<i>Tenellus trimaculatus</i> (ZZ/ZW)	58	♀ 21m+18sm+12st+7a ♂ 20m+18sm+12st+8a	Pair 22 (p arm)	Pair 22 (p arm)	Four sites	Takagui et al. (2017b)
<i>Tenellus ternetzi</i> (Jari River)	58	44m+12sm+2 a	Pair 24 (q arm)	-	-	Milhomem et al. (2008)
<i>Hassar orestis</i>	58	32m+20sm+6a	Pair 22 (p arm)	-	-	Milhomem et al. (2008)
<i>Hassar cf. orestis</i>	58	32m+18sm+8a	Pair 20 (p arm)	-	-	Milhomem et al. (2008)
<i>Hassar wilderi</i>	58	32m+16sm+10a	Pair 25 (p arm)	-	-	Eler et al. (2007)
<i>Hassar wilderi</i>	58	26m+20sm+12st	Pair 28 (p arm)	Pair 28 (p arm)	Four sites	Takagui et al. (2017b)
<i>Hassar</i> sp.	58	42m+14sm+2a	Pair 7 (p arm)	-	-	Milhomem et al. (2008)
<i>Hemidoras stenopeltis</i>	58	34m + 16sm + 8st-a	-	Pair 28 (q arm)	Pairs 7 and 8 (p arms)	Takagui 2019 – Chapter 3
<i>Leptodoras cataniae</i>	58	24m+16sm+14st+4a	Pair 23 (p arm)	Pair 23 (p arm)	Four sites	Takagui et al. (2017b)

Legend: 2n= diploid number; m=metacentric; sm= submetacentric; st=subtelocentric; a=acrocentric; Ag-NORs= Nitrate impregnation for detect the NORs sites; rDNA= ribosomal desoxiribonucleic acid; p arm= short arm; q arm= long arm. The informations produced by dissertations, PhD thesis or abstracts in national / international congresses were not included in the table.

Table 2 - Information about the species, collection sites and Vouchers in Ichthyological Collections.

SPECIES	N° INDIVIDUALS	LOCALITIES	COORDINATES	VOUCHERS
<i>Astrodoras asterifrons</i>	2 females / 2 males	Negro River – Central Amazon basin	0°58'31.68''S 62°55'40.79''W	MZUEL17813
<i>Amblydoras affinis</i>	1 female	Tapajós River – Lower Amazon basin	2°45'50.70''S 55°05'08.93''W	MZUEL17801
	1 male and 5 sex not defined	Guama River – South Atlantic coastal drainage north	1°37'32.93''S 47°51'32.32''W	MZUEL19440
<i>Amblydoras nheco</i>	4 sex not defined	Marginal lagoon of Cuiaba River – Upper Paraguay basin	16°12'46.12''S 55°59'09.05''W	
<i>Platydoras hancockii</i>	3 males	Solimões River – Central Amazon basin	0°58'31.68''S 62°55'40.79''W	MZUEL17318
<i>Centrodoras brachiatus</i>	2 females	Negro River – Central Amazon basin	3°14'28.32''S 59°56'29.19''W	MZUEL17831
<i>Pterodoras granulosus</i>	8 males / 2 females	Solimões River – Central Amazon basin	3°14'28.32''S 59°56'29.19''W	
<i>Oxydoras niger</i>	6 females	Catalao Lake – Central Amazon basin	3°09'49.8"S 59°54'47.5"W	MZUEL17317
<i>Trachydoras steindachneri</i>	5 females / 1 male	Solimões River – Central Amazon basin	3°14'28.32''S 59°56'29.19''W	MZUEL17802
<i>Hemiodoras stenopeltis</i>	3 females / 2 male	Solimões River – Central Amazon basin	0°58'31.68''S 62°55'40.79''W	MZUEL17807

Legend: [S]= Sul; [W]=Oeste; [MZUEL]= Museum of Zoology of Londrina State University.

Table 3– Probabilistic values calculated by Mesquite software for estimated the ancestral diploid number of Doradidae.

