



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

FÁBIO HIROSHI TAKAGUI

**“Estudo da diversidade e evolução cromossômica de Doradidae  
(Siluriformes)”**

---

Londrina  
2015



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

FÁBIO HIROSHI TAKAGUI

**“Estudo da diversidade e evolução cromossômica de Doradidae  
(Siluriformes)”**

FÁBIO HIROSHI TAKAGUI

**“Estudo da diversidade e evolução cromossômica de Doradidae  
(Siluriformes)”**

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

Orientadora: Dra. Lucia Giuliano-Caetano.  
Co-orientador: Dr. Alberto Sergio Fenocchio.

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

T136e Takagui, Fábio Hiroshi.  
Estudo da diversidade e evolução cromossômica de Doradidae (Siluriformes) /  
Fábio Hiroshi Takagui. – Londrina, 2015.  
131 f. : il.

Orientador: Lucia Giuliano-Caetano.  
Coorientador: Alberto Sergio Fenocchio.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual  
de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética  
e Biologia Molecular, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Peixe – Citogenética – Teses. 2. Peixe – Cariótipos – Teses. 3. Bagre (Peixe) –  
Teses. 4. Cromossomos – Teses. 5. Evolução (Biologia) – Teses. I. Giuliano-Caetano,  
Lucia. II. Fenocchio, Alberto Sergio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro  
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.  
IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 597.554.4

FÁBIO HIROSHI TAKAGUI

**“Estudo da diversidade e evolução cromossômica de Doradidae  
(Siluriformes)”**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Dra. Ana Lucia Dias  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dr. Paulo Roberto A.M. Affonso  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia –  
UESB

---

Dr. Marcelo Ricardo Vicari  
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

---

Dra. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2015.

A Deus, minha família e a todas as pessoas que contribuíram durante a realização desse trabalho!!!

“Quando você acha que sabe todas as perguntas, vem a vida e muda todas as respostas”.

Bob Marley

“Paciência e perseverança são virtudes que tem o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem”.

John Lennon

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me fortalecer nos momentos mais difíceis e também por colocar em meu caminho algumas pessoas, sem as quais eu jamais teria alcançado mais essa etapa da minha jornada acadêmica.

Aos órgãos fomentadores de pesquisa científica (CNPq e Fundação Araucária) pela contribuição financeira. À Universidade Estadual de Londrina por disponibilizar toda estrutura laboratorial e também recursos humanos para minha formação.

Aos meus pais: **Rosania e Edson**, por sempre acreditarem em meu potencial e não medir esforços para que eu pudesse continuar estudando e conquistando meu espaço. Além de serem meus exemplos, foram também a base de toda minha personalidade formada a partir de valores que somente vocês foram capazes de me ensinar. Eu amo vocês!

Aos meus familiares, em especial aos meus avós: **Tereza, Luis, Geraldo e Edna e tias Regina, Ronilze e Angela**. A vocês sou grato pela confiança em mim depositada e por terem me auxiliado não só financeiramente, mas também emocionalmente, sempre me mostrando o melhor caminho a ser seguido e muitas vezes facilitando minha vida.

À minha querida orientadora e grande amiga, professora **Lucia Giuliano-Caetano**, minha “mãezinha científica”, que me adotou e nunca deixou de me ajudar tanto em relação à iniciação científica quanto na minha vida pessoal. Você é uma pessoa inigualável, extremamente ética, responsável e compreensiva. A senhora foi uma excelente orientadora, e me ensinou valores que eu levarei comigo pelo resto da minha vida. Muito obrigado!

Aos professores: **Ana Lúcia Dias, Alberto Fenocchio, Ana Claudia Swarça e Renata da Rosa** pessoas que construíram os alicerces da Citogenética de Peixes no Brasil e que por ela dedicaram boa parte de suas vidas, sendo então, a minha inspiração e de muitos outros citogeneticistas. Seus esforços para mim servirão de parâmetro para, quem sabe um dia

se tornar um profissional tão bom quanto vocês foram e ainda são!

Ao Professor **José Birindelli**, tenho muito a agradecer não só pela identificação das espécies, mas principalmente por ter sido a pessoa que despertou o interesse em mim de estudar os doradídeos! Te admiro muito como profissional e mais ainda como ser humano, sempre humilde, atencioso e totalmente dedicado ao seu trabalho.

À todos os meus colegas de laboratório, em especial àquelas que eu considero as maiores amigas que eu fiz durante esses sete anos: **Natalia, Jamile, Josi, Marceléia, Tatiane, Laura, Juceli, Mariana, Larissa Pires, Raquel Bozini, Poliana, Ivan, Angélica Rossoti, Ana Beatriz, Matheus, Raquel**. Vocês foram e ainda são muito importante em minha vida, muito obrigado pelos momentos de descontração no laboratório. E aproveito também para agradecer a paciência e compreensão que tiveram comigo em alguns momentos de nervosismo, ou como vocês gostam de falar em algum momento “Raquel”.

Às minhas grandes amigas: **Neide, Marcia, Regina, Lucia e Tia Mari**. Todas foram “mães” que me acolheram com muito afeto, me fazendo sentir como um filho. Nos piores momentos da minha vida, foram vocês que mostraram que nada é conquistado facilmente, e que os momentos de adversidade são aqueles que nos fazem refletir e crescer para continuar firme e lutando para conquistar nossos objetivos!

Aos meus melhores amigos: **Angélica (Geh), Thiago Simão (Thi) e Jaqueline (Jaque)**, vocês são pessoas pelas quais eu tenho um afeto enorme, um sentimento fraternal. Agradeço por tornarem minha vida mais feliz, seja no vôlei, na balada, nas comilanças, viagens... Quero a companhia de vocês eternamente! E mesmo que um dia cada um tenha que seguir caminhos diferentes, para mim vocês sempre serão os melhores!

## LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

**TABELA 1** – Espécies analisadas no presente estudo e seus respectivos locais de coleta. **NI**= sexo não identificado; ♂= macho; ♀= fêmea

Capítulo 1

**TABELA 1: Dados Citogenéticos disponíveis para Família Doradidae: 2n**= número diplóide; **RON**= região organizadora de nucléolos; ♀ = fêmea; ♂ = macho; **T**= terminal; **IN**= intersticial; **S**= simples; **m**= metacêntrico; **sm**= submetacêntrico; **st**= subtlocêntrico; **a**= acrocêntrico; **FC**= fórmulas cariotípicas

**TABELA 2** – Espécies analisadas no presente estudo e seus respectivos locais de coleta. **M**= machos; **F**= fêmeas; **NI**= sexo não identificado

Capítulo 2

**TABELA 1** – Tamanho amostral separado de acordo com a localidade onde foram capturados os exemplares de *Pterodoras granulosus* analisados no presente estudo. **M**= machos; **F**= fêmeas; **SNI**= sexo não identificado; **T**= total; **S**= Sul; **O**= Oeste

**TABELA 2** – Frequência do microcromossomo supranumerário observado em alguns exemplares de *Pterodoras granulosus* provenientes do rio Paraná

Capítulo 3

**TABELA 1** – Tamanho amostral separado de acordo com a localidade onde foram capturados os exemplares de *Platydoras armatulus* analisados no presente estudo. **M**= machos; **F**= fêmeas; **SNI**= sexo não identificado; **T**= total; **S**= Sul; **O**= Oeste

**TABELA 2** – Frequência dos cromossomos supranumerários em exemplares de *Platydoras armatulus* provenientes do rio Miranda-Corumbá (bacia hidrográfica do rio Paraguai). Os asteriscos correspondem aos exemplares portadores de RONS múltiplas

## LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- FIGURA 1** – **Diversidade ictiofaunística dos Otophysi**: em destaque alguns representantes neotropicais da ordem Siluriformes. **Fonte**: Nakatani et al. (2011) com modificações
- FIGURA 2** – Exemplar de *Platydoras armatulus*, em destaque as principais características morfológicas da Família Doradidae. **Fonte**: <http://wikipeixes.com.br> acesso em: 14/07/2014
- FIGURA 3** – Hipótese de relações filogenéticas da família Doradidae baseada em caracteres morfológicos. **Fonte**: Birindelli (2014)
- FIGURA 4** – Hipótese de relações filogenéticas da família Doradidae baseada em caracteres moleculares (genes: rag1,16S e COI) para família Doradidae. **Fonte**: Arce et al. (2013)
- FIGURA 5** – Mapa evidenciando os locais e suas respectivas coordenadas geográficas onde foram coletadas todas as espécies da Família Doradidae analisadas nesse estudo. **Fonte**: **Fábio Hiroshi Takagui**.
- FIGURA 6** – Espécies da Família Doradidae analisadas no presente estudo: **a)** *Pterodoras granulosus*; **b)** *Platydoras armatulus*; **c)** *Rhinodoras dorbignyi*; **d)** *Ossancora asterophysa*; **e)** *Ossancora punctata*; **f)** *Agamyxis pectinifrons*; **g)** *Anadoras wedelli*; **h)** *Trachydoras paraguayensis* **i)** *Amblydoras affinis*; **j)** *Amblydoras affinis*

Capítulo 1

- FIGURA 1** – Cariótipos após coloração com Giemsa: **a)** *Amblydoras affinis*; **b)** *Amblydoras affinis*; **c)** *Trachydoras paraguayensis*; **d)** *Anadoras wedelli*; **e)** *Agamyxis pectinifrons*; **f)** *Rhinodoras dorbignyi*; **g)** *Ossancora asterophysa*; **h)** *Ossancora punctata*. Os **asteriscos vermelhos** indicam os cromossomos portadores de constrições secundárias

**FIGURA 2** – Pares cromossômicos portadores das RONS e sítios de DNAr 5S

**FIGURA 3** – Metáfases mitóticas submetidas ao bandamento C: **a)** *Amblydoras affinis*; **b)** *Amblydoras affinis*; **c)** *Trachydoras paraguayensis*; **d)** *Anadoras wedelli*; **e)** *Agamyxis pectinifrons*; **f)** *Rhinodoras dorbignyi*; **g)** *Ossancora asterophysa*; **h)** *Ossancora punctata*. As **setas pretas** destacam os pares metacêntricos portadores de heterocromatina biterminal; **setas vermelhas**: microcromossomos Bs

**FIGURA 4**– Características estruturais e comportamento meiótico dos cromossomos supranumerários observados em alguns indivíduos de *Ossancora punctata* do rio Miranda, submetidos à Coloração convencional **(a), (b), (c)**; Bandamento C **(d), (e), (f), (g)**; Dupla coloração como fluorocromos base específicos DAPI **(h)** e CMA<sub>3</sub> **(i)**.

**FIGURA 5** – Filogenia Consenso da Família Doradidae, baseada em caracteres morfológicos de acordo com **Sousa (2010)** e **Birindelli (2014)** associada à variação observada no número diplóide. Em azul as espécies que possuem informações cariotípicas

**FIGURA 6**– Esquema ilustrando a Hipótese de diversificação do número diplóide em espécies de Doradidae

**FIGURA 7** – Padrões de dispersão dos DNAr 18S e 5S, e suas correlações filogenéticas

**FIGURA 8** – Esquema demonstrando a provável origem dos microcromossomos supranumerários observados em *Ossancora punctata*

Capítulo 2

**FIGURA 1** – Mapa indicando os locais onde foram coletados os exemplares de *Pterodoras granulosus*. **(1)** Rio Miranda, afluente do rio Paraguai; **(2)** Rio Paraná- canal principal (porção Alta); **(3)** Lago Catalão, sistema hidrográfico do rio Amazonas

**FIGURA 2** – Cariótipos após coloração convencional e bandamento C: **Rio Paraná (a)** coloração convencional e **(b)** banda C; **Rio Miranda (c)** coloração convencional e **(d)** banda C; **Lago Catalão (e)** coloração convencional e **(f)** banda C. Os boxes azuis evidenciam o heteromorfismo de tamanho no braço curto observado em alguns

exemplares de *P. granulosus* coletados na calha principal do rio Paraná

**FIGURA 3** – Ideogramas representando as possíveis configurações para o par 12 nos exemplares do Alto rio Paraná. **Sm12A**= cromossomo submetacêntrico 12 forma A; **Sm12B**= cromossomo submetacêntrico forma B

**FIGURA 4**- Mapeamento físico via impregnação por nitrato de prata e FISH dos sítios de RONS (DNAr 18S) e DNAr 5s nas diferentes populações de *Pterodoras granulosus*

**FIGURA 5**- Características estruturais e comportamento meiótico dos cromossomos supranumerários observados em alguns indivíduos de *Pterodoras granulosus* do rio Paraná, submetidos a: Coloração convencional **(a), (b), (c), (d)**; Bandamento C **(e), (f), (g)**; Dupla coloração como fluorocromos base específicos DAPI **(h)** e CMA<sub>3</sub> **(i)**.

**FIGURA 6** – Ideogramas representando a localização dos diferentes marcadores cromossômicos utilizados no presente estudo para caracterização da variabilidade interpopulacional de *Pterodoras granulosus*. **a) Alto rio Paraná**, com destaque para o heteromorfismo de tamanho originado por deleção no braço curto de um dos cromossomos do par 12 e também para o microcromossomo B observado em alguns exemplares; **b) Rio Miranda**, destacando a ocorrência de inversão pericêntrica em um dos cromossomos do par 14 portador do DNAr 5S (padrão raro) e o heteromorfismo de tamanho no par 19 observado somente nas RONS; **c) Lago Catalão**, apresentou maior quantidade de heterocromatina, fórmula cariotípica diferenciada e heteromorfismo de tamanho no par 23 atribuído á amplificação das regiões heterocromáticas

**FIGURA 1** – Mapa indicando os locais onde foram coletados os exemplares de *Platydoras armatulus*

**FIGURA 2** – Cromossomos mitóticos metafásicos de duas populações de *Platydoras armatulus*: **a)** Cariótipo (coloração com Giemsa); **b)** Cariótipo submetido ao bandamento C, evidenciando muita heterocromatina distribuída sob a forma de grandes blocos terminais situados principalmente no braço curto de cromossomos meta/submetacêntricos. Os boxes contêm os microcromossomos supranumerários

**FIGURA 3** – Distribuição dos DNA ribossômicos: **Impregnação pelo nitrato de prata a)** padrão simples (rio Paraná e rio Miranda); **b)** padrão múltiplo (rio Miranda); **FISH com sonda DNAr 18S c)** padrão simples (rio Paraná e rio Miranda); **d)** padrão múltiplo (rio Miranda); **FISH com sonda DNAr 5S e)** exemplares do rio Miranda **f)** exemplares do rio Paraná. Os asteriscos indicam as RONS; a seta preta evidencia o microcromossomo B; setas brancas: sítios de DNAr 5S

**FIGURA 4** – Esquema demonstrando os padrões de RONS que ocorrem em exemplares simpátricos no rio Miranda (bacia hidrográfica do rio Paraguai). O asterisco azul destaca a correlação que existe entre a maior frequência de cromossomos supranumerários nos indivíduos portadores de sítios múltiplos de RONS

**FIGURA 5** – Análise do comportamento meiótico do cromossomo B de *Platydoras armatulus*: **Coloração Convencional a)** metáfase espermatogonial; **b)** Paquíteno inicial; **c)** Diplóteno/Diacinese; **Bandamento C: d)** Paquíteno final; **e)** Metáfase I. **Coloração com Fluorocromos: f)** Paquíteno tardio corado com DAPI **g)** Paquíteno tardio corado com CMA<sub>3</sub>; **h)** Metáfase I corada com DAPI; **i)** Metáfase I após coloração com CMA<sub>3</sub>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	<b>Aspectos Biológicos, Taxonômicos e Biogeográficos</b> .....	18
2.2	<b>Estudos Filogenéticos em Doradidae</b> .....	23
2.3	<b>Características Citogenéticas da família Doradidae.</b> .....	29
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
3.1	<b>GERAL</b> .....	32
3.2	<b>ESPECÍFICOS</b> .....	32
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1	<b>Espécies analisadas e Locais de Coleta</b> .....	33
4.2	<b>Metodologia</b> .....	34
4.2.1	<i>Técnicas para obtenção de cromossomos (mitóticos e meióticos)</i> .....	34
4.2.1	<i>Bandamentos cromossômicos</i> .....	36
4.2.3	<b>Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)</b> .....	36
	<b>ANEXOS</b> .....	37
	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	41
	<b>CAPÍTULO 1 – “A evolução cromossômica da Família Doradidae (Siluriformes), interpretada a partir dos perfis citogenéticos de sete espécies da bacia Platina e Amazônica”</b> .....	46
	<b>Resumo</b> .....	48
	<b>Introdução</b> .....	49
	<b>Materiais e Métodos</b> .....	50
	<b>Resultados</b> .....	51
	<b>Discussão</b> .....	54
	<b>Anexos</b> .....	61
	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	71

<b>CAPÍTULO 2 - “Caracterização citogenética de três populações do armado <i>Pterodoras granulosus</i> (Siluriformes-Doradidae): evidências de diversificação microestrutural associada ao distanciamento geográfico”</b> .....	75
<b>Resumo</b> .....	77
<b>Introdução</b> .....	78
<b>Materiais e Métodos</b> .....	79
<b>Resultados</b> .....	80
<b>Discussão</b> .....	82
<b>ANEXOS</b> .....	88
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	95
<b>CAPÍTULO 3 – “Polimorfismo de RONS e cromossomos supranumerários em <i>Platydoras armatulus</i> (Siluriformes-Doradidae)”</b> .....	100
<b>Resumo</b> .....	101
<b>Introdução</b> .....	102
<b>Materiais e Métodos</b> .....	103
<b>Resultados</b> .....	104
<b>Discussão</b> .....	106
<b>ANEXOS</b> .....	113
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	120
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	125



TAKAGUI, Fábio Hiroshi. “Estudo da diversidade e evolução cromossômica de Doradidae (Siluriformes)”. 2015. 129 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

Os peixes da Família Doradidae ocorrem em águas continentais da América do Sul, onde exercem diferentes funções ecológicas, atuando como dispersores de sementes e também como controladores biológicos. Essa família também possui importância econômica, sendo que algumas espécies são apreciadas na pesca esportiva e pelo mercado aquarífilo. Os primeiros estudos cariotípicos em Doradidae foram desenvolvidos há mais de duas décadas. Desde então pouco conhecimento foi gerado sobre a organização cromossômica desses peixes que passaram a ser vistos como um grupo cuja evolução cariotípica é conservativa com a maioria das espécies portando 58 cromossomos e RONS simples terminais. Perante esse cenário, repleto de lacunas e diante de uma diversidade subestimada, o presente estudo investigou a estrutura cromossômica e sua variabilidade em nove espécies de doradídeos amazônicos e da bacia Platina. Tais informações possibilitaram reconstituir alguns passos da história carioevolutiva assim como auxiliar na resolução de questões filogenéticas que, mesmo após análises morfológicas e moleculares, permanecem conflitantes. Uma acentuada variabilidade cariotípica foi detectada na quantidade de cromossomos ( $2n=46$  em *Amblydoras affinis*;  $2n=56$  em *Anadoras wedelli* e *Trachydoras paraguayensis*;  $2n=58$  em *Agamyxis pectinifrons*, *Ossancora asterophysa*, *Rhinodoras dorbignyi*, *Pterodoras granulosus* e *Platydoras armatulus*;  $2n=60$  em *Amblydoras affinis* até  $2n=66$  cromossomos em *Ossancora punctata*). Tal variação, até então nunca relatada para essa família, evidenciou a participação de diferentes rearranjos cromossômicos estruturais (inversões pericêntricas, translocações Robertsonianas e fissões cêntricas). Além dessa variabilidade macroestrutural, nas espécies *Ossancora punctata*, *Platydoras armatulus* e *Pterodoras granulosus* foi descrita pela primeira vez, a ocorrência de cromossomos supranumerários. Tais microcromossomos Bs exibiram características morfológicas, frequência, quantidade e comportamento meiótico particulares em cada uma dessas espécies. Contudo eles aparentemente surgiram como consequência de eventos envolvendo cromossomos do complemento padrão. Desse modo, a origem dos microcromossomos em *Ossancora punctata* foi sugerida como consequência das fissões cêntricas responsáveis pelo aumento no número diplóide de 58 para 66 cromossomos. Diferentemente, a atividade saltatória de elementos transponíveis envolvida na origem de um sistema de RONS múltiplas em alguns exemplares de *P. armatulus* do rio Miranda parece ter contribuído para a formação e também manutenção desse polimorfismo numérico nessa população. Já em *P. granulosus*, o cromossomo B observado provavelmente teve sua origem a partir de uma deleção em uma região intersticial próxima ao centrômero de algum cromossomo do complemento padrão, esse fragmento inicialmente desprovido de telômeros e eucromático sofreu um processo de heterocromatinização e foi mantido nessa população por apresentar sequências centroméricas que permitiram sua segregação meiótica normal. De um modo geral, esse estudo além de auxiliar na compreensão de questões filogeneticamente conflitantes como observado nos gêneros *Ossancora* e *Amblydoras*, teve como maior contribuição demonstrar que a família Doradidae possui grande variabilidade cromossômica, com diferentes números diplóides, padrões heterocromáticos, padrões de DNAr 18S e 5S e cromossomos supranumerários. Tal diversidade, ainda que subestimada, possibilitou inferir sobre os possíveis mecanismos evolutivos que atuaram durante a diversificação cariotípica desse importante grupo de peixes endêmico do continente sul-americano.

**Palavras-chave:** Diversidade cariotípica. Rearranjos cromossômicos. Evolução. Cromossomos supranumerários. DNA repetitivo. Elementos Transponíveis.



TAKAGUI, Fábio Hiroshi. “**Estudo da diversidade e evolução cromossômica de Doradidae (Siluriformes)**”. 2015. 129 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

### ABSTRACT

Fish of the family Doradidae occur in the inland waters of South America, where they perform different ecological functions, acting as seed dispersers and as biological controllers. This family also holds an important economic role and some species are appreciated in the sportfishing and aquariophily market. The first karyotypic studies in Doradidae were developed more than two decades ago. Since then, the knowledge generated about their chromosomal organization is scarce. Thus, these fish started to be seen as a group whose karyotypic evolution is conservative with most species carrying 58 chromosomes and single terminal NORs. In this scenario full of gaps and in the face of an underestimated diversity, this study investigated the chromosomal structure and variability in nine species of Doradids from the Amazon and Platino basin. This information enabled the reconstruction of some of some steps of their karyo-evolutive history as well as assist in the solution of phylogenetic questions that remain conflicting even after morphological and molecular analyses. An accentuated karyotype variability was found in the number of chromosomes: ( $2n=46$  in *Amblydoras affinis*;  $2n=56$  in *Anadoras wedelli* and *Trachydoras paraguayensis*;  $2n=58$  in *Agamyxis pectinifrons*, *Ossancora asterophysa*, *Rhinodoras dorbignyi*, *Pterodoras granulosus* and *Platydoras armatulus*;  $2n=60$  in *Amblydoras affinis* up to  $2n=66$  chromosomes in *Ossancora punctata*). This variation, hitherto never reported in this family, highlighted the contribution of different structural chromosomal rearrangements (pericentric inversions, translocations and Robertsonian centric fissions). Besides this macrostructural variability, the occurrence of supernumerary chromosomes in the species *Ossancora punctata*, *Platydoras armatulus* and *Pterodoras granulosus* was described for the first time. Such B microchromosomes exhibited morphological characteristics, frequency, number and particular meiotic behavior in each of these species. However, they apparently evolved as a consequence of events involving chromosomes of the standard complement. Thus, the origin of the microchromosomes in *Ossancora punctata* was suggested as a result of the centric fissions responsible for the increase in the diploid number from 58 to 66 chromosomes. Contrastingly, the saltatory activity of the transposable elements involved in the origin of a system of multiple NORs in some specimens of *P. armatulus* of the Miranda River seems to have contributed to the formation and maintenance of this numerical polymorphism in this population. Concerning *P. granulosus*, the B chromosome observed may have originated from a deletion in an interstitial region close to the centromere of a given chromosome of the standard complement. This fragment, initially devoid of telomeres and euchromatic, underwent a heterochromatinization process and was maintained in this population for presenting centromeric sequences that enabled its normal meiotic segregation. The findings from this study were relevant to understanding conflicting phylogenetic issues, as observed in the genera *Ossancora* and *Amblydoras*. Nonetheless, the greatest contribution of this work consisted in showing that the Doradidae family possesses large chromosomal variability with different diploid numbers, heterochromatic patterns, 18S and 5S rDNA patterns and supernumerary chromosomes. Although underestimated, such diversity enabled researchers to infer about the possible evolutionary mechanisms that acted during the karyotype diversification of this important endemic fish group in the South American continent.