Nodes	Diploid Numbers						
	2n=44	2n=46	2n=52	2n=56	2n=58	2n=60	2n=66
1			1.2%	28.2%	68.1%		
2			2.0%	30.4%	67.8%		
3			1.6%	26.6%	69.4%		
4			11.6%	51.8%	26.0%		
5				99.9%			
6			41.8%	19.15%	10.0%		
7	36.8%	36.9%	13.4%				
8					99.9%		
9					99.9%		
10					99.9%		
11					99.9%		
12					99.9%		
13					99.9%		
14					99.9%		
15					99.9%		
16					99.9%		
17					99.9%		
18				1.0%	89.6%		7.5%
19					90.6%	29.5%	28.8%
20				33.0%	29.1%	33.1%	
21					99.9%		
22					99.9%		
23					99.9%		
24					99.9%		
25					99.9%		
26					99.9%		
27					99.9%		
28					99.9%		

*The values highlighted in red, are the most probably ancestral character.

Table 4– Probabilistic values calculated by Mesquite software for estimated the ancestor NORs pattern of Doradidae.

Nodes	NOR Patterns									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	94.5%	3.0%	0.4%							
2	92.1%	6.3%	0.2%							
3	99.9%									
4	95.9%		3.0%				0.1%			
5	7.0%		88.4%				0.02%			
6	2.4%		88.3%				7.6%			
7	99.9%									
8	99.9%									
9	96.4%		0.08%							2.8%
10	99.9%									
11	99.9%									
12	99.9%									
13	99.9%									
14	63.1%							26.3%		
15	29.5%			1.5%				56.5%		
16	61.4%							26.6%		
17	63.3%			0.16%				26.3%		
18	68.8%			29.0%	2.0%					
19	69.4%			26.6%	2.0%					
20	21.7%			48.0%	25.1%					
21	95.8%			2.0%		0.01%				
22	93.2%			0.8%		4.8%				
23	2.0%			0.7%		96.0%				
24	99.9									
25	96.9%	1.0%						0.2%		
26	99.9									
27	30.3%		31.6%					31.6%		

Legend: q arm= long arm; p arm= short arm; [A] Terminal NORs on short arm of subtelocentric chromosome; [B] Interstitial NORs on p arm of submetacentric chromosome; [C] Terminal NORs on q arm of acrocentric chromosome; [D] Terminal NORs on p arm of acrocentric chromosome; [E] Interstitial NORs on q arm of metacentric chromosome; [F] Terminal NORs on q arm of submetacentric chromosome; [G] Multiple sites in submetacentric and acrocentric chromosomes; [H] Terminal NORs on p arm of submetacentric chromosome; [I] Multiple sites in terminal position on p arm of subtelo-acrocentric chromosomes; [J] Terminal NORs on q arm of subtelocentric chromosomes.

*The values highlighted in red are the most probably ancestral character.

References

- Arce MH, Reis ER, Geneva AJ, Sabaj PHM (2013) Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes:Doradidae). *Mol Phylogenet Evo* 67:560-577.
- Barros AV, Wolski MA, Nogaroto V, Almeida MC, Moreira-Filho O, Vicari MR. (2017) Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role?. *Gene* doi: 10.1016/j.gene.2017.01.013.
- Baumgartner L, Paiz LM, Margarido VP, Portela-Castro ALB (2016) Cytogenetics of the thorny catfish *Trachydoras paraguayensis* (Eigenmann & Ward, 1907), (Siluriformes,Doradidae): evidence of pericentric inversions and chromosomal fusion. *Cytogenet Genome Res* 1:201–206.
- Baumgartner L, Paiz LM, Takagui FHT, Lui RL, Moreira-Filho O, Giuliano-Caetano L, Portela-Castro ALB, Margarido VP (2018) Comparative Cytogenetics Analysis on Five Genera of Thorny Catfish (Siluriformes, Doradidae): Chromosome Review in the Family and Inferences About Chromosomal Evolution integrated with Phylogenetics Proposals. *Zebrafish* doi:10.1089/zeb.2017.1554.
- Bertollo LAC; Takahashi CS and MOREIRA-FILHO O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Brasil. Genet.* 1: 103-120.
- Birindelli JLO (2014) Phylogenetic relationships of the South American Doradoidea (Ostariophysi: Siluriformes). *Neotrop Ichthyol* 1:451-564.
- Eler ES, Dergam JA, Venere PC, Paiva LC, Miranda GA, Oliveria AA (2007) The karyotypes of the thorny catfishes *Wertheimeria maculata* Steindachner, 1877 and *Hassar wilderi* Kindle, 1895 (Siluriformes: Doradidae) and their relevance in doradids chromosomal evolution. *Genetica* doi:10.1007/s10709-006-0023-4.
- Eschmeyer WN (2018) *Catalog of Fishes*. California Academy of Sciences. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.a> sp. Accessed 12 July 2018.
- Fenocchio AS, Jorge LC, Venere PC, Bertollo LAC (1993) Karyotypic characterization and nucleolus organizer regions in three species of Doradidae (Pisces, Siluriformes). *Braz J Genet* 4:1097–1101.
- Ferraris CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalog primary types. Porto Alegre: *Zootaxa* (1):1-628.
- Gouveia JG, Wolf IR, Vilas Boas L, Heslop-Harrison P, Schwarzacher T, Dias AL (2017)

- Repetitive DNA in the Catfish Genome: rDNA, Microsatellites and Tc1-Mariner Transposon sequences in *Imparfinis* species (Siluriformes, Heptapteridae). *J Hered* doi:10.1093/jhered/esx065.
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F (2011) Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet. Genome Res* 134: 64-71.
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2004) Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 822 122: 239-244.
- Hughes SE, Hawley RS (2009) Heterochromatin: a rapidly Evolving species Barrier. *PLoS Biol* doi: 10.1371/journal.pbio.1000233.
- Ijdo JM, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19: 4780.
- Kasahara S (2009) *Introdução á Pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. Ribeirão Preto: SBG—Sociedade Brasileira de Genética.
- King M (1993) *Species Evolution: The Role of Chromosomal Change*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosome in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the Sao Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 552– 559.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftedwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biol J Linn Soc* 648–656.
- Lui RL, Blanco DR, Martinez JF, Margarido VP, Venere PC, Moreira-Filho O (2013a) The role of chromosomal fusion in the karyotypic evolution of the genus *Ageneiosus* (Siluriformes:Auchenipteridae) Neotrop Ichthyol 327–334.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Troy WP, Moreira-Filho O (2013b) Comparative chromosomal analysis and evolutionary considerations concerning two species of genus *Tatia* (Siluriformes, Auchenipteridae). *Comp Cytogenet* 63–71.

- Lui RL, Blanco DR, Traldi JB, Margarido VP, Moreira-Filho O (2015) Karyotypic variation of *Glanidium ribeiroi* Haseman, 1911 (Siluriformes, Auchenipteridae) along the Iguazu river basin. *Braz. J. Biol* 215-222.
- Maddison WP and Maddison DR (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. Available in: <http://mesquiteproject.org>.
- Martins C, Galetti PM (2001) Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a general rule for fishes? Genetic doi: 10.1023/A: 1013799516717.
- Martins C, Galetti Jr PM (1999) Chromosomal Localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363–367.
- Milhomem SSR, Souza ACP, Nascimento AL, Carvalho JR Jr., Feldberg E, Pieczarka JC (2008) Cytogenetic studies in fishes of the genera *Hassar*, *Platydoras* and *Opsodoras* (Doradidae, Siluriformes) from Jarí and Xingu Rivers, Brazil. *Genet Mol Biol* 83: 256–260.
- Molina WF, Alves DEO, Araújo WC, Martinez PA, Silva MFM, Costa GWWF (2010) Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. *Genetics and Molecular Research* doi:10.4238/vol9-3gmr840
- Murnane JP (2006) Telomeres and chromosome instability. *DNA Repair* 5:1082-1092.
- Noor MAF, Grams KL, Bertucci LA, Reiland J (2001) Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12084–12088.
- Ocalewicz K (2013) Telomeres in fishes. *Cytogenet Genome Res* 141: 114–125.
- Pinkel D, Straume T and Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2934-2938.
- Piscor D, Fernandes CA, Parise-Maltempi PP (2018) Conserved number of U2 snDNA sites in *Piabina argentea*, *Piabarchus stramineus* and two *Bryconamericus* species (Characidae, Stevardinae). *Neotrop Ichthyol* doi:10.1590/1982-0224-20170066.
- Rebordinos L, Cross I, Merlo A (2013) High Evolutionary Dynamism in 5S rDNA of Fish: State of the Art. *Cytogenet Gen Res* doi:10.1159/000354871.
- Snustad DP, Simmons MJ (2013) *Fundamentos de Genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Sousa LM (2010). Revisão Taxonômica e Filogenia de Astrodoradinae (Siluriformes, Doradidae). Unpublished Ph.D. dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 276p.
- Sumner AMT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75: 304-306.
- Takagui FH, Dias AL, Birindelli JLO, Swarca AC, Rosa R, Lui RL Giuliano-Caetano (2017a) First report of B chromosomes in three neotropical thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae). *Comp Cytogenet* 55–64.
- Takagui FH, Moura LF, Ferreira DC, Centofante L, Vitorino CA, Bueno V, Venere P (2017b) Karyotype diversity in Doradidae (Siluriformes, Doradidae) and presence of the heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in the family. *Zebrafish* 236–243.
- Ziemniczak K, Barros AV, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari M (2012) Comparative cytogenetic of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Italian Journal of Zoology*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