**Keywords:** Karyotypic diversity. Chromosomal rearrangements. Evolution. Supernumerary chromosomes. Repetitive DNA. Transposable elements.



## 1 INTRODUÇÃO

Diversas razões justificam a utilização dos peixes como modelos para estudos genéticos, cariotípicos e evolutivos. Dentre os vertebrados, eles são a classe com maior riqueza de espécies, ocupam uma posição basal na filogenia e, ao contrário dos demais vertebrados, eles são organismos cuja dispersão é restrita aos ecossistemas aquáticos (NELSON 2006). Essas características facilitam o estudo de aspectos biogeográficos e mecanismos evolutivos (fluxo gênico, deriva genética, seleção natural) que atuam conjuntamente promovendo variabilidade cariotípica.

Nos últimos anos, ocorreu um grande desenvolvimento na citogenética de peixes, impulsionado principalmente pela introdução de novas técnicas de preparação e de bandamentos cromossômicos (ARTONI et al. 2000). Essa revolução, além de estar intimamente relacionada com a incorporação de diversas técnicas de biologia molecular, também é consequência do avanço tecnológico por meio da criação de equipamentos sofisticados e resolutivos, para realizar análises citogenéticas mais detalhadas e consistentes. Desde então, é cada vez maior o conhecimento da variabilidade cariotípica dos peixes neotropicais. Tais estudos superam uma fase de simples identificação do número e morfologia cromossômica e passam para uma abordagem mais aprofundada que visa investigar a organização microestrutural dos cromossomos.

De acordo com os levantamentos ictiofaunísticos mais recentes, a região Neotropical abriga 6.025 espécies de peixes (REIS et al. 2003; FERRARIS 2007) dentre as quais 1.149 já foram cariotipadas (OLIVEIRA et al. 2009). A ordem Siluriformes é um dos grupos neotropicais mais estudados do ponto de vista cromossômico, sendo que até o momento cerca de 318 espécies possuem seus cariótipos determinados (ARAI 2011). Entretanto se compararmos a quantidade desses estudos com a biodiversidade dessa ordem



percebe-se que alguns grupos ainda são pouco compreendidos, como é o caso da Família Doradidae que compreende peixes endêmicos da América do Sul, popularmente conhecidos como armaus, abotoados, cuiú-cuiús entre outros (Ferraris 2007). Nas últimas décadas, essa família passou por revisões filogenéticas fundamentadas em caracteres morfológicos (HIGUCHI 1992; SOUSA 2010; BIRINDELLI 2014) e moleculares (MOYER et al. 2004; ARCE et al. 2013).

Todas essas filogenias confirmam o caráter monofilético da família Doradidae, permanecendo apenas algumas divergências, quanto ao agrupamento, posicionamento e monofiletismo de determinados gêneros. Essas questões conflitantes poderiam ser melhor compreendidas, analisando as características cromossômicas dos doradídeos. Contudo, apesar de ser um grupo constituído por 93 espécies amplamente distribuídas pelo continente sul-americano, existem estudos citogenéticos para apenas 18 espécies, sendo que a maioria deles limita-se a descrição do número diplóide, determinação do padrão de RONS e análise quantitativa e posicional da heterocromatina. Desse modo, muito pouco se conhece a respeito da localização de genes ribossômicos e menos ainda sobre a composição dos DNAs repetitivos que constituem as regiões heterocromáticas (FENOCCHIO et al. 1993; VENERE 1998; GARCIA 2005; ELER et al. 2007; MILHOMEM et al. 2008).

De acordo com FUNK e OMLAND (2003), a melhor forma de compreender os mecanismos responsáveis pela diferenciação e evolução dos animais é realizando uma análise que aborde tanto aspectos citogenéticos e moleculares, quanto características morfológicas e ecológicas. Os doradídeos acumulam uma boa quantidade de informações sobre a ecologia trófica, estratégias de reprodução, comportamento, morfologia e composição nucleotídica. Entretanto, ainda é extremamente incipiente o conhecimento a respeito da organização e variabilidade citogenética dessa família, o que justificou a realização desse estudo. Além de ampliar o número de espécies cariotipadas, os dados obtidos também produziram informações úteis para a compreensão de aspectos filogenéticos, biogeográficos e evolutivos.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos biológicos, taxonômicos e biogeográficos da família Doradidae

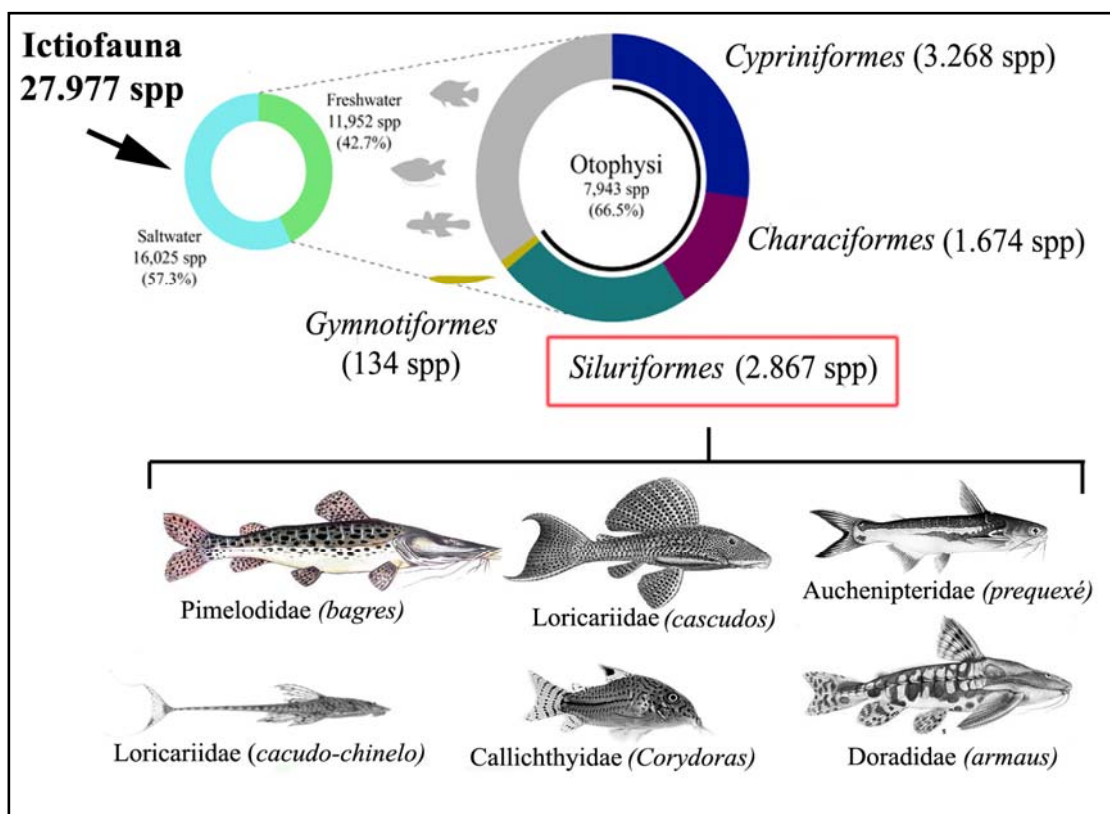
Dentre os vertebrados, os peixes são o grupo mais diversificado, totalizando aproximadamente 28.000 espécies cosmopolitas, que podem ser encontradas nos diferentes tipos de habitats aquáticos, sejam eles dulcícolas estuarinos ou oceânicos (NAKATANI et al. 2011). A região Neotropical que corresponde a uma vasta área zoogeográfica, situa-se desde o sul do México até o norte da Argentina, abrigando grande parcela desta diversidade ictiofaunística. Nos ecossistemas dulcícolas, estima-se existir em torno de 6.000 a 8.000 espécies de peixes (REIS et al. 2003; FERRARIS 2007; REID 2013).

Os peixes que vivem exclusivamente em águas continentais são um agrupamento polifilético, e dentre as linhagens que estão inseridas nessa classe, o clado Otophysi (formado pelas ordens Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes) (**Fig.1**) se destaca devido a sua ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os continentes com exceção da Antártida. Nesse grupo, estão incluídas aproximadamente 75% das espécies dulcícolas atuais e seu monofiletismo é apoiado principalmente pela presença do aparato de Weber, um complexo sistema formado a partir de modificações nas primeiras vértebras occipitais que permite a transmissão de vibrações da bexiga natatória para o ouvido interno (NAKATANI et al. 2011).

De acordo com Kavalco e Pazza (2007), a ictiofauna dulcícola neotropical tem como grupos predominantes os Siluriformes (bagres e cascudos) Characiformes (lambaris, dourados, piavas), Perciformes (acarás) e Gymnotiformes (tuviras e poraquê). Siluriformes é a ordem mais diversificada com 1650 espécies divididas entre 15 famílias (REIS et al. 2003).



Esses peixes apresentam uma grande variedade de formas, com inúmeras adaptações anatômicas, fisiológicas e comportamentais. Todas essas características justificam sua biodiversidade, visto que possibilitaram a ocupação dos diferentes ecossistemas onde são ecologicamente muito importantes (FERRARIS 2007).



**FIGURA 1 – Diversidade ictiofaunística dos Otophysi:** em destaque alguns representantes neotropicais da ordem Siluriformes. **Fonte:** Nakatani et al. (2011) com modificações.

Algumas famílias da ordem Siluriformes são endêmicas da América do Sul, como é o caso de Doradidae que compreende peixes distribuídos principalmente nas bacias hidrográficas dos rios Amazonas, Paraguai e Paraná. No Brasil, os doradídeos são popularmente conhecidos como armaos, abotoados, rique-rique, cuiú-cuiús, bacus, rebecas, bagre-capeta, entre outros. Essas denominações variam regionalmente e estão relacionadas com alguma particularidade morfológica, como a linha lateral ossificada ou com a capacidade de produzir sons por meio da vibração da bexiga natatória com um complexo sistema de ossos



e cartilagens denominado aparelho de Miller (REIS et al. 2003; FERRARIS 2007; BIRINDELLI 2014).

Morfológicamente, 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 retrórsos (HIGUCHI 1992; BIRINDELLI 2014) (**Fig. 2**).



**FIGURA 2** – Exemplo de *Platydoras armatulus*, em destaque as principais características morfológicas da Família Doradidae. **Fonte:** <http://wikipeixes.com.br> acesso em: 14/07/2014.

Nesse grupo, existe uma considerável variação no tamanho corporal. Os gêneros *Physopyxis*, *Agamyxis*, *Acanthodoras*, *Amblydoras* e *Platydoras*, por exemplo, compreendem espécies de pequeno e médio porte que são muito apreciadas no mercado aquarofílica, principalmente em função do padrão de coloração (SABAJ 2002). Já outras espécies podem atingir tamanhos consideráveis, sendo apreciadas do ponto de vista comercial, como é o caso de *Pterodoras granulosus*, *Lithodoras dorsalis*, *Megalodoras uranoscopus* e *Oxydoras niger*, sendo que este último peixe é o maior doradídeo da América do Sul atingindo até 120 centímetros (GOLDING 1980; DA LUZ et al. 2002).



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 (FUGI et al. 1996; SABAJ e 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 e 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 e 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 wedelli*, *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 trans-andinas, cuja origem tem relação direta com os processos geomorfológicos responsáveis pela elevação do norte da Cordilheira dos Andes.

## 2.2 Estudos Filogenéticos em Doradidae.

Durante muito tempo, o conhecimento a respeito da taxonomia e sistemática da família Doradidae permaneceu pouco explorado. O primeiro estudo filogenético baseado em marcadores morfológicos foi realizado por Higuchi (1992), onde foi confirmado o monofiletismo da família, sendo reconhecidas três subfamílias além dos grupos basais *Wherteimeria* e *Franciscodoras*. Mais tarde, Birindelli (2006), realizou uma análise filogenética com ênfase nas relações entre espécies da subfamília Doradinae, mas também incluindo outros grupos de Doradidae. Os resultados obtidos nesse estudo diferem em muitos aspectos daqueles sugeridos por Higuchi (1992), principalmente no tocante à posição



relativamente basal de *Kalyptodoras* e por considerar que as subfamílias Astrodoradinae e Doradinae são grupos irmãos e não clados politômicos como sugerido anteriormente.

Souza (2010), também sugeriu hipóteses de relacionamento para as espécies da subfamília Astrodoradinae por meio de uma análise cladística baseada em 101 caracteres incluindo 28 táxons. Nesse estudo o autor confirmou o monofiletismo dessa subfamília sendo este sustentado por sete sinapomorfias não exclusivas. Adicionalmente, uma revisão foi realizada reconhecendo 21 espécies distribuídas em sete gêneros: *Anadoras*, *Acanthodoras*, *Agamyxis*, *Amblyodoras*, *Scorpiodoras*, *Hypodoras* e *Astroadoras*. Os gêneros *Merodoras* e *Physopyxis* foram considerados sinônimos de *Amblyodoras*.

Birindelli (2014) realizou a análise filogenética mais atual e abrangente de Doradidae, sendo que de acordo com esse autor, atualmente a família é constituída por 93 espécies e 32 gêneros distribuídos em três subfamílias: **Wertheimerinae** (*Wertheimeria* e *Kalyptodoras*); **Astrodoradinae** (*Amblyodoras*, *Anadoras*, *Astroadoras*, *Hypodoras*, *Merodoras*, *Physopyxis*, *Scorpiodoras*, *Agamyxis* e *Achantodoras*); **Doradinae** (*Platyodoras*, *Centrochir*, *Pterodoras*, *Lithodoras*, *Doraops*, *Megalodoras*, *Centrodoras*, *Rhyncodoras*, *Orinocodoras*, *Rhinodoras*, *Oxyodoras*, *Petalodoras*, *Trachydoras*, *Doras*, *Hemidoras*, *Nemadoras*, *Hassar*, *Anduzedoras*, *Leptodoras*, *Ossancora* e *Tenellus*) (**Fig. 3**).

Segundo essa hipótese filogenética, a família Doradidae é realmente um agrupamento monofilético que juntamente com seu grupo irmão, Auchenipteridae, constitui um clado denominado Doradoidea. Análises morfológicas evidenciam um estreito relacionamento com a família Mockokidae, um grupo de peixes cuja distribuição geográfica é restrita aos rios do continente africano. Além dessa hipótese, nesse estudo foram incluídas as espécies dos gêneros *Ossancora* e *Tenellus* (recentemente descritas) e também foi confirmada



a hipótese de que o grupo basal dentre os Doradidae é a subfamília Wertheimerinae (*Wertheimeria* + *Kalyptodoras*) sendo os gêneros: *Hassar*, *Anduzedoras* e *Leptodoras* os que ocupam as posições mais derivadas nessa filogenia.

Até o momento, apenas três estudos filogenéticos baseados em marcadores moleculares foram realizados para investigar o relacionamento entre os diferentes táxons da família Doradidae. Moyer et al. (2004) construíram uma árvore filogenética considerando a variação das sequências completas (2.5 kilobases) dos genes mitocondriais codificadores de RNA ribossômico 12S e 16S e também do gene nuclear *Elongation factor 1 alpha gene* (sequência parcial: 1.3 kilobases). Essa análise, que inclui 43 espécies, representando 23 gêneros, revelou algumas hipóteses de relacionamento conflitantes quando comparada às análises filogenéticas baseadas em caracteres morfológicos (HIGUCHI 1992; BIRINDELLI 2014).

Arce et al. (2013) também propuseram uma filogenia molecular para compreender as relações entre os doradídeos (**Fig. 4**). Nessa análise foram incluídos todos os gêneros da família Doradidae representados por 86 espécies, além de outras espécies das famílias Auchenipteridae e Aspredinidae que foram utilizadas como grupo externo. A metodologia aplicada foi baseada na caracterização e comparação de sequências do gene de RNAr 16S e também da subunidade 1 da Citocromo Oxidase C, (COI) ambos oriundos do genoma mitocondrial. Apenas um gene nuclear foi utilizado nessa análise, trata-se do RAG 1 (*Recombination activating gene 1*).

As análises moleculares de Arce et al., (2013), corroboram a hipótese de Sullivan et al. (2006), onde o clado Doradóidea (Doradidae + Auchenipteridae) compartilha um conjunto maior de similaridades com membros da família Aspredinidae (cascudos-banjos), sendo portanto esse o seu grupo irmão. 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*). Tanto a filogenia molecular proposta por Moyer et al. (2004), quanto a que foi elaborada por Arce et al. (2013), corroboram o monofiletismo da Família Doradidae. A diferença entre essas duas filogenias, é que os resultados obtidos por Arce et al. (2013) são mais consistentes, visto que foram analisadas um número de espécies significativamente maior. Além do mais, ainda nesse mesmo estudo, os autores sugeriram algumas inferências biogeográficas para explicar ou justificar as hipóteses de relacionamento entre alguns táxons.

Entretanto, algumas hipóteses de relacionamento intergenéricas e também interespecíficas permanecem contrastantes quando comparadas com os resultados obtidos por meio das filogenias morfológicas. Algumas delas merecem destaque, como é o caso da indefinição quanto ao clado mais basal de Doradidae (Wertheimerinae ou Astrodoradinae), o não monofiletismo do gênero *Ossancora*, a sinonimização de *Amblyodoras* e *Merodoras*, assim como de *Opsodoras* e *Hemidoras*. Enfim muitas outras questões, além destas, ainda permanecem sem uma resposta adequada mesmo após caracterizações moleculares e morfológicas. Dessa forma uma boa alternativa para buscar o esclarecimento desses problemas taxonômicos seria a utilização de marcadores citogenéticos.

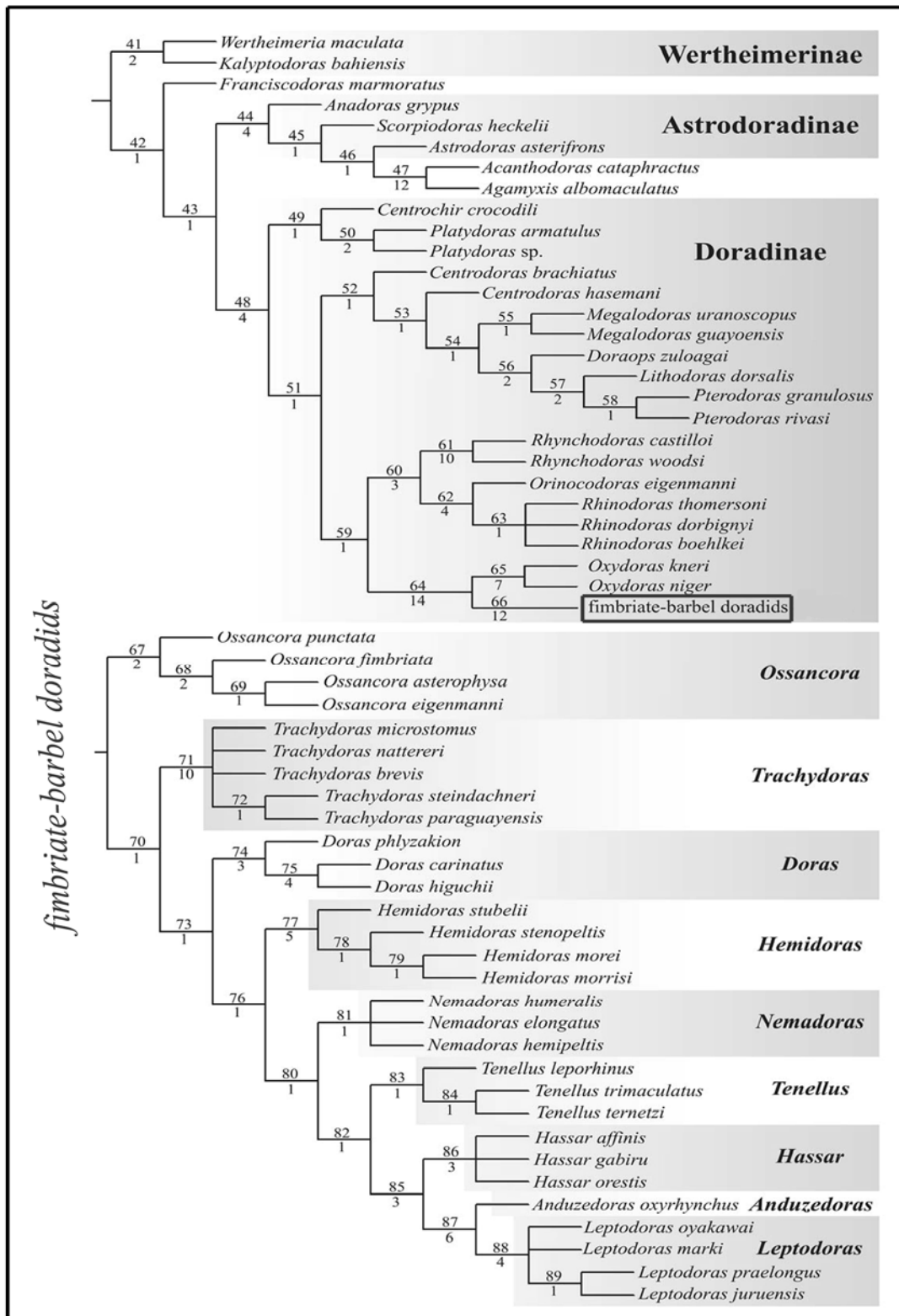


FIGURA 3 – Hipótese de relações filogenéticas da família Doradidae baseada em caracteres morfológicos. Fonte: Birindelli (2014).

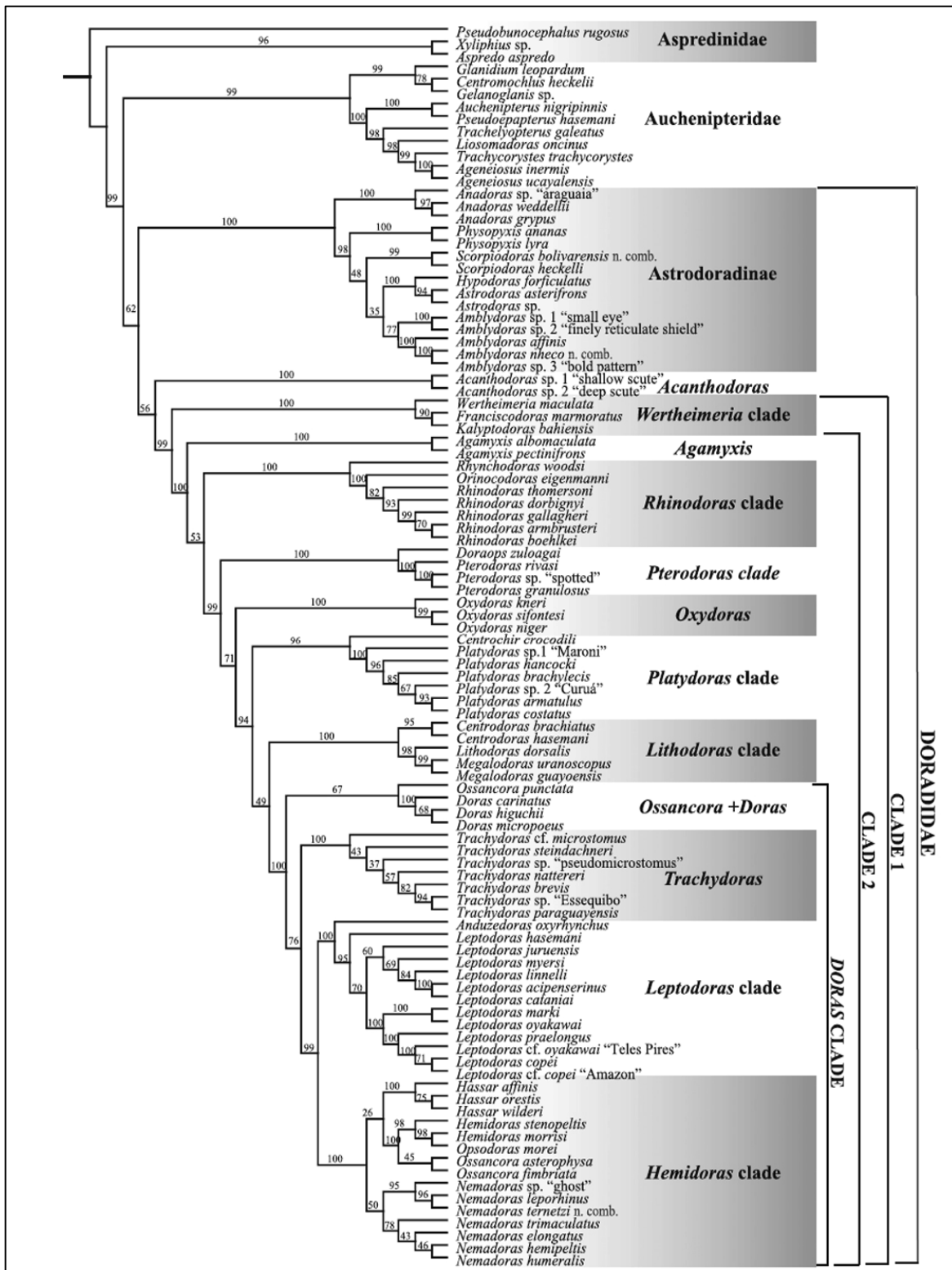


FIGURA 4 – Hipótese de relações filogenéticas da família Doradidae baseada em caracteres moleculares (genes: rag1,16S e COI) para família Doradidae. Fonte: Arce et al. (2013).