E notável que a partir da última década, ocorreu um “Renascimento” dos estudos citogenéticos envolvendo membros da Família Doradidae, que por durante um certo tempo permaneceram pouco compreendidos em relação às suas características genéticas. O aumento nos estudos cromossômicos utilizando thorny catfishes como modelo biológico certamente ocorreu em função da necessidade de se entender algumas lacunas ou conflitos taxonômicos oriundos de diferentes abordagens filogenéticas ou simples descrições de novas espécies. Diante desse contexto, o presente estudo foi inicialmente desenvolvido com intuito de ampliar o conhecimento citogenético de Doradidae, descrevendo o cariótipo de espécies ainda não estudadas ou complementando as informações de outras espécies que apresentavam somente resultados básicos.

Os resultados obtidos nessa Tese revelaram uma intensa variação cromossômica em Doradidae, principalmente no número diplóide que variou desde 44, 46, 52, 56, 58, 60 até 66 cromossomos, evidenciando a participação de rearranjos cromossômicos como as fusões centricas/tandem e fissões cêntricas. Os demais marcadores aplicados evidenciaram padrões espécie-específicos de grande valia na resolução de conflitos taxonômicos como é o caso da distribuição da heterocromatina e sítios de DNAr 18S e 5S. A compilação de todos esses dados permitiu identificar padrões de evolução cromossômica nas diferentes subfamílias de Doradidae, que serão comentados com mais detalhes nos próximos parágrafos.

Subfamília Wertheimerinae: As três espécies analisadas *Wertheimeria maculata* e *K. bahiensis* (espécies endêmicas da bacia do Atlântico Sul Leste, sendo *K. bahiensis* ameaçada de extinção) e *F. marmoratus* (espécie endêmica do rio São Francisco) exibiram $2n=58$ e a mesma fórmula cromossômica com diferenças apenas no padrão de distribuição

dos DNAr e principalmente na disposição dos blocos heterocromáticos. Nesse grupo foi verificado que a divergência no padrão heterocromático exerceu grande influência na diversificação cariotípica, e pela primeira vez nós investigamos a composição desses elementos repetitivos no cariótipo de espécies de Doradidae, evidenciando a presença do retrotransposon *Rex3* e sua possível correlação com a variação citogenética observada em Wertheimerinae. Além disso, o trabalho traz uma correlação entre a origem da diversidade citogenética observada entre as espécies dessa subfamília com os processos geomorfológicos que moldaram a ictiofauna moderna das bacias hidrográficas do Atlântico Leste e São Francisco, evidenciando um processo de especiação alopátrica via alterações cromossômicas.

Subfamília Astrodoradinae: Seis espécies, dentre as 21 formalmente reconhecidas, foram analisadas evidenciando uma acentuada variação no número diplóide de $2n= 44$ em *Amblydoras nheco*, $2n= 46$ em *Amblydoras affinis*, $2n=52$ em *Astrodoras asterifrons* e $2n= 56$ em *Anadoras* sp. “araguaia”, *Anadoras grypus* e *Anadoras weddellii*. Considerando que o $2n$ ancestral de Doradidae é 58 cromossomos, a presença de números diplóides reduzidos em Astrodoradinae indica a ocorrência de eventos independentes de Fusões cênicas/tandem, que em algumas espécies foram confirmados pela FISH com sondas teloméricas, a partir da detecção de sítios ITS. A acentuada variabilidade citogenética dessa subfamília também reflete sua complexidade taxonômica, visto que muitos grupos exibem uma certa dificuldade para serem corretamente classificados como é o caso do grupo “*Amblydoras affinis*” que provavelmente corresponde a um Complexo de espécies crípticas.