### 2.3 Características Citogenéticas da família Doradidae.

Dentre as 362 espécies de Siluriformes já cariotipadas, apenas 13 pertencem à família Doradidae (MILHOMEN 2008), que possui um total de 93 espécies válidas (BIRINDELLI 2014). As informações disponíveis demonstram uma macroestrutura cariotípica bastante conservada sendo detectada apenas uma pequena variação no número diplóide de  $2n=56$  em *Trachydoras paraguayensis* e  $2n=58$  cromossomos em *Wertheimeria maculata*, *Kalyptodoras bahiensis*, *Franciscodoras marmoratus*, *Hassar orestis*, *Hassar wilderi*, *Leptodoras cataniae*, *Tenellus ternetzi*, *Platydoras costatus*, *Oxydoras niger* e *Rhinodoras dorbignyi* (FENOCCHIO et al. 1993; VENERE 1998; GARCIA 2005; ELER et al. 2007; MILHOMEM et al. 2008; PAIXÃO 2010; PAIVA 2012).

As análises das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) por meio da impregnação por nitrato de prata evidenciaram em todas as espécies apenas um par portador de RONs. Entretanto existe uma variação em relação à posição dessas regiões, de modo que em *Trachydoras paraguayensis* e *Hassar gabiru* foram observadas RONs intersticiais e nas demais espécies, esses sítios foram detectados terminalmente no braço curto (*Platydoras costatus*, *Hassar orestis*, *Tenellus ternetzi*,) ou no braço longo (*Hassar wilderi*, *Leptodoras cataniae*, *Oxydoras niger*, *Wertheimeria maculata*, entre outros) (FENOCCHIO et al. 1993; VENERE 1998; GARCIA 2005; ELER et al. 2007; MILHOMEM et al. 2008; PAIXÃO 2010; PAIVA 2012).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S foi realizada somente em exemplares de *Franciscodoras marmoratus*, coletados no rio São Francisco. Nessa espécie, a FISH com sondas de DNAr 18S, confirmou o padrão de RONs simples, anteriormente observado por meio da impregnação pelo nitrato de prata, sendo que



os cístrons ribossomais foram localizados terminalmente no braço curto de dois cromossomos subtelocêntricos correspondentes ao par 23. Quanto à localização dos genes codificadores de RNAr 5S, foi possível verificar a presença destes em posição pericentromérica de quatro cromossomos subtelocêntricos (GARCIA 2005).

As regiões heterocromáticas são os marcadores cromossômicos que apresentaram a maior variabilidade dentre todos aqueles utilizados para a caracterização citogenética dos doradídeos. As espécies da subfamília *Whertheimerinae* e *Franciscodoras marmoratus* possuem uma quantidade moderada de heterocromatina, sendo essa localizada principalmente em regiões pericentroméricas, terminais no braço curto, associada às RONS e em menor quantidade sob a forma de blocos intersticiais (GARCIA 2005; ELER et al. 2007; PAIXÃO 2010).

Já na subfamília *Doradinae*, esse padrão de bandamento C foi relatado somente em *Platydoras costatus* (MILHOMEM et al. 2008), sendo que existe nesse grupo outros dois padrões facilmente discriminados pela quantidade e localização dos blocos heterocromáticos. O primeiro deles tem sido relatado para espécies de grande porte, como é o caso de *Pterodoras granulatus* (PAIVA 2012) e *Rhinodoras dorbignyi* (FENOCCHIO et al. 1993), onde pouca heterocromatina foi observada em regiões pericentroméricas e nas RONS. As demais espécies dessa subfamília exibem uma quantidade maior de heterocromatina, sendo esta localizada principalmente em blocos terminais no braço curto, regiões pericentroméricas e associadas às RONS. Esse arranjo heterocromático já foi observado nas espécies *Hassar orestis*, *Hassar wilderi*, *Hassar gabiru*, *Tenellus ternetzi* entre outras (FENOCCHIO et al. 1993; ELER et al. 2007; MILHOMEM et al. 2008).

Basicamente todas as informações citogenéticas disponíveis para a família *Doradidae* estão restritas à determinação do número diplóide, fórmulas cariotípicas e



bandamentos cromossômicos convencionais (impregnação por nitrato de prata e bandamento C). Assim faz-se necessário a realização de técnicas mais sofisticadas como é o caso da Hibridização fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S e 5S, ou até mesmo com outros tipos de sondas como as teloméricas , histônicas ou qualquer outra classe de DNA repetitivos (microsatélites, minissatélites, transposons entre outros). Por meio da associação de todos esses dados será possível estimar a variabilidade citogenética que os doradídeos possuem e quais suas relações com os processos evolutivos que tornaram esses peixes um grupo tão diversificado.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

No presente estudo, técnicas de citogenética clássica e molecular foram aplicadas para determinar a estrutura cromossômica de nove espécies da família Doradidae. Com intuito de determinar se existe variabilidade citogenética e quais seriam os mecanismos evolutivos que atuaram durante a diversificação cariotípica desse importante grupo de peixes endêmico da América do Sul.

#### 3.2. ESPECÍFICOS:

1. Determinar o número diplóide, fórmula cariotípica, padrão de distribuição das regiões heterocromáticas e a localização dos sítios de DNAr 18S e 5S nas espécies: *Anadoras wedelli*; *Amblydoras affinis*, *Trachydoras paraguayensis*, *Rhinodoras dorbignyi*, *Agamyxis pectinifrons*, *Ossancora punctata*, *Ossancora asterophysa*, *Pterodoras granulosus* e *Platydoras armatulus*. Com base nesses dados, será possível estimar a variabilidade dessa família e também confirmar se esse é realmente um grupo de peixes que segue uma dinâmica carioevolutiva conservativa, como a maioria dos autores tem sugerido;
2. Estimar e propor hipóteses sobre a origem da diversidade citogenética de *Pterodoras granulosus* e *Platydoras armatulus*, analisando comparativamente diferentes populações dessas espécies coletadas nos rios Amazonas, Paraguai e Paraná;



3. Integrar os dados citogenéticos, obtidos no presente estudo com os da literatura relacionados á filogenia morfológica e molecular, visando identificar padrões de relacionamento que possibilitem reconstituir alguns eventos históricos que atuaram na diversificação cromossômica dos doradídeos.
  
4. Auxiliar na compreensão de questões filogenéticas que mesmo após análises baseadas em características morfológicas e moleculares permanecem conflitantes, como é o caso dos gêneros *Ossancora* e *Amblydoras*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Espécies analisadas e Locais de Coleta.

Foram analisadas por meio de diferentes técnicas de citogenética clássica e molecular nove espécies da família Doradidae, provenientes de diferentes sistemas hidrográficos da América do Sul (**Tabela 1**). As espécies: *Platydoras armatulus*, *Anadoras wedelli*, *Pterodoras granulosus*, *Rhinodoras dorbignyi* e *Ossancora punctata* foram coletadas no rio Miranda, um importante afluente do rio Paraguai, situado no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul (**Fig. 5 e Fig.6**).

Alguns doradídeos também foram coletados na calha principal do rio Paraná que juntamente com os rios Uruguai e Paraguai são os maiores formadores da bacia Platina. As espécies dessa bacia são as mais estudadas do ponto de vista cromossômico, de modo que no presente estudo foram analisadas somente exemplares de *Pterodoras granulosus* coletados num trecho do Alto rio Paraná, situado entre os municípios de Paulicéia e Bataguassu, e



*Platydoras armatulus* provenientes de Pousadas, Província de Misiones – Argentina que pertence ao Baixo rio Paraná (**Fig. 5 e Fig.6**).

Na bacia Amazônica foram coletadas apenas duas espécies: *Pterodoras granulosus* e *Ossancora asterophysa* ambas provenientes do lago Catalão, uma área típica de várzea situada nas proximidades de Manaus, na zona de confluência entre o rio Negro e Solimões (**Fig. 5 e Fig.6**). Segundo Leite et al. (2006), este lago acomoda uma ictiofauna muito diversificada, pois oferece abrigo, locais para alimentação, reprodução e desova. Todas essas características tem relação direta com a dinâmica fluviométrica tanto do rio Negro, ao qual é conectado quase que permanentemente, quanto do rio Solimões que estabelece contato somente nos primeiros meses de subida das águas.

A coleta do material biológico foi autorizada pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), seguindo a Licença N° 11399-1, utilizando tarrafas e rede de arrasto. Após o processamento do material e posterior fixação, todos os exemplares foram devidamente identificados pelo especialista em Doradídeos, Dr. José Birindelli e depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL).

## 4.2 Metodologia

### 4.2.1 Técnicas utilizadas para obtenção de cromossomos

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). Esse procedimento de estimulação mitótica foi realizado 24 horas antes do sacrifício dos exemplares. Feito isso, os cromossomos metafásicos foram obtidos utilizando-se o protocolo



descrito 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 que são 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 ótico 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).

Os cromossomos meióticos também foram analisados no presente estudo e sua obtenção ocorreu a partir de células testiculares segundo Kligerman e Bloom (1977). Nesse procedimento uma parte do testículo é dissecada e passa por alguns tratamentos utilizados no método direto como a hipotonização em KCl à 37 °C por 30 minutos e fixação em Carnoy, sendo que a colchicina não foi aplicada visando observar um número maior de fases, principalmente aquelas que ocorrem após a metáfase I.



#### 4.2.2 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)<sub>2</sub> 5% 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). **Impregnação pelo nitrato de prata** (HOWELL e 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 diferenciada, o que possibilita identifica-las nos cromossomos metafásicos.

**Coloração com fluorocromos base-específicos**: seguindo a metodologia descrita por Schweizer (1980) e utilizando o fluoróforo Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) para identificar regiões ricas em bases guanina (G) e citosina (C) e o 4'-6-diamino-2-fenilindole (DAPI) para destacar as regiões cromossômicas ricas em bases adenina (A) e timina (T) em células meióticas.

#### 4.2.3 Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) para o mapeamento físico de sequências codificadoras das subunidades ribossômicas. Para isso duas sondas foram utilizadas: **DNAr 18S** obtida de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI Jr. 2004) e marcada com biotina-14-dATP por *Nick translation* e **DNAr 5S** que foi obtida por meio da reação de C0t-1 a partir do genoma do

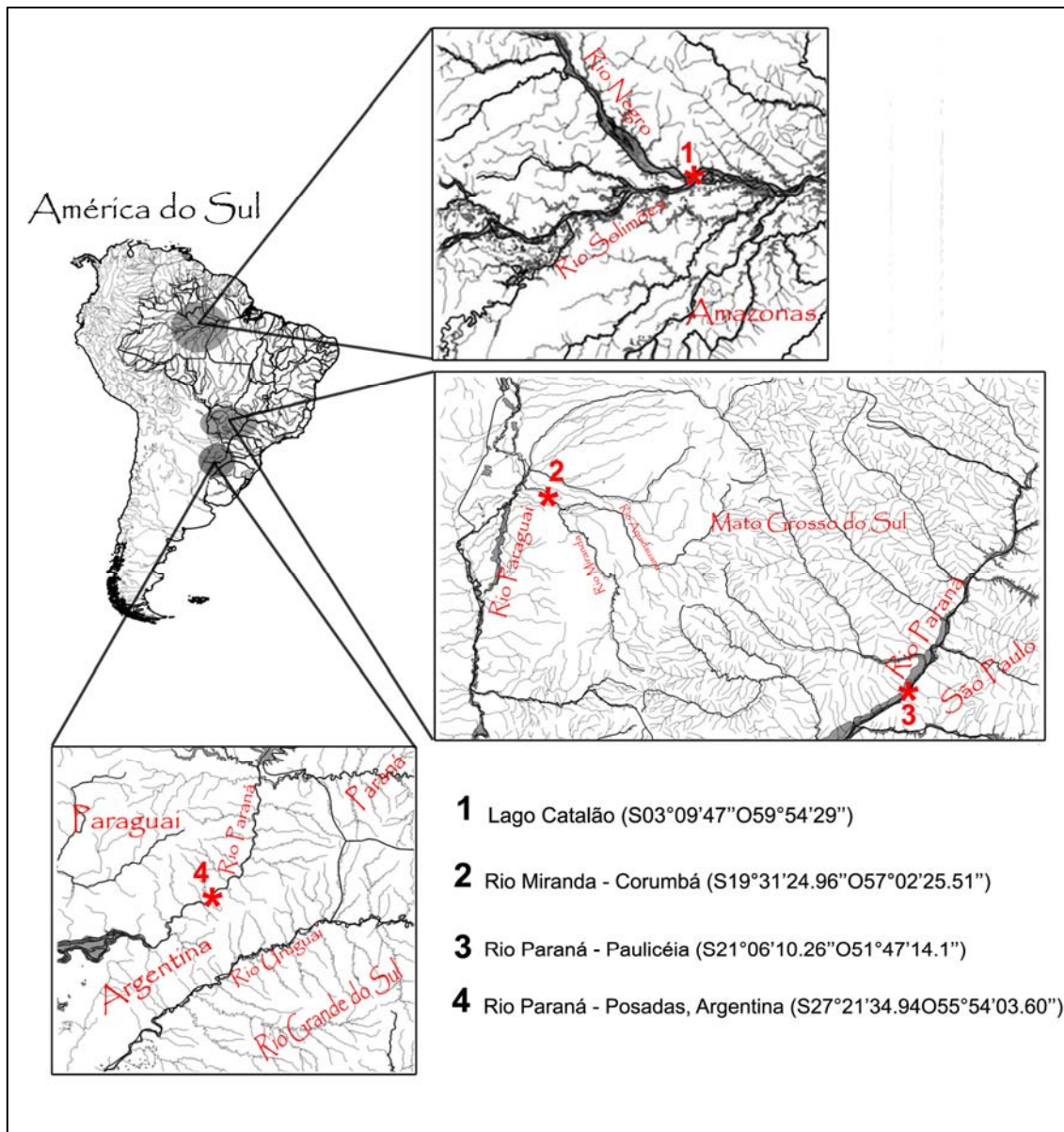


bagre heptapterídeo *Imparfinnis schubarti* (GOUVEIA et al. 2015 em preparação) e marcada com digoxigenina por reação em cadeia de polimerase (PCR).

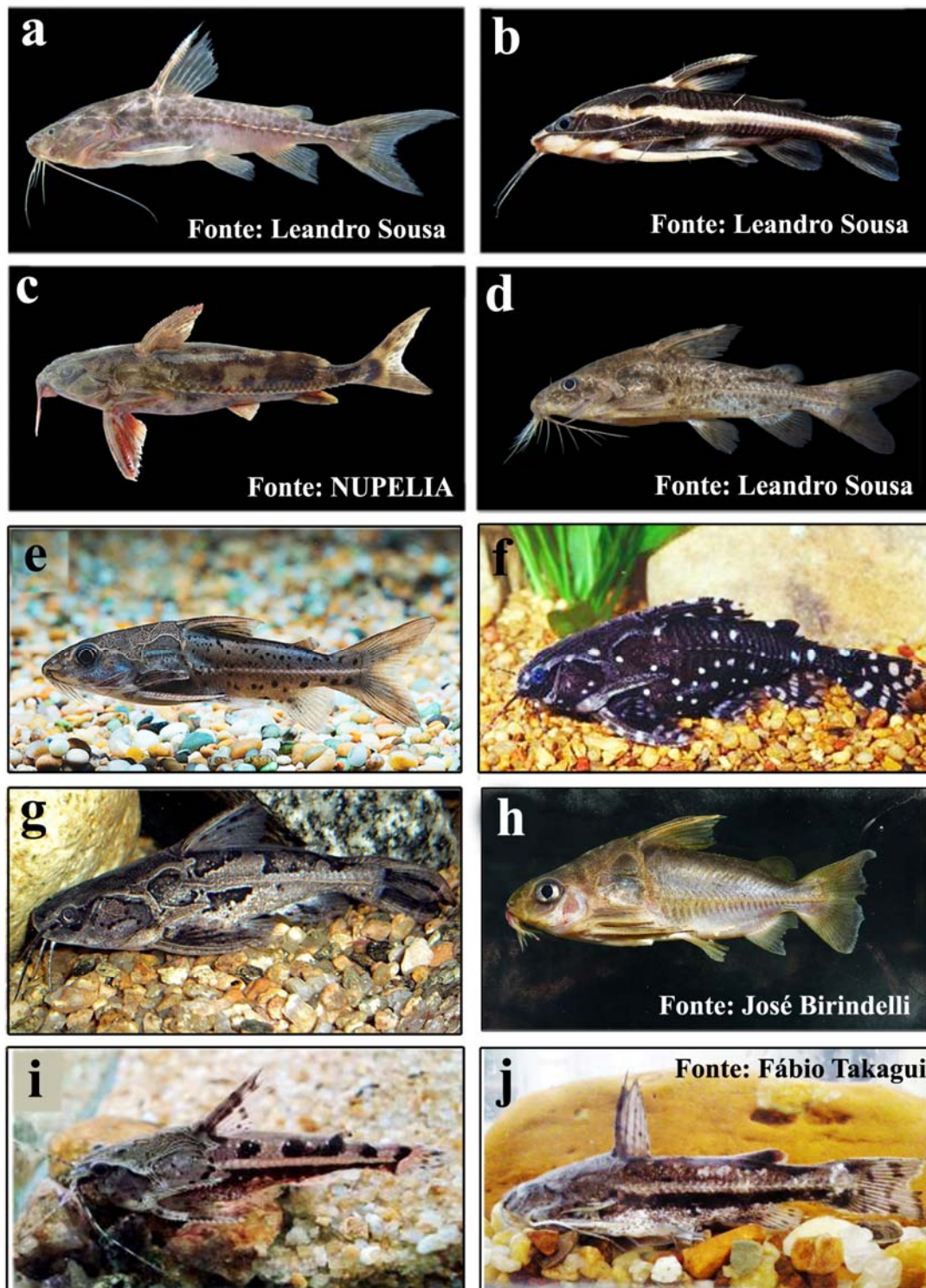


**TABELA 1** – Espécies analisadas no presente estudo e seus respectivos locais de coleta. **NI**= sexo não identificado; ♂= macho; ♀= fêmea.

ESPÉCIES	LOCAIS DE COLETA	Nº EXEMPLARES			
		♂	♀	NI	TOTAL
<i>Pterodoras granulosus</i>	Rio Paraná – Paulicéia, São Paulo.	4	8	2	<b>14</b>
	Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.	1	3	3	<b>7</b>
	Lago Catalão – Manaus, Amazonas.		2	3	<b>5</b>
<i>Agamyxis pectinifrons</i>	Loja de Aquários – Londrina, Paraná	1	1		<b>2</b>
<i>Ossancora punctata</i>	Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.	6	3	-	<b>7</b>
	Rio Paraná – Paulicéia, São Paulo.			2	<b>2</b>
<i>Ossancora asterophysa</i>	Lago Catalão – Manaus, Amazonas.			9	<b>9</b>
<i>Platydoras armatulus</i>	Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul	6	8	2	<b>16</b>
	Rio Paraná – Posadas, Argentina			4	<b>4</b>
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.	1	1		<b>2</b>
<i>Anadoras wedelli</i>	Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.	2	3	12	<b>17</b>
<i>Amblydoras affinis</i>	Loja de Aquários – Londrina, Paraná	1	3	3	<b>7</b>
<i>Trachydoras paraguayensis</i>	Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.			2	<b>2</b>



**FIGURA 5** – Mapa evidenciando os locais e suas respectivas coordenadas geográficas onde foram coletadas todas as espécies da Família Doradidae analisadas nesse estudo. **Fonte:** Fábio Hiroshi Takagui.



**FIGURA 6** – Espécies da Família Doradidae analisadas no presente estudo: **a)** *Pterodoras granulosus*; **b)** *Platydoras armatulus*; **c)** *Rhinodoras dorbignyi*; **d)** *Ossancora asterophysa*; **e)** *Ossancora punctata*; **f)** *Agamyxis pectinifrons*; **g)** *Anadoras wedelli*; **h)** *Trachydoras paraguayensis* **i)** *Amblydoras affinis*; **j)** *Amblydoras affinis*.



## Referências Bibliográficas

AGOSTINHO A.A.; GOMES L.C; SUZUKI H.I. e JÚLIO Jr H. F. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brasil. Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status. **IDRC and World Bank**. 372p. 2003.

AGOSTINHO C.S.; MARQUES E.E.; OLIVEIRA R.J. e BRAZ P.S. Feeding ecology of *Pterodoras granulosus* (Siluriformes, Doradidae) in the Lajeado Reservoir, Tocantins, Brazil. **Inheringia, Série Zoologia**. 99 (3): 301-306. 2009.

ARAI R. Fish Karyotypes: A Check List. **Springer**. 1: 1-325. 2011.

ARCE M.H; REIS E.R; GENEVA A.J.; SABAJ P.H.M. Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes:Doradidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 67:560-577.2013.

ARTONI R.F.; VICARI M.R. e BERTOLLO L.A.C. Neotropical fish cytogenetics: methods, results and perspectives. **Biological and Health Science**. 6 (1): 43-60. 2000.

BARBOSA T.A.P. Aspectos ecológicos do bacu-pedra *Lithodoras dorsalis* (Valenciennes,1840) (Siluriformes:Doradidae) na Foz Amazônica, Brasil. **Dissertação não publicada**. Universidade Federal do Pará. Belém. 73p. 2012.

BERTOLLO L.A.C.; TAKAHASHI C.S e MOREIRA-FILHO O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev. Brasil. Genet**. 1: 103-120. 1978.

BIRINDELLI J.L.O. Relações filogenéticas da superfamília Doradoidea (Ostariophysi, Siluriformes). **Tese não publicada**. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

BIRINDELLI J.L.O e SABAJ M.H.P. *Ossancora*, new genus of thorny catfish (Teleostei:Siluriformes:Doradidae) with description of one new species. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**. 161:117-152. 2011.



BIRINDELLI J.L.O. Phylogenetic relationships of the South American Doradoidea (Ostariophysi: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**. 12(3): 451-564. 2014.

BRITSKI H.A.; SILIMON K.Z.S.; LOPES B.S. Peixes do Pantanal: **Manual de Identificação 2a. edição**. Brasília: Embrapa. 1: 230. 2007.

BURGUESS W.E. An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A preliminary survey of the Siluriformes. **T.F.H. publications**. Neptune City. 784p. 1989.

CATANHÊDE G.; HAHN N.S.; GUBIANI E.A.; FUGI R. 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. 2008.

DA LUZ G.; FUGI R.; ABUJANRA F. e AGOSTINHO A.A. Alterations in the *Pterodoras granulosus* (Valenciennes, 1821) (Osteichthyes, Doradidae) diet due to the abundance variation of a bivalve invader species in the Itaipu Reservoir, Brazil. **Acta Scientiarum**. 24: 427–432. 2002.

ELER E.S.; DERGAM J.A.; VENERE P.C.; PAIVA L.C.; MIRANDA G.A. e OLIVEIRA A.A. 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. 2007.

FENOCCHIO A.S.; JORGE L.C.; VENERE P.C. e BERTOLLO L.A.C. Karyotypic characterization and nucleolous organizer regions in three species of Doradidae (Pisces, Siluriformes). **Revista Brasileira de Genetica**. 4:1097-1101. 1993.

FERRARIS C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalog primary types. **Zootaxa**. 1418p. 2007.

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

FUGI R.; HAHN N.S. e AGOSTINHO A.A. Feeding styles of five species of bottom-feeding



fishes of the High Parana River. **Environmental Biology of Fishes**. 46: 297–307.1996.

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

FUNK D.J. e OMLAND K.E. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with insights from Animal Mitochondrial DNA. **Annu Rev Ecol. Evol. Syst**. 34:397-423.2003.

GARCIA C. Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco. **Dissertação não publicada**. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos-SP. 2005.

GOLDING M. The fishes and the forest: explorations in Amazonian natural history. University of California Press, London. 280 p.1980.

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

HIGUCHI H. A phylogeny of the south American thorny catfishes (Osteichthyes; Siluriformes; Doradidae). **Tese não publicada**. Harvard University, Boston, 372p. 1992.

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

KAVALCO K.F. e PAZZA R. Aspectos Biogeográficos de componentes da Ictiofauna da América Central. **Conscientiae Saúde**. São Paulo, Brasil. 6:147-153. 2007.

KLIGERMAN A.D.; BLOOM S.E. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. **Journal of the Fisheries Research Board of Canadá**. 34: 266-269. 1977.

LEITE R.G.; SILVA J.V.V.; FREITAS C.E. Abundância e distribuição das larvas de peixes no Lago Catalão e no encontro dos rios Solimões e Negro, Amazonas, Brasil. **Acta**



**Amazonica**. 36: 4. 557-562. 2006.

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

MILHOMEM S.S.R.; SOUZA A.C.P.; NASCIMENTO A.L.; CARVALHO J.R.; FELDBERG E.; PIECZARKA J.C. e NAGAMICHI C.Y. 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. 2008.

MOYER G.R.; BURR B.M.; KRAJEWSKI C. Phylogenetic relationship of thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae) inferred from molecular and morphological data. **Zool J. Linnean Society**. 140: 551-575.2004.

NAKATANI M. Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeen origin and Mesozoic radiation. **BMC Evolutionary Biology**. 11:177.2011.

NELSON J.S. Fishes of the World. 4th ed. John Wiley e Sons, 601p. 2006.

OLIVEIRA C; FORESTI F. e HILSDORF A.W.S. Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**. 35: 81-100. 2009.

PAIVA L.R.S. Bandamento em cromossomos de peixes: Discussão sobre o conceito de compartimentalização cromossômica. **Tese não publicada**. Universidade Estadual Paulista (UNESP). 2012.

PAIXÃO A.E.M. Estudos genéticos em *Kalyptodoras bahiensis*, capturada na bacia do médio e baixo Paraguaçu-BA, através de marcadores citogenéticos e moleculares. **Monografia não publicada**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2010.

PEDRO J. Cytogenetics of chilean fishes: a commented database. **Byocyt**. 4(16): 316-326.2011.

PINKEL D.; STRAUME T. e GRAY J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**



the USA. 83: 2934-2938. 1986.

REID G.M. Introduction to Freshwater Fishes and Their Conservation. **Int. Zoo. Yb.** 47:1-5.2013.

REIS R.E.; KULLANDER S.O.; FERRARIS C.J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: **EDIPUCRS**.2003.

SABAJ M.H. Taxonomy of the neotropical thorny catfishes (Siluriformes:Doradidae) and revision of the genus *Leptodoras*. **Tese não publicada**. University of Illinois. Urbana-Champaign. 242 p.2002.

SABAJ M.H. e C.J. FERRARIS. 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.2003.

SABAJ M.H. Taxonomy assessment of *Leptodoras* (Siluriformes: Doradidae) with description of three new species. **Neotropical Ichthyology**. 3(4):637-678. 2005.

SOUSA L.M. Revisão Taxonômica e Filogenia de Astrodoradinae (Siluriformes, Doradidae). **Dissertação não publicada**. Universidade de São Paulo, São Paulo. 276 . 2010.

SCHWEIZER D.; LOIDL J. A model for heterocromatin dispersion and the evolution of C-banding patterns. **Chromosome Today**.9: 61-74.1978.

SULLIVAN J.P; LUNDBERG J.G; HARDMAN M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. **Molecular Phylogenetics Evolution**. 41(3): 636-642. 2006.

SUMNER A.M.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res**. 75: 304-306. 1972.

VENERE P.C. Diversificação cariotípica em peixes do médio rio Araguaia, com ênfase em Characiformes e Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi). **PhD. Thesis**. Universidade Federal



de São Carlos. São Carlos. 1998.

ZAWADZKI C.H.; PAVANELLI C.S. e FERREIRA Jr H. 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. 1996.

## Capítulo 1

“A evolução cromossômica da Família Doradidae (Siluriformes), interpretada a partir dos perfis citogenéticos de sete espécies da bacia Platina e Amazônica”.



Esse artigo será submetido á Revista **Reviews in Fish Biology and Fisheries**.

**“A evolução cromossômica da Família Doradidae (Siluriformes), interpretada a partir dos perfis citogenéticos de sete espécies da bacia Platina e Amazônica”.**

---

Fábio Hiroshi Takagui; José Olivan Birindelli; Ana Claudia Swarça; Ana Lucia Dias; Eliana Feldberg; Alberto Sergio Fenocchio & Lucia Giuliano-Caetano.

## Resumo

Os poucos estudos cariotípicos que existem sobre as espécies da família Doradidae, revelam uma baixa variabilidade, onde a maioria das espécies possuem  $2n= 58$  e RONS simples terminais. Perante esse cenário, repleto de lacunas e diante de uma diversidade subestimada, sete espécies de doradídeos amazônicos e da bacia Platina foram analisadas por meio de procedimentos de citogenética convencional e molecular, com intuito de estimar a real variabilidade e propor os possíveis mecanismos evolutivos relacionados com sua origem. A análise convencional revelou a ocorrência de diferentes números diplóides, que variou desde  $2n= 46$  em *Amblydoras affinis*,  $2n= 56$  em *Anadoras wedelli* e *Trachydoras paraguayensis*;  $2n=58$  em *Agamyxis pectinifrons*, *Ossancora asterophysa* e *Rhinodoras dorbignyi*,  $2n=60$  em *Amblydoras affinis* até  $2n=66$  cromossomos em *Ossancora punctata*. Variações microestruturais também foram observadas, sendo possível descrever quatro padrões de heterocromatina baseado na quantidade e localização de blocos heterocromáticos; distintos padrões de dispersão dos sítios de DNAr 18S e 5S, assim como cromossomos supranumerários em *O. punctata*. Adicionalmente, alguns marcadores citogenéticos foram importantes para auxiliar na compreensão de relações filogenéticas conflituosas no gênero *Ossancora* e também em *Amblydoras affinis*, que parece se tratar de mais um caso de espécies crípticas, necessitando então de uma revisão taxonômica. O presente estudo ampliou o conhecimento a respeito da organização cromossômica da família Doradidae, evidenciando que a participação de inversões pericêntricas, fissões e fusões cêntricas foram os rearranjos responsáveis pela origem de toda a variabilidade observada nesse grupo. Essa acentuada diversidade sugere que esses peixes diversificaram a partir de mecanismos evolutivos divergentes, contrariando, portanto, o modelo conservativo que a maioria dos autores acreditava ocorrer em Doradidae.

**Palavras-chave:** Variabilidade cariotípica; RONS; heterocromatina; cromossomos supranumerários; espécies crípticas.



## Introdução

A região neotropical abriga uma ictiofauna muito diversificada constituída por aproximadamente 8.000 espécies (Vari e Malabarba 1998). Muitas famílias da ordem Siluriformes são endêmicas dessa região, como é o caso de Doradidae que compreende peixes conhecidos como armaus, abotoados e cuiú-cuiús e englobam algumas espécies economicamente importantes tanto para a pesca esportiva ou de subsistência, como também para o mercado aquarofilista. Do ponto de vista ecológico, ocupam diferentes níveis na cadeia alimentar desempenhando um importante papel até mesmo no controle biológico de moluscos invasores e dispersão das sementes de algumas espécies vegetais (ictiocoria) (Reis et al. 2003; Ferraris et al. 2007; Catanhêde et al. 2007; Barbosa 2012).

Os doradídeos podem ser facilmente distinguidos dos demais Siluriformes pela combinação de três caracteres morfológicos: presença do escudo infranucal, formado a partir de um ligamento ossificado entre a placa nucal posterior e a costela da sexta vértebra; presença de um ligamento entre o ramo de Muller e os escudos timpânicos; e pela hipertrofia da ossificação dos túbulos da linha lateral formando uma fileira de escudos laterais cada qual contendo um ou mais espinhos retrorsos (Higuchi 1992; Sousa 2010; Birindelli 2014). As características morfológicas citadas anteriormente são consideradas sinapomorfias que suportam o monofiletismo de Doradidae dessa forma, a taxonomia dessa família é relativamente bem definida sendo que atualmente encontra-se dividida em três subfamílias: Wertheimerinae, Astrodoradinae e Doradinae, totalizando 32 gêneros e aproximadamente 93 espécies válidas (Birindelli 2014).

O conhecimento acerca da estrutura cariotípica de Doradidae ainda é muito incipiente, sendo que dentre as 93 espécies descritas, apenas 18 foram cariotipadas. Nessa família a maioria das espécies possuem 58 cromossomos e regiões organizadoras de nucléolos



(RONs) simples terminais, exceções á esse padrão são *T. paraguayensis* com  $2n=56$  que também apresentou RONs simples intersticiais assim como *Hassar gabiru* (**Tabela 1**). Essa escassez de informações citogenéticas, impulsionou a realização do presente estudo, que por meio de técnicas convencionais e moleculares objetiva caracterizar o cariótipo de sete espécies oriundas da bacia Amazônica e Platina. Tais informações serão essenciais para estimar a variabilidade cromossômica, auxiliar na resolução de questões filogenéticas conflituosas, assim como determinar os possíveis mecanismos que atuaram na diversificação cromossômica desses peixes.

## Material e Métodos

Procedimentos de citogenética convencional e molecular foram utilizados para caracterizar a estrutura cromossômica de sete espécies da família Doradidae: *Amblydoras affinis*, *Anadoras wedelli*, *Agamyxis pectinifrons*, *Rhinodoras dorbignyi*, *Ossancora asterophysa*, *Ossancora punctata* e *Trachydoras paraguayensis* (**Tabela 1**). A coleta desse material biológico foi autorizada pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade: Licença N° 11399-1), utilizando tarrafas e rede de arrasto. Após o processamento do material e posterior fixação, todos os exemplares foram devidamente identificados pelo especialista em Doradídeos, Dr. José Birindelli e depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL).

A obtenção dos cromossomos mitóticos foi realizada seguindo Bertollo et al. (1978) e Foresti et al. (1993). Já os cromossomos meióticos foram obtidos por meio de células testiculares de acordo com Kligerman e Bloom (1977). A montagem do cariótipo foi realizada com auxílio do programa Adobe Photoshop, e a classificação cromossômica adotada seguiu os parâmetros estabelecidos por Levan et al. (1964). Os bandamentos cromossômicos utilizados no presente estudo foram: Bandamento C (Sumner 1972) com uma modificação na



etapa de coloração, onde o Giemsa foi substituído pelo fluorocromo Iodeto de Propídeo seguindo a metodologia proposta por Lui et al. (2012); impregnação por nitrato de prata (Howell e Black 1980); e a coloração com os fluorocromos base-específicos Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4'6 diamino-2-fenilindole (DAPI) (Schweizer 1980).

O mapeamento físico dos DNAr, a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi aplicada seguindo o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), utilizando as sondas de DNAr 18S isolada de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti 2004) e de DNAr 5S obtida a partir do genoma de *Imparfinnis shubartti* (Gouveia 2015, em preparação).

## Resultados

### *Amblydoras affinis*

A análise citogenética convencional e molecular revelou a existência de duas formas cariotípicas para essa espécie, aqui denominadas: **Cariótipo A**, observado em um exemplar, que apresentou 46 cromossomos (18m + 20sm + 8st-a) (**Fig. 1a**), RONS simples terminais no braço longo do par 14 e sítios de DNAr 5S no braço curto do par 17 (**Fig. 2**) e **Cariótipo B**: descrito para a maioria dos indivíduos e sendo constituído por 60 cromossomos (20m + 14sm + 26st-a) (**Fig. 1b**) e RONS simples terminais no braço curto do par 20 (**Fig. 2**).

Quanto ao padrão de bandamento C, as duas formas cariotípicas também foram claramente distinguidas, sendo que indivíduos portadores de 46 cromossomos (Cariótipo A) possuem blocos heterocromáticos maiores situados principalmente em regiões terminais de cromossomos metacêntricos além de alguns blocos intersticiais e nenhuma região heterocromática associada às RONS (**Fig. 3a**). Os exemplares com  $2n=60$  (Cariótipo B) possuem a maioria das regiões de heterocromatina localizadas sob a forma de blocos terminais no braço curto de cromossomos submetacêntricos. Além destes existem também



algumas heterocromatinas intersticiais assim como em ambas as extremidades de um par metacêntrico de tamanho mediano (**Fig. 3b**).

### *Trachydoras paraguayensis*

*T. paraguayensis* apresentou cariótipo formado por 56 cromossomos, sendo estes distribuídos em  $28m + 22sm + 6st-a$  (**Fig. 1c**); RONS simples intersticiais no par 8 e quatro sítios de DNAr 5S situados em ambas as extremidades do par 18 (**Fig. 2**). Essa espécie apresentou bastante heterocromatina localizada em regiões pericentroméricas e no braço curto de cromossomos meta-submetacêntricos (**Fig. 3c**).

### *Anadoras wedelli*

Todos os exemplares apresentaram  $2n= 56$  e fórmula cariotípica  $18m + 18sm + 20st-a$  (**Fig. 1d**); RONS simples terminais no braço longo do par 25 e sítios de DNAr 5S terminais no braço curto do par 17 (**Fig. 2**). As regiões heterocromáticas foram observadas principalmente em regiões pericentroméricas e terminais no braço curto. No entanto alguns pares merecem destaque, por serem possíveis marcadores para essa espécie, como é o caso de um par metacêntrico mediano portador de heterocromatina em ambas as extremidades e dos cromossomos onde as RONS estão situadas, que embora não sejam heterocromáticas, possuem um bloco adjacente bastante conspícuo (**Fig. 3d**).

### *Agamyxis pectinifrons*

A coloração convencional evidenciou em todos os indivíduos a presença de  $2n= 58$  ( $22m + 18sm + 10st + 18st-a$ ) (**Fig. 1e**) e sítios de DNAr 18S terminais posicionados no braço curto do par 17 (**Fig. 2**). O bandamento C detectou heterocromatina em regiões



terminais e pericentroméricas, além de estar organizada sob a forma de blocos intersticiais e em ambos as extremidades de determinados cromossomos (**Fig. 3e**).

### ***Rhinodoras dorbignyi***

Os indivíduos dessa espécie apresentaram 58 cromossomos divididos em 20m + 20sm + 18st-a (**Fig. 1f**); RONS simples terminais no braço curto do par 15 e sítios de DNAr 5S situados terminalmente no braço curto de um par submetacêntrico 12 (**Fig. 2**). Essa espécie apresentou poucas regiões heterocromáticas, sendo que em apenas quatro cromossomos foram observados blocos terminais no braço curto, dentre os quais está o par subtelocêntrico portador das RONS (**Fig. 3f**).

### ***Ossancora asterophysa***

*O. asterophysa* exibiu 58 cromossomos divididos em 24m + 26sm + 8st-a (**Fig. 1g**); e RONS simples, detectadas pela impregnação pelo nitrato de prata situadas na porção terminal do braço curto do maior par submetacêntrico (Par 13) (**Fig. 2**). O padrão de heterocromatina observado nessa espécie foi caracterizado pela presença de muitos blocos heterocromáticos terminais, sendo que muitos deles encontraram-se co-localizadas, ocupando ambas as extremidades do mesmo cromossomo (**Fig. 3g**).

### ***Ossancora punctata***

*Ossancora punctata* que apresentou 66 cromossomos e fórmula cariotípica 12m + 10sm + 44 st-a (**Fig. 1h**); RONS simples terminais no braço curto do par 32 e sítios de DNAr 5S situados no braço curto do par 14 (**Fig. 2g**). O bandamento C revelou principalmente heterocromatinas pericentroméricas; terminais no braço longo de cromossomos subtelocêntricos.



acrocentricos e em ambas as extremidades da maioria dos cromossomos metacêntricos (**Fig. 3g**).

Em três exemplares dessa espécie, foram observadas células portando desde 1 até 3 microcromossomos supranumerários puntiformes (**Fig. 1g**) e totalmente heterocromáticos (**Fig. 3g**). Análises meióticas foram realizadas em apenas dois desses indivíduos, onde foram encontradas as seguintes fases: metáfase espermatogonial (**Fig. 4a**); paquíteno inicial (**Fig. 4b**); metáfase I com 33 bivalentes (**Fig. 4c**).

Após o bandamento C, foi possível observar os microcromossomos com maior facilidade, em decorrência de serem totalmente heterocromáticos nas fases de metáfase espermatogonial (**Fig. 4d**); paquíteno tardio (**Fig. 4e**); diplóteno/diacinese (**Fig. 4f**) e Metáfase I (**Fig. 4g**). A coloração com os fluorocromos DAPI e CMA<sub>3</sub>, revelaram sinais fluorescentes em Metáfase I (**Fig. 4h e Fig. 4i**), sendo que nessa última o cromossomo B exibiu fluorescência para os dois corantes, sendo, portanto constituído por heterocromatina neutra.

## Discussão

Os primeiros estudos cariotípicos envolvendo espécies da família Doradidae (Siluriformes) foram desenvolvidos há mais de duas décadas por Fenocchio et al. (1993). Desde então, somente outros cinco trabalhos foram realizados nesse grupo de peixes, contribuindo para a caracterização de 18 espécies, dentre as quais apenas *Trachydoras paraguayensis* apresentou  $2n=56$ , o restante exibiu um cariótipo constituído por 58 cromossomos com pequenas variações na fórmula cariotípica (**Tabela 1**). Esse aparente conservadorismo cromossômico, foi por muito tempo considerada uma característica



marcante de Doradidae. Contudo, a partir desse momento, tal afirmação deverá ser desconsiderada, visto que no presente estudo foi descrita uma acentuada variabilidade, com números diplóides variando desde  $2n=46$  no Cariótipo A descrito para *Amblydoras affinis* até  $2n=66$  cromossomos em *Ossancora punctata* (Fig. 5).

De um modo geral, pressupõe-se que o cariótipo ancestral a partir do qual os doradídeos diversificaram apresentava 58 cromossomos com predominância dos tipos metacêntricos e submetacêntricos (Fig. 5). Essa hipótese tem suporte filogenético, pois esse  $2n$  é a condição relatada em clados basais, como é o caso de *Wertheimeria maculata*, *Kalyptodoras bahiensis* e *Franciscodoras marmoratus* (Fenocchio et al. 1993; Garcia 2005; Eler et al. 2007; Milhomem et al. 2008; Paixão 2010). Além disso, uma macroestrutura similar, ocorre em espécies da família Auchenipteridae (Lui et al. 2009; Lui et al. 2010; Lui et al. 2013a; Lui et al. 2013b), que segundo análises morfológicas e moleculares diversificou a partir do mesmo ancestral que deu origem aos doradídeos atuais, constituindo, portanto, clados irmãos (Arce et al. 2013; Birindelli et al. 2014).

A variabilidade observada na quantidade e morfologia de cromossomos sugere a participação de mecanismos evolutivos divergentes que atuaram de modo a manter, reduzir ou aumentar a quantidade de cromossomos a partir de diferentes rearranjos cromossômicos. Desse modo, analisando a figura 5, a manutenção do cariótipo ancestral ( $2n=58$ ) surge como uma forte tendência evolutiva entre as espécies de Doradidae, sendo que a variabilidade observada nas fórmulas cariotípicas seria decorrente de inversões pericêntricas. A diversificação cariotípica de Doradidae também envolveu a participação de rearranjos cromossômicos numéricos, como é o caso das translocações Robertsonianas que promoveram a redução do  $2n$  nas espécies *Amblydoras affinis* ( $2n=46$ ), *Anadoras wedelli* ( $2n=56$ ) e *Trachydoras paraguayensis* ( $2n=56$ ). Já as fissões cêntricas, seriam os rearranjos responsáveis



pelo aumento de cromossomos observado na maioria dos exemplares de *Amblydoras affinis* ( $2n=60$ ) e *Ossancora punctata* ( $2n=66$ ) (**Fig.6**).

Assim como a ocorrência de 58 cromossomos, a presença de RONS simples é outra condição frequente em Doradidae. A maioria das espécies possuem sítios localizados em posição terminal, contudo existe uma variação nos tipos e braços cromossômicos onde estão situados (**Tabela 1 e Figura 7**). As únicas exceções à esse padrão são as espécies *Trachydoras paraguayensis* e *Hassar gabiru*, nas quais as RONS foram detectadas em cromossomos metacêntricos em regiões intersticiais (Fenochio et al. 1993; Milhomem et al. 2008; presente estudo). As informações compiladas na figura 6, sugerem que a presença de sítios de DNAr 18S terminais confinados à um par de cromossomos subtelocêntricos é a condição ancestral de Doradidae. Essa hipótese recebe suporte filogenético visto que esse padrão ocorre em espécies da subfamília Wertheimerinae (Eler et al. 2007; Paixão 2010), *Franciscodoras marmoratus* (Garcia 2005) e no grupo irmão Auchenipteridae (Lui et al. 2010; Lui et al. 2013a; Lui et al. 2013b).

Partindo desse modelo ancestral, e considerando a variabilidade observada na posição das RONS, as inversões pericêntricas despontam como os rearranjos responsáveis pelas divergências observadas na dispersão dessa família multigênica. Assim, o padrão ancestral foi conservado somente nos clados basais, sendo que em espécies da subfamília Astrodoradinae ocorreu um acentuado rearranjo tanto na posição quanto na morfologia dos cromossomos portadores. Tal variação promovida por inversões pericêntricas parece ter ocorrido como menor intensidade na subfamília Doradinae, onde a maioria das espécies conservou os sítios de RONS na posição terminal do braço curto de cromossomos submetacêntricos (**Fig. 6**).



Em relação ao padrão de DNAr 5S ancestral de Doradidae, com base nas informações obtidas até o momento é praticamente impossível defini-lo, visto que em Auchenipteridae (grupo irmão), além de existirem poucos estudos, estes revelam uma variabilidade, onde a maioria das espécies possuem sítios múltiplos como é o caso de *Parauchenipterus galeatus* (Lui et al. 2010), *Tatia neiva* e *Tatia jaracatia* (Lui et al. 2013a). Apenas *Ageneiosus inermis* apresenta sítios de DNAr 5S intersticiais, restritos a um único par metacêntrico (Lui et al. 2013b). Outro complicador é o fato de que o mapeamento dessas sequências em Doradidae também é incipiente, e foi realizado em apenas seis espécies. Essa escassez de informações impossibilita delinear tendências evolutivas, mas evidenciam que a dispersão dos sítios de DNAr 5S é um excelente marcador citogenético para algumas espécies, dentre as quais se destacam *Franciscodoras marmoratus* que apresentou um sistema múltiplo com sítios intersticiais em dois pares cromossômicos, *O. punctata* que apresentou sítios em cromossomos acrocêntricos e *T. paraguayensis* com sítios biterminais (**Fig. 6**).

Assim como o padrão de distribuição dos sítios de DNAr 5S, 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. O primeiro padrão foi descrito para *P. granulatus* (Paiva 2012) e *Rhinodoras dorbignyi* (Presente estudo), que são espécies de grande porte e pertencentes à subfamília Doradinae. A característica que o define é a escassez de heterocromatina, sendo essa restrita aos centrômeros e também sob a forma de poucos blocos terminais, que geralmente são coincidentes com as RONS.