Subfamília Doradinae: a maioria das espécies de thorny catfishes dessa subfamília exibem as características cariotípicas similares ao padrão descrito em Wertheimerinae, com $2n=58$ cromossomos, altos números fundamentais devido a predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e sítios simples terminais de DNAr 18S. Algumas exceções foram observadas em: *Trachydoras paraguayensis*,

Trachydoras steindacneri e *Ossancora punctata* com números diplóides igual à 56, 60 e 66 respectivamente, assim como em *Platydoras hancockie* que exibiu um sistema múltiplo de sítios DNAr 18S. De um modo geral, em relação à Evolução cromossômica a subfamília Doradinae pode ser claramente subdividida em dois grupos: **(a) thorny catfishes de grande porte**, onde o número diplóide, as fórmulas cariotípicas e o padrão de DNAr permanecem mais conservados em relação à distribuição de heterocromatina, que é variável e portanto um excelente marcador espécie-específico que juntamente com as inversões pericêntricas são os principais elementos relacionados a evolução desse grupo. **(b) thorny catfishes de barbilhão fimbriados**: é um grupo mais variável, incluindo espécies com números diploides diferentes de 58 cromossomos, assim como espécies portadoras de cromossomos supranumerários e sexuais ZZ/ZW. A distribuição de heterocromatina e dos sítios de DNAr 18S e 5S também são mais variáveis do que nos demais taxons dessa subfamília, sugerindo um processo de evolução cariotípica influenciado principalmente por rearranjos Robertsonianos, inversões pericêntricas e dispersão de elementos repetitivos.

As informações citogenéticas aqui obtidas permitiram identificar alguns padrões evolutivos e também confirmaram problemas taxonômicos em alguns grupos de Doradidae. Nesse sentido, o DNA Barcoding foi também utilizado em associação com os marcadores cromossômicos para testar o status taxonômico de uma possível nova espécie endêmica do Alto rio Araguaia: *Anadoras* sp. “araguaia”. Os dados cromossômicos foram eficientes somente para diferenciar *A. grypus* de seus congeneres, evidenciando uma notável similaridade entre *A. weddelli* e *Anadoras* sp. “araguaia”. Entretanto o DNA barcoding separou claramente as três espécies, identificando três unidades taxonômicas moleculares operacionais (MOTUs), com alto valor de divergência genética e suportadas pelas inferências Bayesianas, Verossimilhança e por todos os algoritmos de delimitação de espécies. Sendo assim, nossos dados encorajam a descrição dessa nova espécie e confirmam mais uma vez a

importancia da citogenética e DNA barcoding para o estudo da biodiversidade, principalmente em regiões com alto grau de endemismo e ameaçadas por atividades antropogênicas, como é o caso do Alto rio Araguaia.

A Evolução cromossômica de Doradidae ainda está longe de ser completamente elucidada, para isso é necessário realizar mais estudos citogenéticos envolvendo outras espécies, visto que dentre as 95 formalmente descritas apenas 27 possuem seus cariótipos descritos. Entretanto, os dados aqui obtidos já representam uma grande contribuição não somente para a continuidade dos estudos carioevolutivos em Doradidae, mas também para futuros estudos evolutivos em grupos relacionados, dentre os quais se destacam Auchenipteridae e Aspredinidae, que assim como os thorny catfishes são peixes pouco compreendidos do ponto de vista citogenético devido à dificuldade na coleta dos exemplares e também para obter preparações cromossômicas de qualidade. Também torna-se imprescindível a revisão taxonômica em alguns grupos problemáticos, para que desse modo seja possível compreender com maior consistência as relações filogenéticas desse importante grupo de peixes, que tem tudo para se tornar um excelente modelo para estudos evolutivos.