Um segundo padrão corresponderia àquele detectado em espécies filogeneticamente basais, como é o caso de *Wertheimeria maculata* (Eler et al. 2007) e



*Franciscodoras marmoratus* (Garcia 2005) assim como nas espécies da subfamília Astrodoradinae (Presente estudo) e em *Platydoras costatus* (Milhomem et al. 2008) que apresentaram muita heterocromatina, sendo essa distribuída de forma homogênea no cariótipo, e localizada em regiões pericentroméricas, terminais no braço curto e intersticial em alguns cromossomos. Essas espécies ainda compartilham uma característica marcante, que é a presença de um ou dois pares de cromossomos meta-submetacêntricos portadores de blocos de heterocromatina distal em ambos os braços cromossômicos.

O terceiro arranjo heterocromático foi caracterizado pela presença de muitos blocos, situados principalmente em regiões terminais no braço curto. Esse padrão, foi descrito somente em espécies da subfamília Doradinae, principalmente naquelas filogeneticamente derivadas como é o caso de *Trachydoras paraguayensis* (presente estudo), *Tenellus ternetzi*, *Hassar orestis* (Milhomem et al. 2008) e *Hassar wilderi* (Eler et al. 2007). O padrão 4 foi observado nas espécies *Ossancora asterophysa* e *Ossancora punctata* que apresentaram as regiões heterocromáticas localizadas principalmente em regiões terminais, sendo que muitos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos exibiram heterocromatina biterminal (Presente estudo). Até o momento, esse padrão de heterocromatina parece ser a única característica compartilhada entre as espécies de *Ossancora*, visto que a quantidade de cromossomos e a posição das RONS são bastante divergentes.

Interessante ressaltar que do ponto de vista filogenético, não existe consenso entre os estudos morfológicos e moleculares sobre o monofiletismo desse gênero. Sendo que, Birindelli (2014) confirma a condição monofilética e Arce et al. (2013) sugere que *Ossancora* é um agrupamento polifilético. Em relação à essa problemática, os dados cromossômicos tendem à corroborar o monofiletismo de *Ossancora*, apoiando o estudo realizado por Birindelli (2014), onde as espécies *O. eigenmanni* e *O. asterophysa* constituem um mesmo clado, compartilhando um conjunto maior de características citogenéticas ( $2n=58$  e RONS



terminais em submetacêntricos) do que com *O. punctata* ( $2n=66$  e RONS terminais em acrocêntricos) que seria então a espécie mais derivada do gênero.

Desse modo, o aumento na quantidade de cromossomos em *O. punctata* pode ser explicada pela ocorrência de fissões cêntricas em um cariótipo ancestral portador de  $2n=58$  e predominância de cromossomos de dois braços. Esse rearranjo além de modificar drasticamente a proporção entre os tipos cromossômicos (diminuição de meta-submetacêntricos e aumento no número de subtelo-acrocêntricos), também originou os cromossomos supranumerários observados em alguns exemplares dessa espécie provenientes do rio Miranda. A ocorrência de fissões certamente originou fragmentos cromossômicos, sendo que, a maioria deles foi naturalmente eliminada (pela ausência de centrômeros, telômeros ou outras regiões importantes para seu funcionamento). Contudo, alguns permaneceram pelo fato de conservarem em sua estrutura sequências centroméricas. Essa condição permitiu que tais segmentos segregassem normalmente durante a divisão meiótica, permanecendo em diferentes linhagens celulares sob a forma de cromossomos adicionais ao complemento padrão (**Fig. 8**).

Além de *Ossancora*, as espécies do gênero *Amblydoras* também não possuem suas relações filogenéticas bem esclarecidas, mesmo após a revisão taxonômica realizada por Sousa (2010). No presente estudo foram descritas duas formas cariotípicas para *Amblydoras affinis* sendo uma menos comum com  $2n=46$  e outra mais frequente com 60 cromossomos, apesar de não possuírem diferenças morfológicas significativas. Além da diferenciação numérica, essas formas cariotípicas ainda foram facilmente separadas tanto pela quantidade de cromossomos quanto pela distribuição de heterocromatina e padrões de RONS. Essa diferenciação cromossômica sugere que *Amblydoras* necessita de uma revisão taxonômica, utilizando não só parâmetros morfológicos, mas também marcadores genéticos, visto que a diversidade desse gênero encontra-se subestimada, devido à existência de diferentes espécies



crípticas.

A análise citogenética comparativa aqui realizada, além de auxiliar na resolução de algumas questões filogeneticamente conflituosas, tem como principal contribuição o fato de ter revelado uma diversidade cariotípica até então nunca descrita para a família Doradidae possibilitando delinear tendências evolutivas. Nesse grupo de peixes, o cariótipo ancestral ( $2n=58$  e RONS simples terminais) foi mantido na maioria das espécies, entretanto algumas características derivadas foram relatadas dentre as quais se destacam: números diplóides distintos, RONS intersticiais e cromossomos supranumerários. Essas variações são evidências de que Doradidae não segue uma evolução conservativa como foi postulado durante muito tempo, e ainda comprova que durante a história evolutiva dessa família ocorreram rearranjos como as inversões, translocações Robertsonianas e fissões, cuja atuação originou linhagens citogeneticamente diferenciadas.





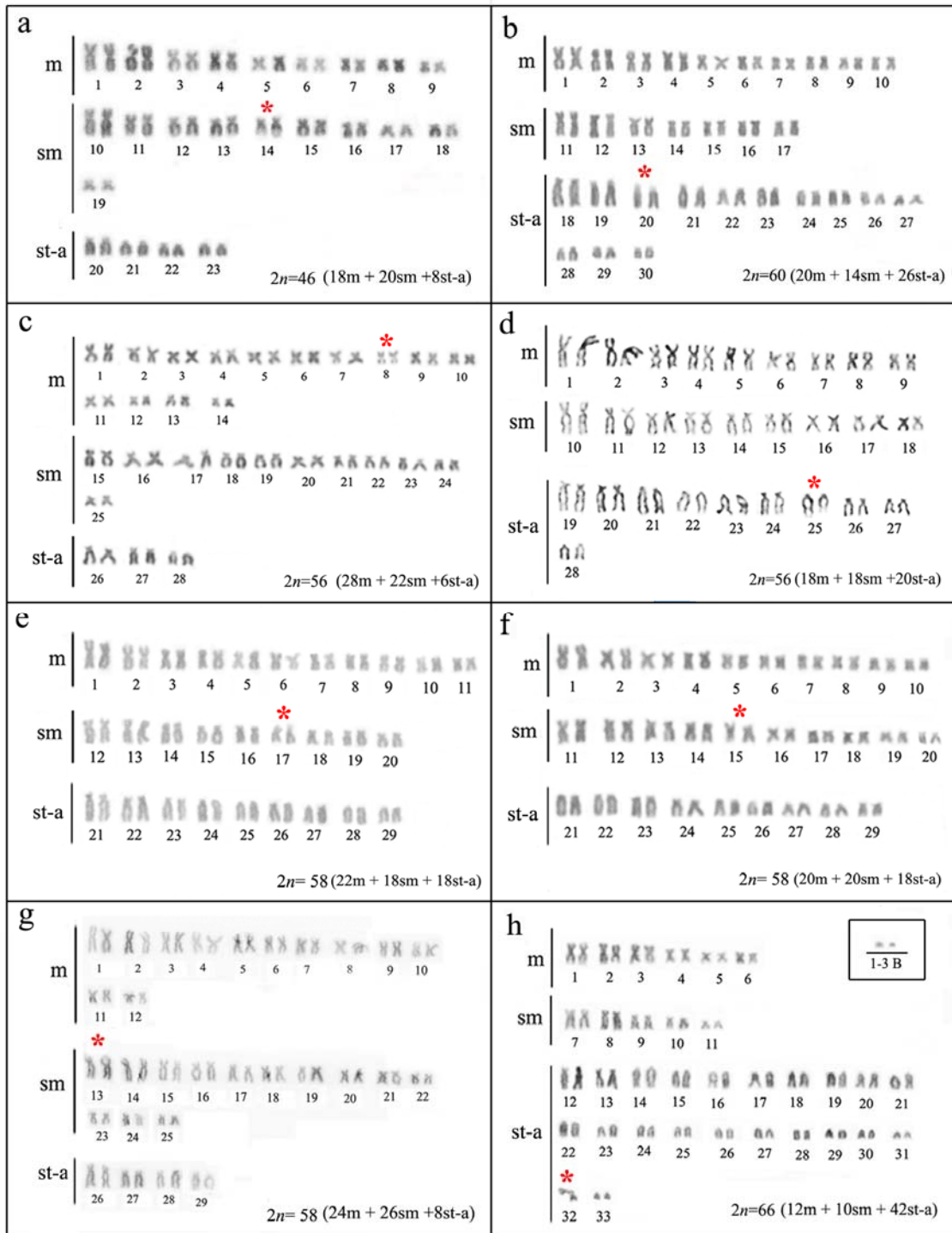
**TABELA 1: Dados Citogenéticos disponíveis para Família Doradidae: 2n= número diplóide; RON= região organizadora de nucléolos; ♀ = fêmea; ♂ = macho; T= terminal; IN= intersticial; S= simples; m= metacêntrico; sm= submetacêntrico; st= subtlocêntrico; a= acrocêntrico; FC= fórmulas cariotípicas.**

GÊNERO/ ESPÉCIE	2n	FC	RON	REFERENCIAS
<i>Wertheimeria maculata</i>	58	24m+ 14sm+ 8st+ 12 a	S: T	Eler et al. (2007)
<i>Kalyptodoras bahiensis</i>	58	-	S:T	Paixão (2010)
<i>Franciscodoras marmoratus</i>	58	28m+10sm+8st+12 a	S: T	Garcia (2005)
<i>Platyodoras cf. costatus</i>	58	26m+16sm+4st+2a	S: T	Milhomem et al. (2008)
<i>Pterodoras granulatus</i>	58	16m+16sm+14st+ 12a	S:T	Paiva (2012)
<i>Oxydoras niger</i> (citado como <i>Pseudodoras niger</i> )	58	20m+16sm+8st+14a	S: T	Fenocchio et al. (1993)
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	58	20m+20sm+4st+14a	S: T	Fenocchio et al (1993)
<i>Rhinodoras dorbignyi</i> (citado como <i>Rhinodoras</i> sp.)	58	18m+16sm+12st+12a	S: T	Fenocchio et al (1993)
<i>Trachydoras paraguayensis</i>	56	32m+20sm+4st	S: IN	Fenocchio et al. (1993)
<i>Ossancora eingenmanni</i> (citado como <i>Doras eigenmanni</i> )	58	36m + 10sm + 12st		Troy e Miyazawa (2000)
<i>Leptodoras cataniae</i> (citado como <i>L. acipenserinus</i> )	58	24m+16sm+14st+4a	S:T	Venere et al. (1998)
<i>Tenellus ternetzi</i> (citado como <i>Opsodoras ternetzi</i> )	58	44m+12sm+2 a	S:T	Milhomem et al. (2008)
<i>Tenellus leporhinus</i> (citado como <i>Opsodoras</i> sp.)	58	♀21m+18sm+12st+7a ♂20m+18sm+12st+8a	S:T	Venere et al. (1998)
		(ZZ/ZW)		
<i>Hassar orestis</i>	58	42m+14sm+2 a	S:T	Venere et al. (1998)
<i>Hassar orestis</i>	58	32m+20sm+6 a	S:T	Milhomem et al. (2008)
<i>Hassar cf. orestis</i>	58	32m+18sm+8 a	S:T	Milhomem et al. (2008)
<i>Hassar wilderi</i>	58	32m+16sm+10a	S:T	Eler et al. (2007)
<i>Hassar gabiru</i> (citado como <i>Hassar</i> sp.)	58	42m+14sm+2 a	S:IN	Milhomem et al. (2008)



**TABELA 2** – Espécies analisadas no presente estudo e seus respectivos locais de coleta. M= machos; F= fêmeas; NI= sexo não identificado.

ESPÉCIES	LOCAIS DE COLETA	Nº EXEMPLARES			
		M	F	NI	TOTAL
<i>Ossancora punctata</i>	Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.	2	1	4	7
	Rio Paraná – Paulicéia, São Paulo.			2	2
<i>Ossancora asterophysa</i>	Lago Catalão – Manaus, Amazonas.			9	9
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.	1	1		2
<i>Anadoras wedelli</i>	Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.	2	3	12	17
<i>Amblydoras affinis</i>	Loja de Aquários – Londrina, Paraná	4	3	3	10
<i>Agamyxis pectinifrons</i>	Loja de Aquários – Londrina, Paraná	1	2	3	6
<i>Trachydoras paraguayensis</i>	Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.			2	2



**FIGURA 1** – Cariótipos após coloração com Giemsa: **a)** *Amblydoras affinis*; **b)** *Amblydoras affinis*; **c)** *Trachydoras paraguayensis*; **d)** *Anadoras wedelli*; **e)** *Agamyxis pectinifrons*; **f)** *Rhinodoras dorbignyi*; **g)** *Ossancora asterophysa*; **h)** *Ossancora punctata*. Os **asteriscos vermelhos** indicam os cromossomos portadores de constrições secundárias.



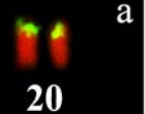


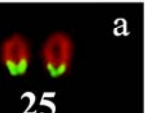

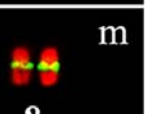

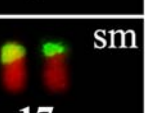
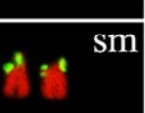
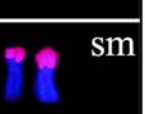
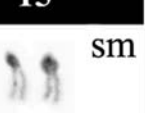

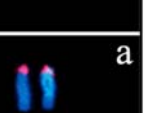
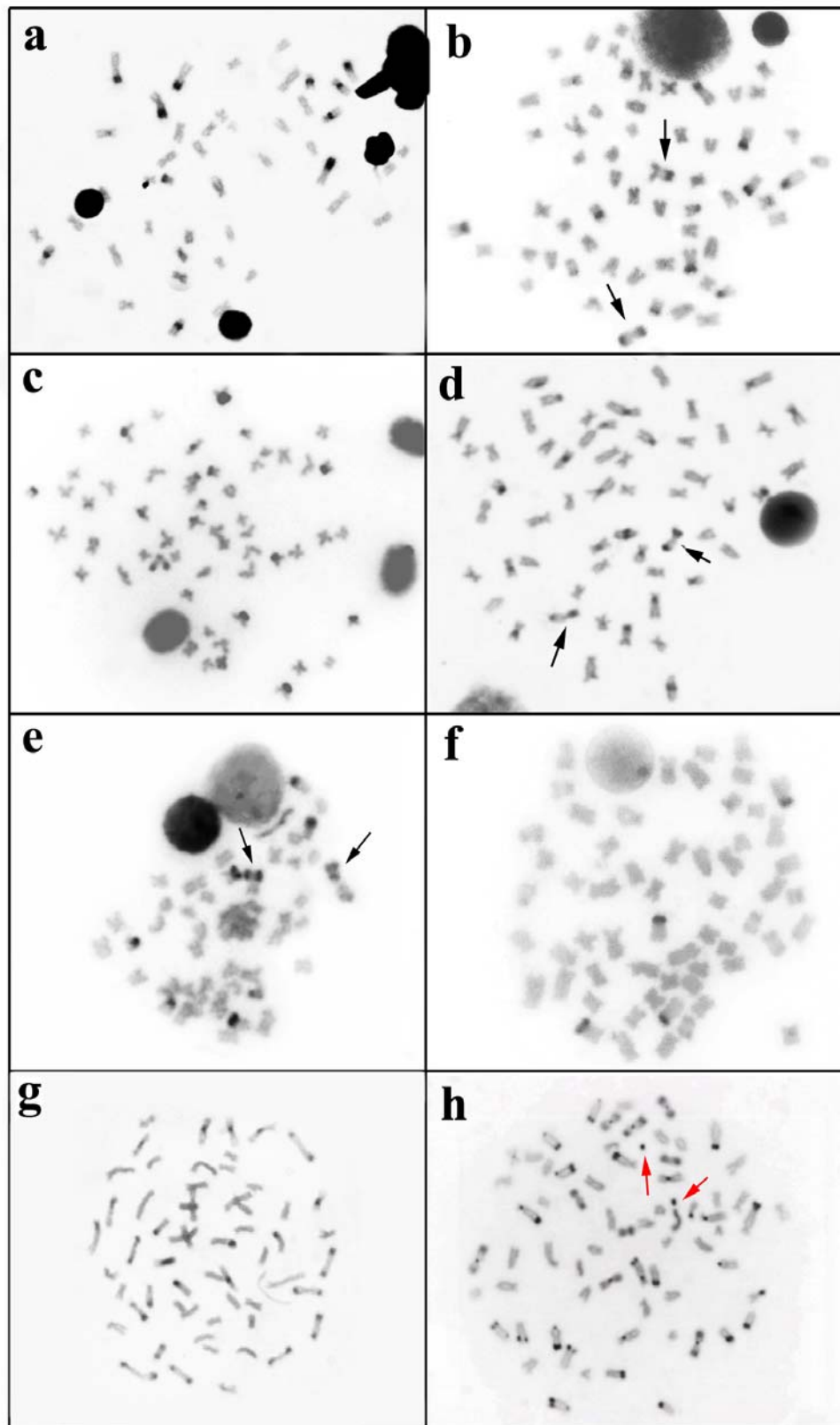
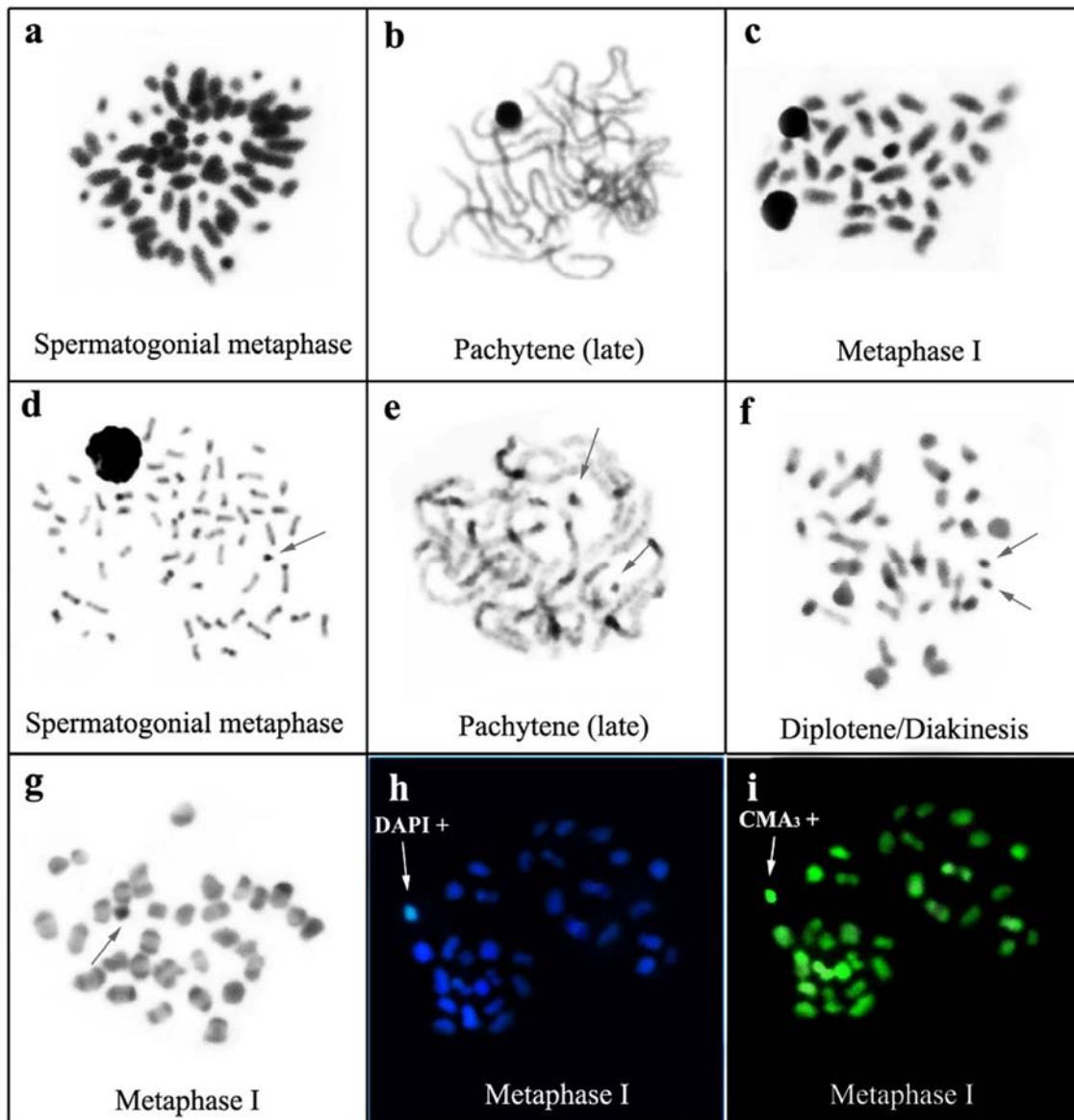
ESPÉCIES	RONs	DNAr 5S
<i>Amblydoras affinis</i> Cariótipo A	 a 20	
<i>Amblydoras affinis</i> Cariótipo B	 sm 14	 sm 17
<i>Anadoras wedelli</i>	 a 25	 sm 17
<i>Trachydoras paraguayensis</i>	 m 8	 sm 18
<i>Agamyxis pectinifrons</i>	 sm 17	
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	 sm 15	 sm 12
<i>Ossancora asterophysa</i>	 sm 13	
<i>Ossancora punctata</i>	 a 32	 a 14

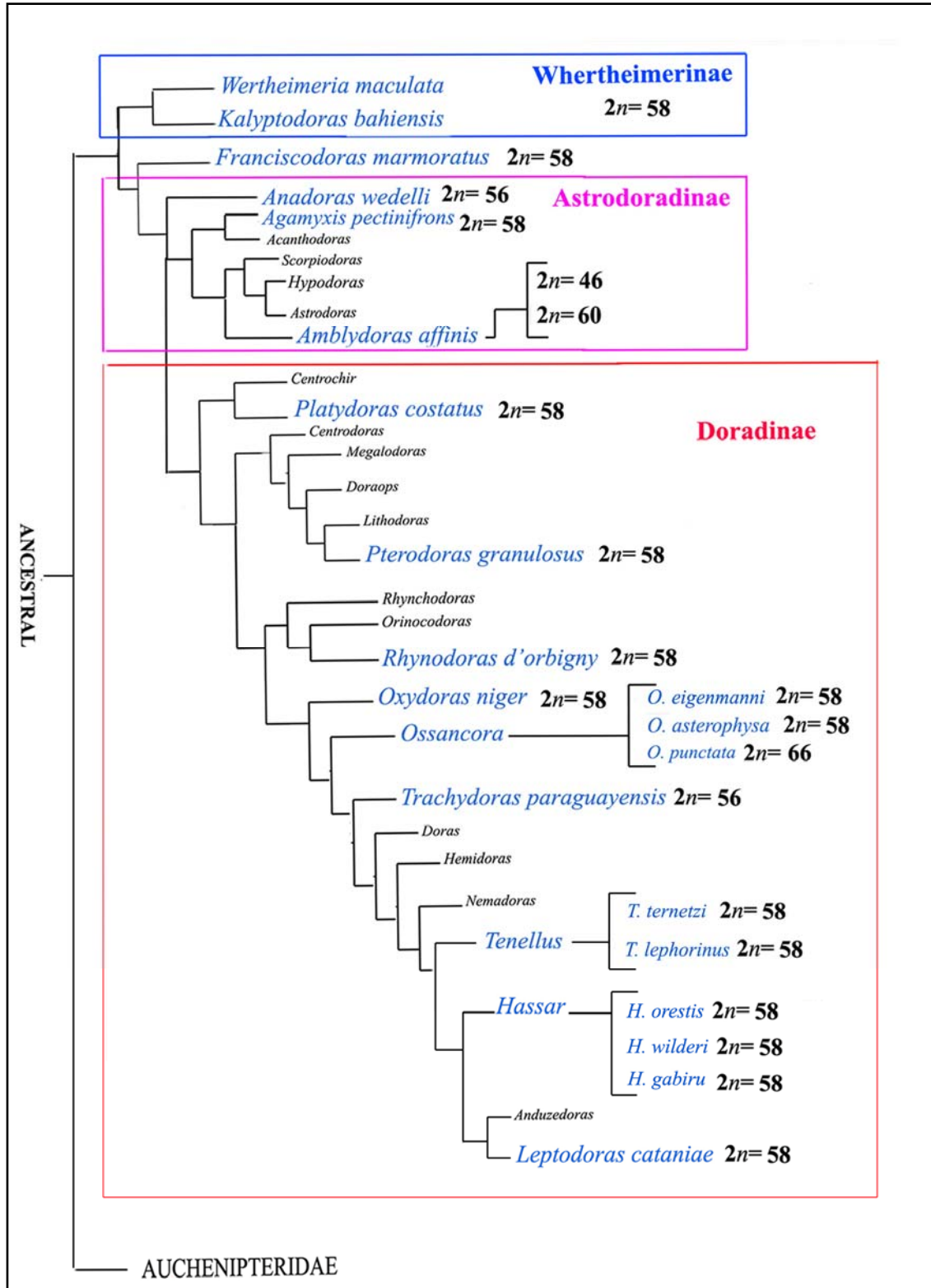
FIGURA 2 – Pares cromossômicos portadores das RONs e sítios de DNAr 5S.



**FIGURA 3** – Metáfases mitóticas submetidas ao bandamento C: **a)** *Amblydoras affinis*; **b)** *Amblydoras affinis*; **c)** *Trachydoras paraguayensis*; **d)** *Anadoras wedelli*; **e)** *Agamyxis pectinifrons*; **f)** *Rhinodoras dorbignyi*; **g)** *Ossancora asterophysa*; **h)** *Ossancora punctata*. As **setas pretas** destacam os pares metacêntricos portadores de heterocromatina biterminal; **setas vermelhas**: microcromossomos Bs.



**FIGURA 4-** Características estruturais e comportamento meiótico dos cromossomos supranumerários observados em alguns indivíduos de *Ossancora punctata* do rio Miranda, submetidos à Coloração convencional (**a**), (**b**), (**c**); Bandamento C (**d**), (**e**), (**f**), (**g**); Dupla coloração como fluorocromos base específicos DAPI (**h**) e CMA<sub>3</sub> (**i**).



**FIGURA 5** – Filogenia Consenso da Família Doradidae, baseada em caracteres morfológicos de acordo com **Sousa (2010)** e **Birindelli (2014)** associada à variação observada no número diplóide. Em azul as espécies que possuem informações cariotípicas.

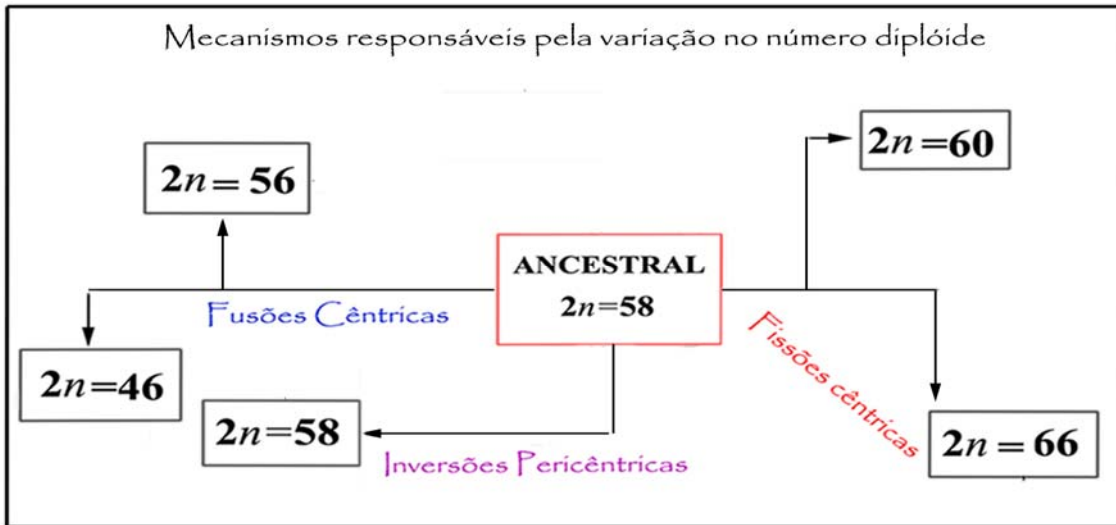


FIGURA 6– Esquema ilustrando a Hipótese de diversificação do número diplóide em espécies de Doradidae.

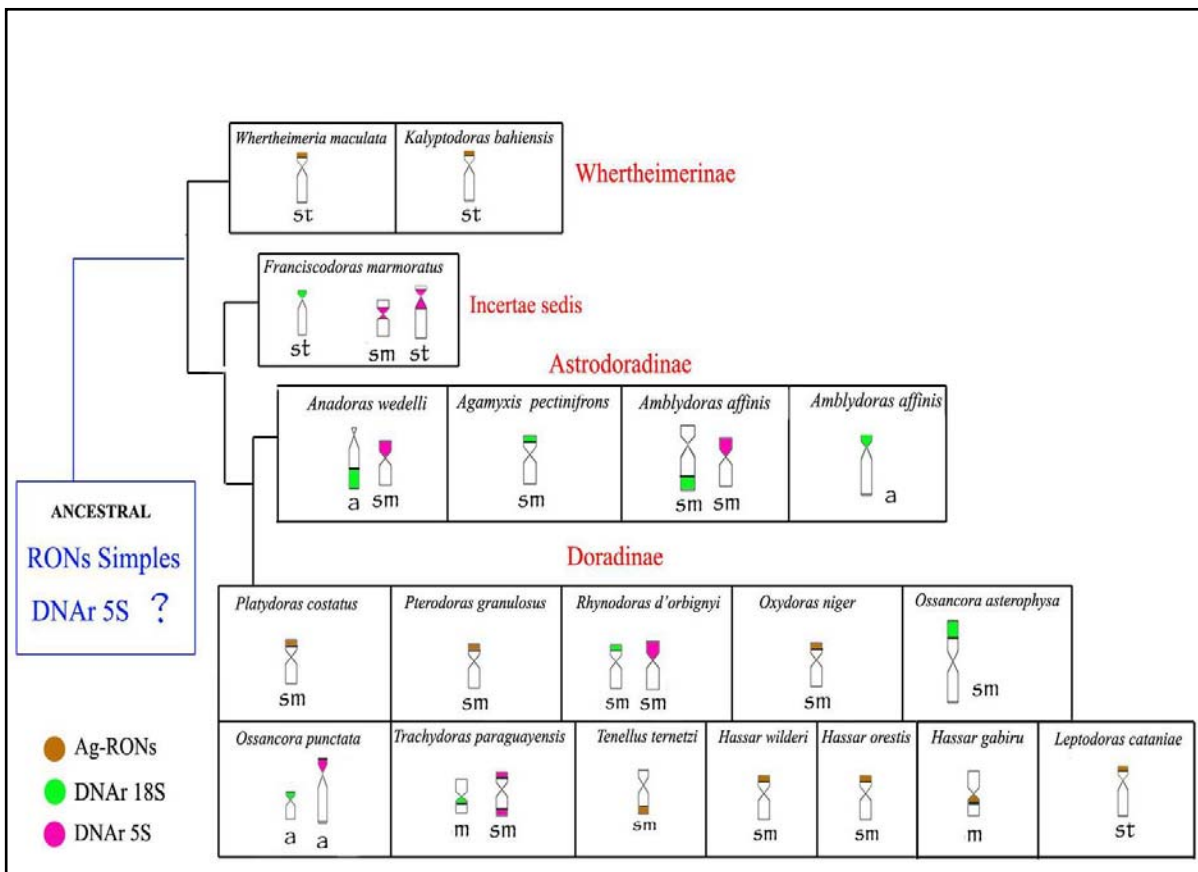
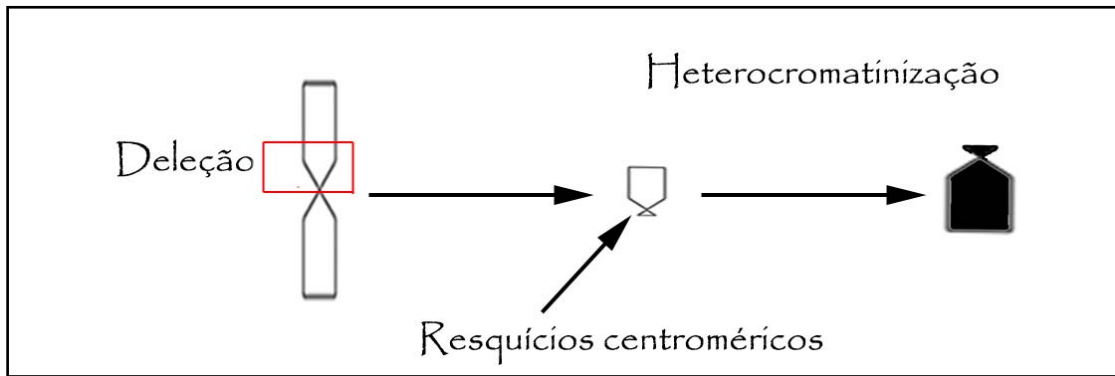


FIGURA 7 – Padrões de dispersão dos DNaR 18S e 5S, e suas correlações filogenéticas.



**FIGURA 8** – Esquema demonstrando a provável origem dos microcromossomos supranumerários observados em *Ossancora punctata*.



## Referências Bibliográficas

- ARAI, R. Fish Karyotypes: A Check List. Springer. 1: 1-325. 2011.
- Arce MH, Reis ER, Geneva AJ, Sabaj PHM (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.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, 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). *Neotropical Ichthyology*. 12(3): 451-564.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome Evolution. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci*. 55: 163–178.
- Catanhêde G, Hahn NS, Gubiani EA, 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.
- Eler ES, Dergam JA, Vênere PC, Paiva LC, Miranda GA, Oliveira 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*. 130:99-103.
- Fenocchio AS, Jorge LC, Venere PC e Bertollo LAC (1993) Karyotypic characterization and nucleolous organizer regions in three species of Doradidae (Pisces, Siluriformes). *Revista Brasileira de Genetica*. 4:1097-1101.
- Ferraris CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalog primary types. *Zootaxa*.



Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810–813.

Garcia C (2005) Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos-SP.

Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2004) Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*; 122: 239-244.

Higuchi H (1992) A phylogeny of the south American thorny catfishes (Osteichthyes; Siluriformes; Doradidae). Tese não publicada. Harvard University, Boston, 372p.

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: as 1-step method. *Experientia*. 36: 1014-1015.

Jones RN, Rees HB (1982) *Chromosomes*. Academic Press. London.

Kligerman AD, Bloom SE (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 34: 266-269.

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 chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron*. 40: 552–559.

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society*. 99: 648–656. 2010.



Lui RL, Margarido VP, Moreira-Filho O (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry*. 87 (7): 433–438.

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Troy MP, Moreira-Filho O (2013a) Comparative chromosomal analysis and evolutionary considerations concerning two species of genus *Tatia* (Siluriformes, Auchenipteridae). *Comparative Cytogenetics*. 7(1): 63-71.

Lui RL, Blanco DR, Martinez JL, Margarido VP, Venere PC, Moreira-Filho O (2013b) The role of chromosomal fusion in the karyotypic evolution of the genus *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae), *Neotropical Ichthyology*. 11 (2).

Milhomem SSR, Souza ACP, Nascimento AL, Carvalho Jr. JR, Feldberg E, Pieczarka JC, Nagamichi CY (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.

Paixão AEM (2010) Estudos genéticos em *Kalyptodoras bahiensis*, capturada na bacia do médio e baixo Paraguaçu-BA, através de marcadores citogenéticos e moleculares, Monografia. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Paiva LRS (2012) Bandamento em cromossomos de peixes: Discussão sobre o conceito de compartimentalização cromossômica, Tese. Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 83: 2934-2938.

Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America, Porto Alegre: EDIPUCRS.

Schweizer D, Loidl J (1978) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-banding patterns, *Chromosome Today*. 9: 61-74.



Sousa LM (2010) Revisão Taxonômica e Filogenia de Astrodoradinae (Siluriformes, Doradidae), Dissertação não publicada. Universidade de São Paulo, São Paulo. 276.

Sumner AMT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin, *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.

Troy WP e Miyazawa CS (2000) Estudos citogenéticos em Doradidae (Pisces, Siluriformes) da bacia do Pantanal. VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. Manaus.

Vari RP e Malabarba LR (1998) Neotropical ichthyology: an overview. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS e Lucena CAS. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. pp. 1-11. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.

Venere PC (1998) Diversificação cariotípica em peixes do médio rio Araguaia, com ênfase em Characiformes e Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi), Tese não publicada. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos á Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Biologia Geral, por disponibilizar toda estrutura laboratorial para realização desse trabalho. A CAPES pelo suporte financeiro e ao ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), por permitir a coleta do material biológico.



## Capítulo 2

“Caracterização citogenética de três populações do armado *Pterodoras granulosus* (Siluriformes-Doradidae): evidências de diversificação microestrutural associada ao distanciamento geográfico”.

Esse artigo será submetido á Revista **Enviromental Biology of Fishes**.





**“Caracterização citogenética de três populações do armado *Pterodoras granulosus* (Siluriformes-Doradidae): evidências de diversificação microestrutural associada ao distanciamento geográfico”.**

---

Fábio Hiroshi Takagui; José Olivan Birindelli; Ana Claudia Swarça; Ana Lucia Dias; Eliana Feldberg; Alberto Sergio Fenocchio & Lucia Giuliano-Caetano.

## **Resumo**

*Pterodoras granulosus* é um peixe de grande porte, hábito migratório e amplamente distribuído pela América do Sul, onde apresenta importância na pesca comercial e no controle biológico de moluscos invasores. O conhecimento acerca das características citogenéticas dessa espécie são escassos, e nesse estudo uma análise comparativa entre populações geograficamente distantes de *P. granulosus* foi realizada com intuito de caracterizar a organização cromossômica assim como investigar se existe diversificação cariotípica entre essas populações. As análises convencionais e moleculares revelaram poucas divergências, sendo que todas as populações apresentaram 58 cromossomos e padrões de DNAr 18S e 5S similares. No entanto, alterações microestruturais relacionadas tanto com a ocorrência de heteromorfismo cromossômico estrutural, quanto variações interpopulacionais na quantidade e localização de heterocromatina foram verificadas. Com base nesses dados, foi possível definir que os exemplares provenientes da bacia amazônica são os mais divergentes quando comparados com aqueles provenientes do rio Miranda e rio Paraná que pertencem a uma mesma bacia hidrográfica (Platina), por isso são mais relacionados. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o padrão de diversificação cariotípica observado em *P. granulosus* é um reflexo tanto de suas características biológicas (espécie migratória), quanto um indicativo de que sua dispersão pelas bacias hidrográficas sul-americanas é um evento biogeográfico recente.

**Palavras-chave:** Cariótipo, Variabilidade, heterocromatina, DNAr, Biogeografia.



## Introdução

*Pterodoras granulosus* (Valenciennes 1821), popularmente conhecido como armado e abotoado é um peixe siluriforme que pertence á família Doradidae. Essa espécie de hábito migratório encontra-se amplamente distribuída na América do Sul ocorrendo nas bacias hidrográficas dos rios Amazonas, Paraguai e Paraná (Ferraris 2007; Makrakis et al. 2007). Até meados da década de 80, ela não havia sido descrita em levantamentos ictiofaunísticos realizados no Alto rio Paraná, contudo a construção do reservatório de Itaipu e consequente submersão do Salto de Setes Quedas possibilitou a dispersão dessa espécie para essa região, onde até então existia somente *Rhynodoras dorbigny* como representante da família Doradidae (Zawadzki et al. 1996).

O impacto causado pela “invasão” e o rápido sucesso adaptativo que *P. granulosus* apresentou na região do Alto Paraná tornou essa espécie um modelo para a realização de estudos abordando características comportamentais, reprodutivas, morfológicas e ecológicas (Ferriz et al. 2000; Feitoza et al. 2004; Agostinho et al. 2009). Dessa forma, essa espécie é a mais estudada dentre aquelas alocadas na família Doradidae, e isso se deve principalmente a três fatores: (I) importância econômica, sendo bastante apreciado na pesca comercial, (II) atuação como dispersor de sementes de algumas plantas (ictiocoria); (III) controle biológico do mexilhão-dourado (*Corbicula flumínea*), um molusco invasor de origem asiática que tem causado sérios problemas ao reservatório de Itaipu (Souza- Stevaux et al. 1994; Darrigan e Colautti 1994; Pilati et al. 1999; Da Luz et al. 2002; Catanhande et al. 2008).

A ocorrência de populações de *P. granulosus* distribuídas tanto na bacia Amazônica e Platina oferece uma excelente oportunidade de se estudar aspectos biogeográficos e quais suas possíveis implicações na diversificação cariotípica desses peixes. Nesse sentido, a abordagem citogenética seria extremamente eficiente, e essa premissa



motivou a realização do presente estudo, que por meio da descrição do cariótipo de exemplares do rio Paraná, Paraguai e Amazonas pretende investigar se existe variabilidade citogenética interpopulacional e inferir quais processos carioevolutivos estariam envolvidos na sua origem.

## Material e Métodos

Foram analisados 26 exemplares de *Pterodoras granulosus* provenientes das bacias hidrográficas dos rios Paraná, Paraguai e Amazonas (**Fig.1, Tabela 1**). A obtenção dos cromossomos mitóticos foi realizada seguindo o método proposto por Bertollo et al. (1978) e Foresti et al. (1993), já os cromossomos meióticos foram obtidos por meio de células testiculares de acordo com Kligerman e Bloom (1977).

A montagem do cariótipo foi realizada com auxílio do programa Adobe Photoshop, e a classificação cromossômica adotada seguiu os parâmetros estabelecidos por Levan et al. (1964). Os bandamentos cromossômicos utilizados no presente estudo foram: Bandamento C (Sumner 1972) com uma modificação na etapa de coloração, onde o Giemsa foi substituído pelo fluorocromo Iodeto de Propídeo seguindo a metodologia proposta por Lui et al. (2012); impregnação por nitrato de prata (Howell e Black 1980); e a coloração com os fluorocromos base-específicos Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4'6 diamino-2-fenilindole (DAPI) (Schweizer 1980).

Para realizar o mapeamento físico dos DNAr, a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi aplicada seguindo o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), utilizando as sondas de DNAr 18S isolada de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti 2004) e de DNAr 5S obtida a partir do genoma de *Imparfinnis shubarti* (Gouveia 2015, em preparação).



## Resultados

### A- População do Alto rio Paraná

Todos os exemplares apresentaram 58 cromossomos e fórmula cariotípica  $16m + 16sm + 14st + 12a$  e  $NF= 104$  (**Fig. 2a**). A coloração com Giemsa ainda evidenciou em quatro indivíduos (2 machos e 2 fêmeas) a ocorrência de um heteromorfismo de tamanho no par submetacêntrico 12, caracterizado pela presença de um cromossomo mediano (**sm 12A**) e outro menor (**sm 12B**) (**Fig. 2a e Fig.3**). Aparentemente a condição normal do par 12 observada na maioria dos exemplares dessa população, é a presença de dois cromossomos sm12A, o que caracteriza uma configuração aqui denominada de homomórfica (**Fig. 3**).

Por meio do bandamento C, foi identificado um padrão caracterizado pela presença de pouca heterocromatina, localizada em regiões pericentroméricas dos pares metacêntricos 1, 2, 5 e 6, no par submetacêntrico 9 e no par 17. E um bloco no braço curto do par 19, que provavelmente coincide com a constrição secundária observada após coloração convencional (**Fig. 2b**).

A impregnação por nitrato de prata evidenciou a presença de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) no braço curto do par subtelocêntrico 19. Esse padrão simples foi confirmado pela hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S. Já os sítios de DNAr 5S foram detectados em apenas uma par de cromossomos submetacêntricos posicionados no braço curto (**Fig. 4**).

Uma característica peculiar observada em seis indivíduos dessa população foi a presença de um pequeno cromossomo supranumerário acrocêntrico totalmente heterocromático (**Fig. 2a e Fig.4**). A frequência do cromossomo B foi considerada relativamente baixa, variando de 12,5% à 23,8% (**Tabela 2**).

Análises meióticas foram conduzidas em três indivíduos do sexo masculino, revelando em metáfase espermatogonial a presença de 58 cromossomos e um pequeno



cromossomo B (**Fig. 5a**); a maioria das células analisadas estava em paquíteno inicial (menos condensado) (**Fig. 5b**) e final (condensação maior) (**Fig. 5c**). Contudo, em nenhuma delas foi possível discriminar os bivalentes do complemento A, sendo que em poucas células o cromossomo B foi facilmente identificado tanto pelo reduzido tamanho quanto por apresentar-se isolado dos demais bivalentes. A única fase onde foi possível discriminar os 29 bivalentes foi o diplóteno, confirmando assim o número diplóide da espécie e também evidenciando o cromossomo B e alguns quiasmas (**Fig. 5d**).

O bandamento C em células meióticas confirmou o padrão observado nos cromossomos mitóticos, revelando heterocromatina pericentromérica e no cromossomo B nas seguintes fases: metáfase espermatogonial (**Fig. 5e**), metáfase I (**Fig. 5f**) e metáfase II (**Fig. 5g**). A coloração com os fluorocromos facilitou a identificação tanto das RONS que são GC ricas, quanto do cromossomo B que apresentou sinais positivos para a CMA<sub>3</sub> e o DAPI (heterocromatina neutra) em metáfase I (**Fig. 5h e 5i**).

### **B- População do rio Miranda – Sistema hidrográfico rio Paraguai**

Os exemplares coletados nessa localidade também exibiram 58 cromossomos e fórmula cariotípica  $16m + 16sm + 14st + 12a$  e  $NF= 104$  (**Fig. 2c**). O padrão de bandamento C foi similar ao descrito para os exemplares do Alto rio Paraná exibindo heterocromatina pericentromérica na maioria dos cromossomos. Blocos adicionais foram observados na região terminal do braço longo do par subtelocêntrico 17 e antecedendo a região coincidente com a constrição secundária no braço curto do par subtelocêntrico 19 (**Fig. 2d**).

A impregnação pelo nitrato de prata revelou RONS simples heteromórficas no braço curto do par subtelocêntrico 19. Esse mesmo par cromossômico exibiu sinais fluorescentes após a hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S. Em relação ao padrão de DNAr 5S, a maioria dos indivíduos, apresentou dois sítios no braço curto do par



submetacêntrico 13. Entretanto em duas fêmeas, foi detectado um arranjo diferenciado, sendo um dos cromossomos submetacêntricos portador de sítios de DNAr 5S em todo o braço curto (padrão mais frequente), e o outro com sítios menores ocupando somente a região pericentromérica (**Fig. 4**).

### C- População do Lago Catalão – Sistema hidrográfico rio Amazonas

A coloração convencional evidenciou a presença de  $2n= 58$  cromossomos, fórmula cariotípica de  $18m + 18sm + 12st + 10a$  (NF= 102) (**Fig.2e**). Assim como nas demais populações, poucos blocos heterocromáticos foram observados, sendo a maioria em regiões pericentroméricas. No entanto, blocos adicionais foram detectados no braço curto dos cromossomos submetacêntricos 13 e 16 e em posição terminal do braço longo do par 19 (**Fig.2f**). Em relação ao DNAs ribossômico, foi observado o mesmo padrão descrito para os exemplares do Alto rio Paraná e rio Miranda, sendo o DNAr 18S localizado no braço curto do par subtelocêntrico 21 e o DNAr 5S ocupando todo o braço curto do par submetacêntrico 14 (**Fig. 4**).

## Discussão

Embora o  $2n= 58$  tenha sido conservado nas diferentes populações de *P. granulosus* provenientes dos sistemas hidrográficos da bacia Platina (Alto rio Paraná e rio Miranda) e Amazônica (Lago Catalão), alterações microestruturais foram detectadas. Dessa forma, cada população exibiu características cromossômicas particulares, relacionadas principalmente com modificações na morfologia cromossômica decorrente de heteromorfismos estruturais, variação na quantidade de heterocromatina e à ocorrência de cromossomo supranumerário.



Dentre os exemplares do Alto rio Paraná, por exemplo, quatro indivíduos apresentaram um heteromorfismo estrutural no par submetacêntrico 12, caracterizado pela presença de um cromossomo mediano (**sm12A**) e outro menor (**sm12B**). Aparentemente, a condição normal do par 12 nessa população é a presença de dois cromossomos sm12A (homomórfico A), de modo que a configuração homomórfica B (sm12B + sm12B) não foi observada em nenhum exemplar. A ocorrência desse heteromorfismo parece ser uma característica exclusiva dos exemplares coletados na bacia do Rio Paraná, sugerindo a participação de deleções. Esse rearranjo estrutural é corroborado pela ausência de indivíduos portadores da configuração homomórfica B, aparentemente inviável em função da perda de genes vitais nesse segmento cromossômico. Sendo assim, a manutenção da condição heteromórfica nessas duas populações do Alto rio Paraná ainda é viável, graças ao fato de que um dos cromossomos do par 12 (sem a monossomia parcial) codificaria os produtos gênicos dessa região normalmente em quantidades suficientes para compensar a ausência no outro cromossomo (sm12B).

Segundo Kasahara (2009), as deleções assim como todos os demais tipos de rearranjos estruturais ocorrem devido à quebras cromossômicas em sítios frágeis que podem surgir espontaneamente ou ter sua frequência aumentada sob ação de agentes clastogênicos físicos (radiação ionizante, temperatura) ou químicos (pesticidas, alterações de pH, entre outras substâncias). A porção alta do Rio Paraná, onde *P. granulosus* se estabeleceu após a submersão do Salto de Sete Quedas, é uma das regiões mais impactadas por atividades antropogênicas, principalmente aquelas relacionadas à construção de hidroelétricas e poluição agrícola.

Dessa forma o surgimento de heteromorfismos decorrentes de deleções cromossômicas em alguns exemplares do presente estudo provavelmente ocorreu em função de algum agente clastogênico físico ou químico decorrente de alterações ambientais



provocadas por essas atividades nessa bacia. Tal hipótese, embora necessite de um embasamento mais consistente, também é um indicativo de que essa alteração ocorreu recentemente na história evolutiva dessa espécie e ainda não alcançou uma estabilidade, pois sua frequência variou significativamente na população.

Outra particularidade observada em seis exemplares da população do rio Paraná – Paulicéia foi a presença de um pequeno cromossomo supranumerário acrocêntrico. Dentre os peixes da família Doradidae, esse tipo de polimorfismo numérico foi descrito somente para uma população de *Ossancora punctata* que exibiu células portando de 1 até 3 micromossomos Bs e totalmente heterocromáticos (presente estudo – Capítulo 1). Embora possua uma frequência relativamente baixa em células mitóticas, o cromossomo B de *P. granulatus* apresenta um comportamento regular durante as diferentes fases da Meiose, por meio de suas características morfológicas (menor cromossomo acrocêntrico), estruturais, composicionais (rico em pares de bases GC e AT) e segregacionais (geralmente isolado dos demais cromossomos do complemento A).

Os mecanismos relacionados à origem e evolução de cromossomos Bs ainda permanecem obscuro, sendo que diversas teorias tem sido levantadas. Dentre elas, a mais aceita é a de que esses componentes genômicos adicionais tenham surgido a partir de rearranjos envolvidos na diferenciação cariotípica de cromossomos do complemento padrão (Camacho et al. 2000; Lui et al. 2009; Vicari et al. 2011; Blanco et al. 2012). Considerando esse raciocínio, é provável que o cromossomo B descrito para *P. granulatus* tenha sido originado a partir de um evento similar ao que foi responsável pela formação do cromossomo sm12B. Desse modo, ele seria inicialmente um segmento deletado de algum cromossomo do complemento padrão, que posteriormente se manteve nas células germinativas desse indivíduo ancestral pelo fato de ainda possuir resquícios de regiões centroméricas. A permanência dessas sequências, garantiu uma segregação meiótica aparentemente normal que



possibilitou a dispersão desse microcromossomo para outras células desse indivíduo, produzindo gametas desbalanceados, como evidenciado pelas análises meióticas realizadas no presente estudo.

Variações microestruturais também foram detectadas na quantidade e dispersão das regiões heterocromáticas, permitindo discriminar facilmente as populações de *P. granulatus*. Sendo assim, os indivíduos coletados no rio Paraná apresentaram a menor quantidade de heterocromatina, distribuída somente em algumas regiões pericentroméricas, intercalada aos genes ribossômicos (RONS) e no cromossomo supranumerário. A população do rio Miranda, também apresentou um padrão de heterocromatina semelhante, contudo, tais exemplares exibiram regiões heterocromáticas em posição adjacente (e não intercaladas) às RONS e blocos terminais no braço longo do par subtelocêntrico 17.

Já a população do Lago Catalão, embora também possua  $2n=58$ , parece ser a mais diferenciada tanto em relação às fórmulas cariotípicas ( $18m + 18sm + 12st + 10a$ ), quanto ao padrão de bandamento C. Esses indivíduos da bacia amazônica possuem mais heterocromatina do que aqueles originários da bacia Platina, visto que apresentaram grandes blocos terminais no braço curto dos pares 13 e 16, no braço longo dos cromossomos 19 assim como um arranjo heterocromático diferenciado nas RONS, que ao contrário das demais populações, a heterocromatina encontra-se tanto em posição adjacente aos cistrons ribossomais quanto posteriormente, como se estivesse “flanqueando” as RONS.

Em relação às RONS, em todas as populações foi observado um padrão simples, com sítios em posição terminal no braço curto de cromossomos subtelocêntricos medianos. Tal padrão parece ser uma característica basal da família Doradidae e essa hipótese recebe grande suporte filogenético, visto que tais plesiomorfias além de ocorrerem nos clados basais (*Wertheimeria maculata*, *Franciscodoras marmoratus* e *Kalyptodoras bahiensis*), também é comum em Auchenipteridae, grupo irmão de Doradidae e atualmente formam um clado



neotropical denominado Doradoidea (Moyer et al. 2004; Garcia 2005; Eler et al. 2007; Milhomem et al. 2008; Paixão 2009; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010; Lui et al. 2013a; Lui et al. 2013b; Arce et al. 2013; Birindelli 2014; presente estudo- Capítulo 1).

De maneira similar ao padrão de DNAr 18S, todos os indivíduos de *P. granulatus* exibiram apenas um par de cromossomos portadores de sítios de DNAr 5S. Segundo Swarça et al. (2009), a presença de sítios simples terminais de DNAr 5S é a condição mais comum dentre diferentes espécies da ordem Siluriformes. No entanto, muitos grupos dessa ordem possuem poucas informações a respeito da localização dessa importante classe de DNAr, como é o caso da família Doradidae, onde em apenas seis espécies os sítios de DNAr 5S foi mapeado (Presente estudo-Capítulo 1; Garcia 2005) . Ao que tudo indica, a presença de sítios simples terminais no braço curto de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos parece ser o padrão ancestral de Doradidae, incluindo *P. granulatus* também já foi reportada em Auchenipteridae assim como em clados basais de Doradidae como é o caso de *F. marmoratus* (Garcia 2005; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010; Lui et al. 2013a; Lui et al. 2013b)

A maioria dos exemplares de *P. granulatus* coletados no rio Miranda exibiu o mesmo padrão de DNAr 5S observado nas demais populações analisadas (sítios terminais no braço curto do par 14/15). Contudo duas fêmeas apresentaram um arranjo diferenciado, que se caracterizou pela presença de um sítio terminal no braço curto e outro sítio intersticial próximo ao centrômero. Essa configuração heteromórfica teve sua origem a partir de inversões paracêntricas ou transposição, pois não envolveu a região centromérica e o cromossomo portador não sofreu alterações em sua morfologia. Esse tipo de rearranjo cromossômico pode interferir no processo de expressão genica por alterar a estrutura de genes ou inibindo sua atividade transcricional devido ao efeito de posição (Kasahara 2009; Snustad 2013).



Nenhum exemplar dessa população apresentou os dois cromossomos do par 14 com DNAr 5S intersticiais (homomórfica rara). A ausência desse arranjo reforça que a ocorrência da inversão paracêntrica tenha inibido a expressão de genes de importância biológica situados no segmento invertido (efeito de posição), tornando essa configuração homomórfica deletéria para seus portadores. No entanto é necessário analisar um maior número de exemplares dessa localidade, para verificar com mais consistência se esse tipo de arranjo realmente não é biologicamente viável.

As populações de *Pterodoras granulosus*, exibiram um cariótipo heterogêneo, onde embora o  $2n= 58$  cromossomos tenha sido conservado, divergências microestruturais foram observadas, possibilitando definir marcadores cromossômicos interpopulacionais (**Fig.6**). Esse padrão evolutivo, onde a diversificação cromossômica promove poucas alterações macroestruturais, é comumente descrito para peixes migratórios como é o caso de *Pterodoras granulosus*. Tais evidências, também sugerem que a dispersão dessa espécie pelas bacias hidrográficas sul-americanas cis-Andinas ocorreu recentemente. Assim, foi possível agrupar as populações da bacia Platina e definir os exemplares da bacia Amazônica como o grupo mais divergente, portador de mais regiões heterocromáticas e fórmula cariotípica distinta, indicando um processo inicial de especiação favorecido pelo distanciamento geográfico.



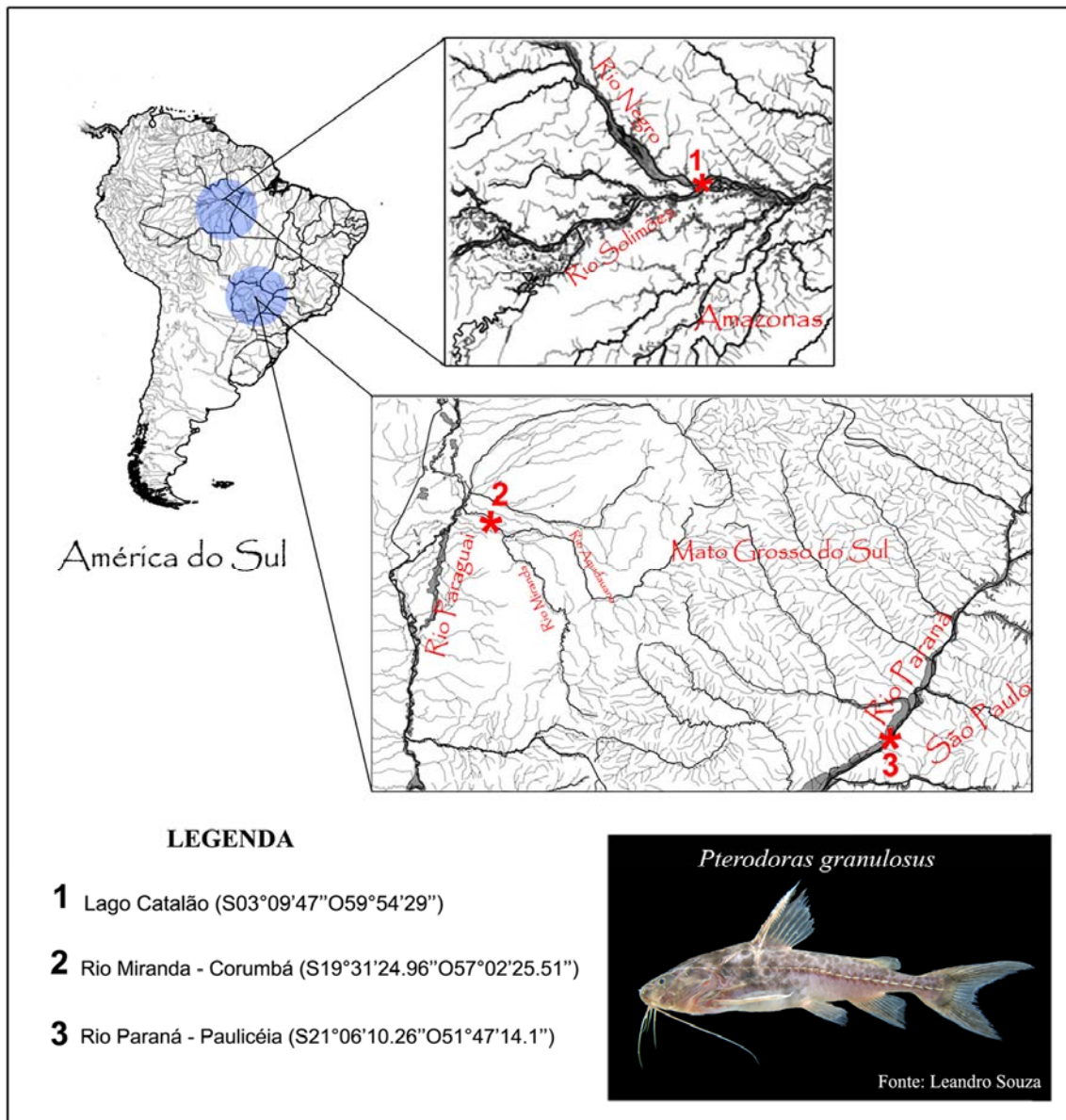


**TABELA 1** – Tamanho amostral separado de acordo com a localidade onde foram capturados os exemplares de *Pterodoras granulosus* analisados no presente estudo. **M**= machos; **F**= fêmeas; **SNI**= sexo não identificado; **T**= total; **S**= Sul; **O**= Oeste

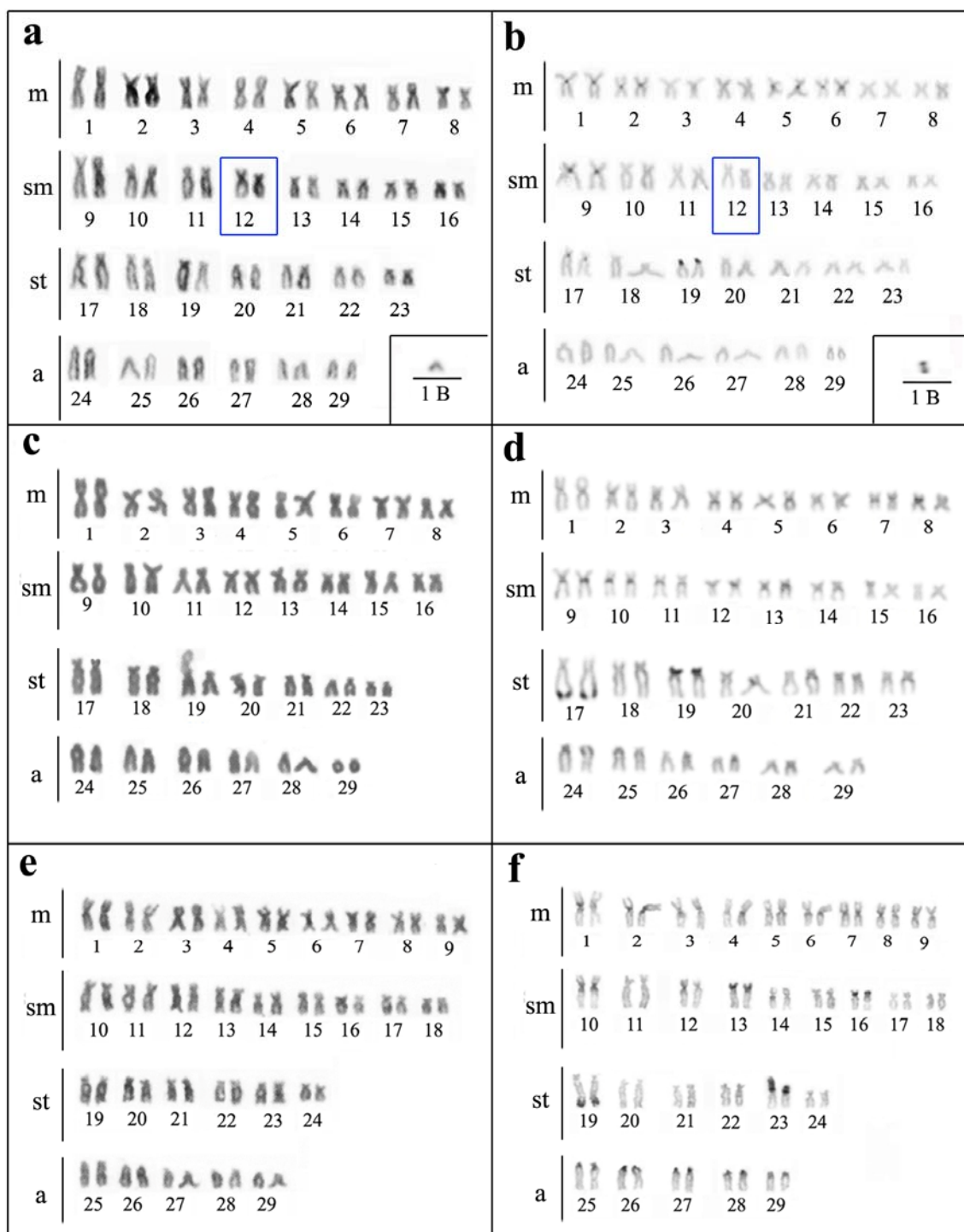
LOCAIS DE COLETA	COORDENADAS	N° EXEMPLARES			
		M	F	SNI	T
Rio Paraná – Paulicéia, São Paulo.	S 21°06'10.26" O 51°47'14.01"	4	8	2	<b>14</b>
Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.	S 19°31'24.9" O 57°02'25.5"	1	3	3	<b>7</b>
Lago Catalão – Manaus, Amazonas.	S 03°09'47" O 59°54'29"	0	2	3	<b>5</b>
					<b>26</b>

**TABELA 2** – Frequência do microcromossomo supranumerário observado em alguns exemplares de *Pterodoras granulosus* provenientes do rio Paraná.

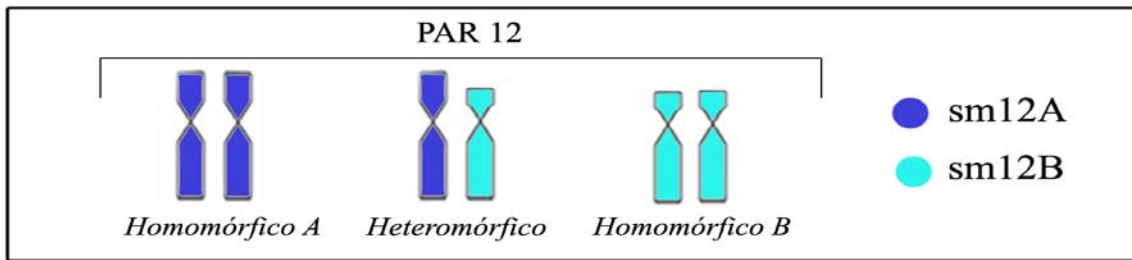
EXEMPLARES	METÁFASES SEM B	METÁFASES COM B	FREQUÊNCIA
601 (fêmea)	16	2	<b>12.5%</b>
602 (fêmea)	15	3	<b>20%</b>
603 (macho)	54	9	<b>16.6%</b>
604 (fêmea)	63	15	<b>23.8%</b>
617 (macho)	32	4	<b>12.5%</b>
631 (macho)	35	6	<b>17.1%</b>
<b>6 exemplares</b>	<b>215</b>	<b>39</b>	<b>18.14%</b>



**FIGURA 1** – Mapa indicando os locais onde foram coletados os exemplares de *Pterodoras granulosus*. **(1)** Rio Miranda, afluente do rio Paraguai; **(2)** Rio Paraná- canal principal (porção Alta); **(3)** Lago Catalão, sistema hidrográfico do rio Amazonas.



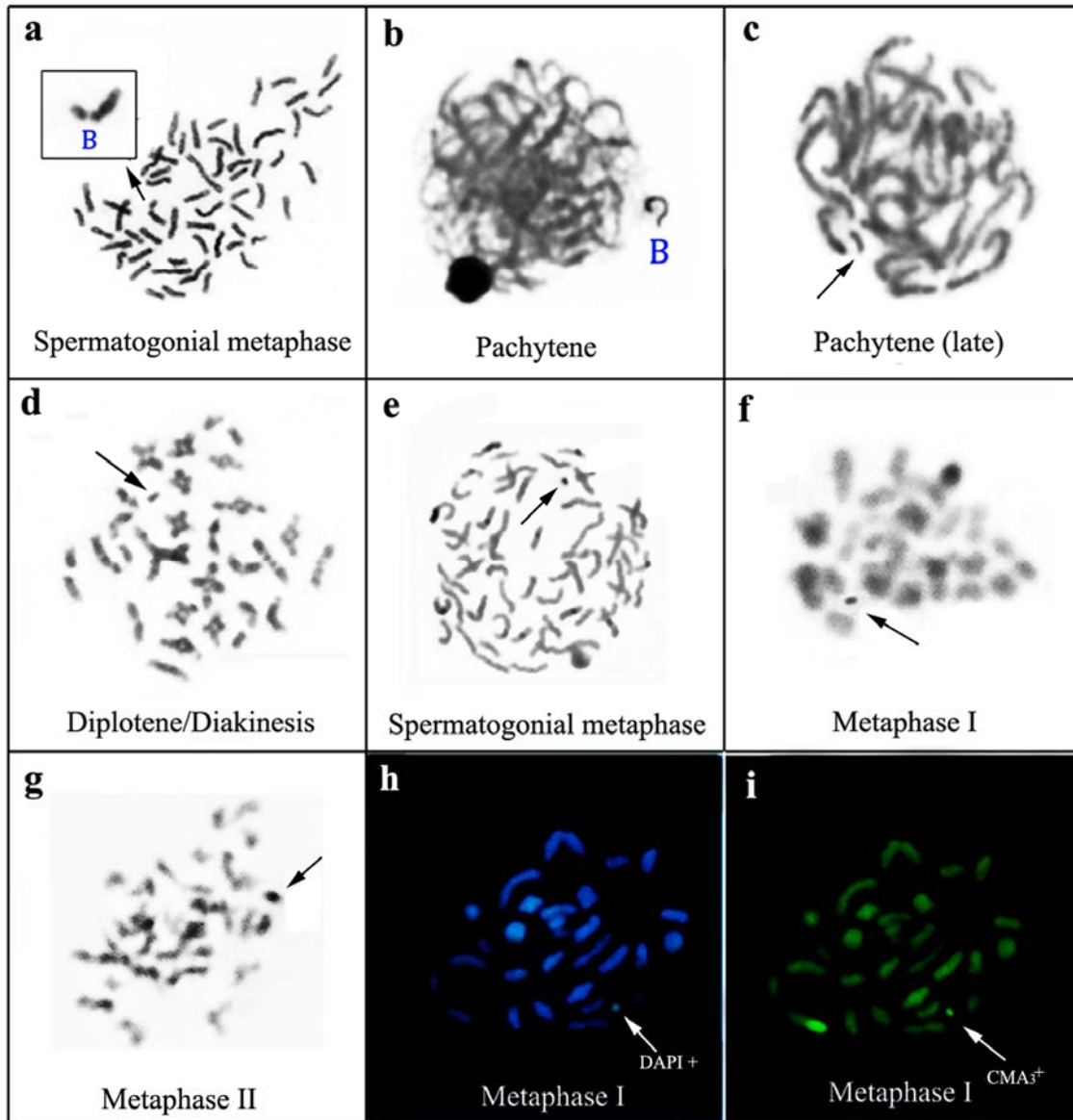
**FIGURA 2** – Cariótipos após coloração convencional e bandamento C: **Rio Paraná (a)** coloração convencional e **(b)** banda C; **Rio Miranda (c)** coloração convencional e **(d)** banda C; **Lago Catalão (e)** coloração convencional e **(f)** banda C. Os boxes azuis evidenciam o heteromorfismo de tamanho no braço curto observado em alguns exemplares de *P. granulosus* coletados na calha principal do rio Paraná.



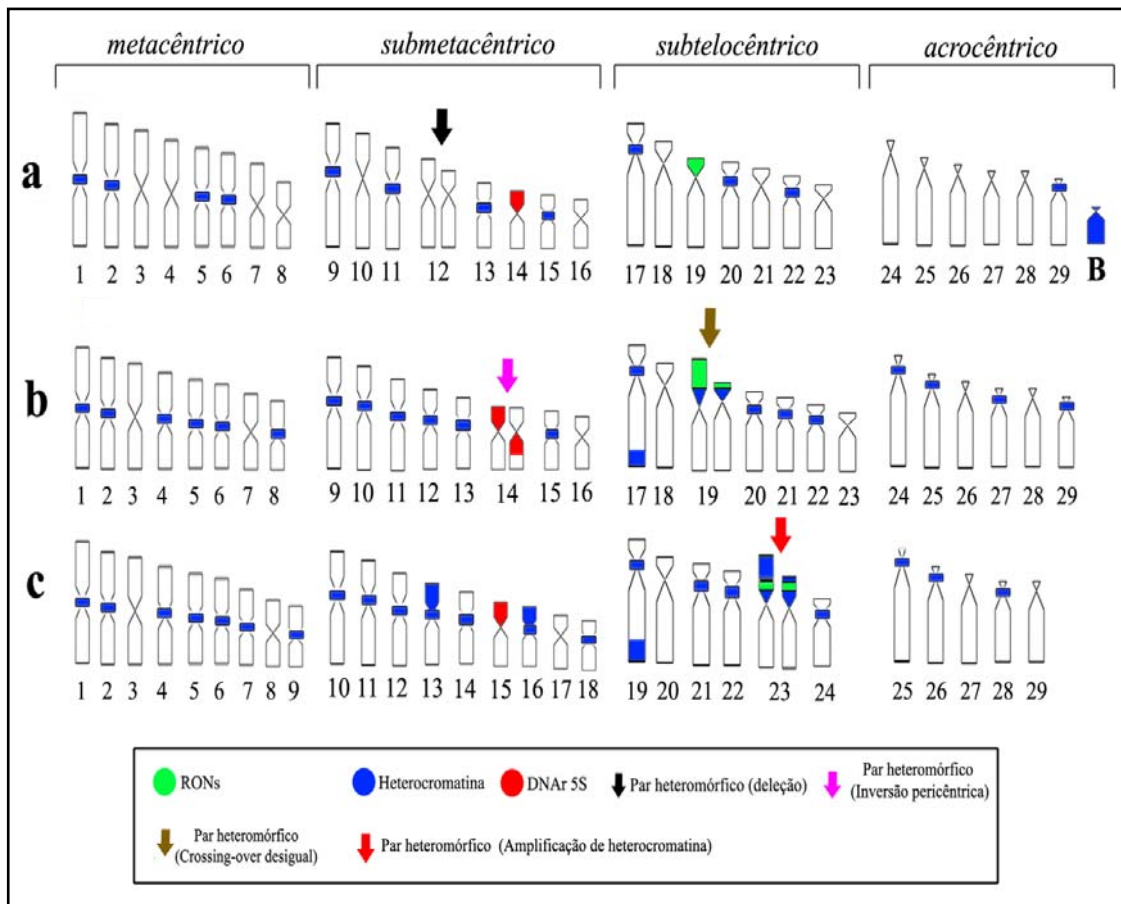
**FIGURA 3** – Ideogramas representando as possíveis configurações para o par 12 nos exemplares do Alto rio Paraná. **Sm12A**= cromossomo submetacêntrico 12 forma A; **Sm12B**= cromossomo submetacêntrico forma B.

Localidade	Ag-RONs	FISH DNAr 18S	FISH DNAr 5S						
Rio Paraná Bacia hidrográfica Alto Paraná	 19	 19	 13						
Rio Miranda Bacia hidrográfica do rio Paraguai	 19	 19	<table border="1"> <tr> <td>Normal</td> <td>Raro</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">13</td> </tr> </table>	Normal	Raro			13	
Normal	Raro								
13									
Lago Catalão Bacia hidrográfica Amazônica	 23	 23	 14						

**FIGURA 4-** Mapeamento físico via impregnação por nitrato de prata e FISH dos sítios de RONS (DNAr 18S) e DNAr 5s nas diferentes populações de *Pterodoras granulosus*.



**FIGURA 5-** Características estruturais e comportamento meiótico dos cromossomos supranumerários observados em alguns indivíduos de *Pterodoras granulosus* do rio Paraná, submetidos a: Coloração convencional (a), (b), (c), (d); Bandamento C (e), (f), (g); Dupla coloração como fluorocromos base específicos DAPI (h) e CMA<sub>3</sub> (i).



**FIGURA 6** – Ideogramas representando a localização dos diferentes marcadores cromossômicos utilizados no presente estudo para caracterização da variabilidade interpopulacional de *Pterodoras granulosus*. **a) Alto rio Paraná**, com destaque para o heteromorfismo de tamanho originado por deleção no braço curto de um dos cromossomos do par 12 e também para o microcromossomo B observado em alguns exemplares; **b) Rio Miranda**, destacando a ocorrência de inversão pericêntrica em um dos cromossomos do par 14 portador do DNAr 5S (padrão raro) e o heteromorfismo de tamanho no par 19 observado somente nas RONS; **c) Lago Catalão**, apresentou maior quantidade de heterocromatina, fórmula cariotípica diferenciada e heteromorfismo de tamanho no par 23 atribuído á amplificação das regiões heterocromáticas.



## Referências Bibliográficas

Agostinho CS, Marques EE, Oliveira RJ, Braz OS (2009) Feeding ecology of *Pterodoras granulosus* (Siluriformes, Doradidae) in the Lajeado Reservoir, Tocantins, Brazil. *Inheringia, Série Zoologia*. 99: 301-306.

Arce MH, Reis ER, Geneva AJ, Sabaj PHM (2013) Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes:Doradidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 67:560-577.

Bertollo LAC, Takahashi CS, 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). *Neotropical Ichthyology*. 12(3): 451-564.

Blanco DR, Vicari MR, Artoni RF, Traldi JB, Moreira-Filho O (2012) Chromosomal Characterization of Armored Catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): First Report of B Chromosomes in the Genus. *Zoological Science*. 29 (1): 604-609.

Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome Evolution. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci*. 55: 163–178.

Catanhêde G, Hahn NS, Gubiani EA, 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.

Da Luz G, Fugi R, Abujanra F, Agostinho AA (2002) Alterations in the *Pterodoras granulosus* (Valenciennes,1821) (Osteichthyes, Doradidae) diet due to the abundance variation of a bivalve invader species in the Itaipu Reservoir, Brazil. *Acta Scientiarum*. 24: 427–432.

Darrigran G, Colautti D (1994) Potencial control biológico del molusco invasor *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) en el Rio de la Plata. *Comunicaciones de la Sociedad de Malacologia del Uruguay*. 7:368-373.



Eler ES, Dergam JA, Vênere PC, Paiva LC, Miranda GA, Oliveira 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*. 130:99-103.

Fenocchio AS, Jorge LC, Venere PC e Bertollo LAC (1993) Karyotypic characterization and nucleolous organizer regions in three species of Doradidae (Pisces, Siluriformes). *Revista Brasileira de Genetica*. 4:1097-1101.

Feitoza LA, Okada EK, Ambrosio AM (2004) Idade e crescimento do armado *Pterodoras granulosus* (Valenciennes, 1833) (Siluriformes, Doradidae) no reservatório de Itaipu, Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Scientiarum*. 26:47-53.

Ferraris CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalog primary types. *Zootaxa*.

Ferriz RA, Villar CA, Colautti D, BONETTO C (2000) Alimentacion de *Pterodoras granulosus* (Valenciennes) (Pisces, Doradidae) em la baja cuenca del Plata. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*. 2:151-156.

Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810–813.

Garcia C (2005) Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos-SP.

Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2004) Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*; 122: 239-244.

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: as 1-step method. *Experientia*. 36: 1014-1015.



Kligerman AD, Bloom SE (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 34: 266-269.

Kasahara S (2009) *Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. Ribeirão Preto, Ed. SBG – Sociedade Brasileira de Genética.

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 chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron*. 40: 552–559.

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society*. 99: 648–656. 2010.

Lui RL, Margarido VP, Moreira-Filho O (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry*. 87 (7): 433–438.

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Troy MP, Moreira-Filho O (2013a) Comparative chromosomal analysis and evolutionary considerations concerning two species of genus *Tatia* (Siluriformes, Auchenipteridae). *Comparative Cytogenetics*. 7(1): 63-71.

Lui RL, Blanco DR, Martinez JL, Margarido VP, Venere PC, Moreira-Filho O (2013b) The role of chromosomal fusion in the karyotypic evolution of the genus *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae). *Neotropical Ichthyology*. 11 (2).

Makrakis MC, Miranda LE, Makrakis S, Fernandez DR, Garcia JO, Dias JHP (2007) Movement patterns of armado, *Pterodoras granulosus*, in the Paraná River Basin. *Ecology of Freshwater Fish*. 16:410-416.



Milhomem SSR, Souza ACP, Nascimento AL, Carvalho Jr. JR, Feldberg E, Pieczarka JC, Nagamichi CY (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.

Moyer GR, Burr BM, Krajewski C (2004) Phylogenetic relationship of thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zool J. Linnean Society*. 140: 551-575.

Paixão AEM (2010) Estudos genéticos em *Kalyptodoras bahiensis*, capturada na bacia do médio e baixo Paraguaçu-BA, através de marcadores citogenéticos e moleculares. Monografia. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Paiva LRS (2012) Bandamento em cromossomos de peixes: Discussão sobre o conceito de compartimentalização cromossômica. Tese não publicada. Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Pilati R, Andrian IF, Carneiro JWP (1999) Desempenho germinativo de sementes de *Cecropia pachystachya* trece. (Cecropiaceae), recuperadas do trato digestório de Doradidae, *Pterodoras granulosus* (Valenciennes, 1883), da planície de inundação do Alto Paraná. *Interciencia*. 24:47-55.

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 83: 2934-2938.

Snustad DP, Simmons MJ (2013) *Fundamentos de Genética*. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan.

Schweizer D, Loidl J (1978) A model for heterocromatin dispersion and the evolution of C-banding patterns. *Chromosome Today*. 9: 61-74.

Stevaux MCS, Negrelle RRB, Citadini-Zanette V (1994) Seed dispersal by fish *Pterodoras granulosus* in the Paraná River Basin, Brazil. *Journal of Tropical Ecology*. 10:621-626.



Sumner AMT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.

Swarca AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL (2009) Localization and characterization of the 5S rDNA bearing chromosome in two *Steindachneridion* species by means of different cytogenetic techniques. *Cytologia.* 74:323–327.

Vicari MR, Pistune HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2011) New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica.* 139: 1073–1081.

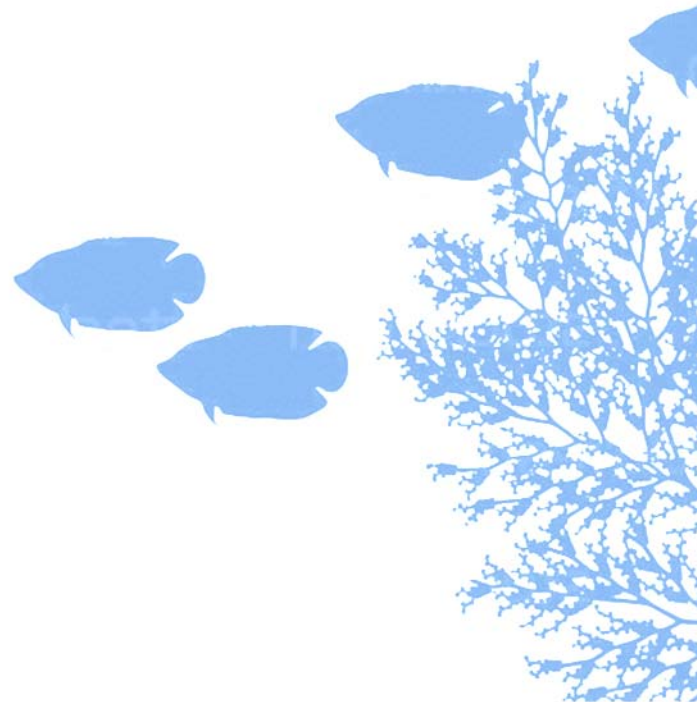
Zawadzki CH, Pavanelli CS, Ferreira H (1996). Caracterização morfológica e distribuição das espécies da família Doradidae (Pisces: Siluriformes) no Alto e Médio Paraná: registros e comentários. *Arquivos Biológicos e Tecnológicos.* 39 (2): 409–417.

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos á Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Biologia Geral, por disponibilizar toda estrutura laboratorial para realização desse trabalho. Aos amigos Jorge Shiki, Minoru Ikezaki e Lucia Shiki pelo auxílio em algumas coletas de campo. Á CAPES pelo suporte financeiro e ao ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), por permitir a coleta do material biológico.



“Polimorfismo de RONS e cromossomos supranumerários em *Platydoras armatulus* (Siluriformes-Doradidae)”.



Esse artigo será submetido á Revista **Genetica**.



**“Polimorfismo de RONS e cromossomos supranumerários em *Platydoras armatulus*  
(Siluriformes-Doradidae)”.**

---

Fábio Hiroshi Takagui; José Olivan Birindelli; Ana Claudia Swarça; Ana Lucia Dias; Alberto Sergio Fenocchio & Lucia Giuliano-Caetano.

## **Resumo**

*Platydoras armatulus* (Doradidae-Siluriformes) é uma das espécies mais valorizadas no mercado aquarofílica, sendo também facilmente encontrada em diferentes bacias hidrográficas sul-americanas. Embora seja uma espécie com ampla distribuição geográfica, nenhuma informação é conhecida acerca de sua organização cromossômica. Assim, no presente estudo foi realizada a primeira caracterização do cariótipo de *P. armatulus*, por meio de uma análise comparativa interpopulacional envolvendo exemplares provenientes das bacias dos rios Paraná e Paraguai. Os resultados obtidos, revelaram poucas divergências entre as duas populações, ambas apresentaram 58 cromossomos, mesma fórmula cariotípica, padrão de heterocromatina e DNAr 5S. Porém, a população do rio Miranda (bacia do rio Paraguai) foi considerada a mais variável por apresentar polimorfismo de RONS e microcromossomos supranumerários, cuja maior frequência foi observada em exemplares portadores de RONS múltiplas. A origem dessas duas condições pode estar relacionada com a atividade de elementos transponíveis. Para confirmar essa hipótese, estudos complementares deverão ser realizados, visando isolar, caracterizar e mapear os DNAs repetitivos dessa espécie, com intuito de verificar se existem homologias entre os componentes dos microcromossomos Bs e da heterocromatina que intercala os genes ribossômicos.

**Palavras-chave:** Thorny Catfish; Cromossomos; Variabilidade; Retroelementos.



## Introdução

*Platydoras armatulus* é um peixe que pertence a família Doradidae (Siluriformes) e encontra-se amplamente distribuído pelo continente sul americano, ocorrendo em diferentes regiões da bacia Amazônica, no rio Orinoco, Tocantins, Piauí, Parnaíba e Paraguai, sendo que sua localidade tipo é o rio Paraná (Reis et al. 2003; Ferraris 2007). Essa espécie é popularmente conhecida como reco-reco, ou bagre-rafael, possui grande valor no mercado aquarofilista, principalmente pelo fato de exibir um padrão de colorido exuberante e se adaptar facilmente às condições de cativeiro (Sabaj 2002; Piorski et al. 2008).

Curiosamente, mesmo sendo uma espécie com ampla distribuição geográfica, nenhuma informação citogenética é conhecida sobre esse peixe. No gênero *Platydoras*, existe somente a descrição cariotípica de *P. costatus* coletados no rio Xingu que foi realizado (Milhomem et al. 2008). Nesse estudo os autores relataram a ocorrência de 58 cromossomos e fórmula cariotípica  $26m + 16sm + 4st + 2a$ , regiões organizadoras de nucléolos (RONs) simples terminais. Tais condições, são características cromossômicas que predominam entre as espécies de Doradidae. Esse fato induziu durante muito tempo, vários autores a afirmar que esse grupo de peixes seguia um modelo de evolução conservativo com pouca variação cariotípica (Eler et al. 2007; Milhomem et al. 2008).

Entretanto, recentemente uma análise citogenética comparativa foi realizada em sete espécies da família Doradidae da bacia Platina e Amazônica, reportando uma acentuada variabilidade numérica (números diplóides variando desde 46 cromossomos em *Amblydoras affinis* a 66 em *Ossancora punctata*) e estrutural (diferentes padrões de heterocromatina, DNAr 18S e 5S). Além disso, a presença de cromossomos supranumerários, também foi descrita pela primeira vez em Doradidae na espécie *Ossancora punctata* (Presente estudo – Capítulo 1). Esse tipo de polimorfismo numérico é atualmente um dos temas mais investigados dentro da citogenética de peixes neotropicais. Somente na ordem Siluriformes,



de acordo com os últimos levantamentos (Carvalho et al. 2008; Lui et al. 2009; Almeida et al. 2013) existiam 61 relatos de cromossomos supranumerários, valor que certamente encontra-se subestimado.

Diante desse contexto, no presente estudo uma análise citogenética foi realizada com intuito de determinar a estrutura cariotípica de *Platydoras armatulus* provenientes de duas localidades geograficamente distantes, mas situadas numa mesma bacia hidrográfica (Bacia Platina). Com base nessas informações, pretende-se determinar se existe variabilidade entre essas duas populações e ainda investigar os mecanismos responsáveis pela origem de cromossomos supranumerários e do polimorfismo de RONS observado em alguns exemplares dessa espécie.

## Material e Métodos

Procedimentos de citogenética convencional e molecular foram utilizados para caracterizar a estrutura cromossômica de 17 exemplares de *Platydoras armatulus* provenientes das bacias hidrográficas dos rios Paraná e Paraguai (**Tabela 1, Fig.1**). A coleta do material biológico foi autorizada pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), seguindo a licença N° 11399-1. Posteriormente todos os exemplares foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL).

A obtenção dos cromossomos mitóticos foi realizada seguindo o método proposto por Bertollo et al (1978) e Foresti et al. (1993), já os cromossomos meióticos foram obtidos por meio de células testiculares de acordo com Kligerman e Bloom (1977). A montagem do cariótipo foi realizada com auxílio do programa Adobe Photoshop, e a classificação cromossômica adotada seguiu os parâmetros estabelecidos por Levan et al. (1964).



Os bandamentos cromossômicos utilizados foram: bandamento C (Sumner 1972), com modificações na etapa de coloração (iodeto de propídeo) segundo Lui et al. (2012); impregnação por nitrato de prata (Howell e Black 1980), e a coloração com os fluorocromos base-específicos Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4'6 diamino-2-fenilindole (DAPI) (Schweizer 1980). Para realizar o mapeamento físico dos sítios de DNAr em *P. armatulus*, a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi aplicada seguindo o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), utilizando as sondas de DNAr 18S isolada de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti 2004) e de DNAr 5S obtida via C0t-1, a partir do genoma de *Imparfinnis shubartti* (Gouveia 2014 em preparação).

Adicionalmente, o teste estatístico não paramétrico  $\chi^2$  (Qui quadrado), foi realizado de acordo com Gomes (1987), com intuito de testar as seguintes hipóteses:

**H<sub>0</sub>**= Não existe variação significativa na frequência de microcromossomos B entre exemplares portadores de RONS simples e múltiplas.

**H<sub>1</sub>**= Existe variação significativa na frequência de microcromossomos B entre exemplares portadores de RONS simples e múltiplas.

## Resultados

Os espécimes analisados apresentaram 58 cromossomos e fórmula cariotípica 22m + 22sm + 10st + 4a (**Fig. 2a**). Em relação ao padrão de bandamento C, foi observada heterocromatina na maioria das regiões pericentroméricas, assim como em regiões terminais no braço curto dos pares 5, 15, 17, 19, 20, 22, 23 e 25; no braço longo do par 4 e em ambas as extremidades do pares 3 e 14. Regiões heterocromáticas intersticiais também foram detectadas no braço longo dos pares 13 e 26 (**Fig. 2b**).



A impregnação com nitrato de prata revelou em todos os indivíduos do rio Paraná e na maioria dos exemplares coletados no rio Miranda, apenas dois sítios de RONS terminais no braço curto do par 17 (**Fig. 3a**). Contudo, três indivíduos do rio Miranda, além de apresentarem os sítios observados no par 17, exibiram uma marcação adicional no braço curto de apenas um cromossomo do par subtelocêntrico 23, evidenciando, portanto um sistema de RONS múltiplas, até então nunca descrito para a família Doradidae (**Fig.3b**).

A FISH com sondas de DNAr 18S confirmou o padrão de RONS simples nos exemplares do rio Paraná e na maioria dos indivíduos do rio Miranda (**Fig. 3c**), assim como o sistema múltiplo, confirmando portanto a existência de um polimorfismo de RONS nessa população (**Fig. 3d**). Em relação ao padrão de distribuição dos genes de DNAr 5S, a hibridação *in situ* revelou a existência de quatro sítios posicionados em regiões terminais no braço curto de cromossomos submetacêntricos medianos (par 18) e no braço curto do par acrocêntrico 29 em ambas as populações (**Fig. 3e, Fig.3f**).

Uma característica peculiar observada em sete espécimes coletados no rio Miranda foi a ocorrência de até três microcromossomos supranumerários puntiformes e totalmente heterocromáticos (**Fig. 2a; Fig.2b**). Análises meióticas foram realizadas em dois indivíduos do sexo masculino, revelando a ocorrência de poucas fases (**Fig. 5**), mas que foram suficientes para verificar a presença dos cromossomos B em metáfase espermatogonial (com 58 cromossomos e dois cromossomos Bs) (**Fig. 5a**); paquíteno inicial (menos condensado) (**Fig. 5b**) e final (condensação maior) (**Fig. 5d**), e diplóteno/diacinese com 29 bivalentes e alguns quiasmas (**Fig. 5c**).

O bandamento C em células meióticas confirmou o padrão observado nos cromossomos mitóticos, revelando heterocromatina pericentromérica, associada às RONS e nas extremidades de alguns bivalentes, sendo possível observar o cromossomo B nas seguintes fases: paquíteno tardio (**Fig. 5d**) e metáfase I (**Fig. 5e**). A coloração com os



fluorocromos evidenciou, em paquíteno inicial, muitos blocos terminais GC ricos e alguns poucos intersticiais que provavelmente correspondem aos centrômeros (**Fig. 5 f,g**). Na metáfase I (**Fig. 5 h, i**), esse mesmo padrão foi observado incluindo um cromossomo B com marcações positivas para a cromomicina A<sub>3</sub> (GC rico).

Os exemplares portadores de RONS múltiplas apresentaram as frequências mais elevadas de microcromossomos Bs por célula, do que indivíduos com apenas um par de RONS (**Fig. 4**). Tal variação entre as frequências esperadas e observadas foi considerada estatisticamente significativa sendo igual à  $X^2=10,899$ . Desse modo, rejeitou-se H<sub>0</sub> e aceitou-se H<sub>1</sub>, confirmando então que existe variação significativa na frequência de microcromossomos B entre exemplares portadores de RONS simples e múltiplas.

## Discussão

As duas populações de *Platydoras armatulus* apresentaram 58 cromossomos e cariótipo constituído majoritariamente por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Esse padrão macroestrutural, ao que tudo indica é uma característica ancestral dentre os membros de Doradidae, estando presente tanto em clados basais (*Wertheimeria maculata*, *Franciscodoras marmoratus* e *Kalyptodoras bahiensis*) (Garcia 2005; Eler et al. 2007; Paixão 2010), quanto em grupos filogeneticamente derivados (*Trachydoras paraguayensis*, *Hassar wilderi*, *Hassar orestis* entre outros) (Fenocchio et al., 1993; Venere 1998; Eler et al. 2007; Milhomem et al. 2008; presente estudo). Essas características também foram descritas para espécies da família Auchenipteridae (Lui et al. 2009; 2010; 2013a; 2013b), que segundo análises morfológicas e moleculares é o grupo irmão de Doradidae (Arce et al. 2013; Birindelli et al., 2014)

A dispersão das regiões heterocromáticas, assim como o número diplóide e



fórmula cariotípica foram similares entre as duas populações. Entre os Doradidae existem diferentes padrões de heterocromatina, sendo que o arranjo descrito para *P. armatulus* estaria incluído no grupo 2. Esse padrão também é uma característica marcante dos clados basais de Doradidae, no caso a tribo Wertheimerinae (Eler et al. 2007), o clado *Incertae Sedis Franciscodoras marmoratus* (Garcia 2005), assim como para a subfamília Astrodoradinae (Presente estudo – Capítulo 1). Além disso, incluindo *P. armatulus*, todas essas espécies possuem pelo menos um par metacêntrico com heterocromatina biterminais. Esses cromossomos marcadores juntamente com a similaridade observada na quantidade e disposição dos blocos de heterocromatina, corroboram o posicionamento filogenético de *P. armatulus*, visto que essa espécie constitui, juntamente com o gênero *Centrochir* o clado mais basal de Doradinae (Birindelli 2014), sendo, portanto mais relacionado às subfamílias Wertheimerinae e Astrodoradinae.

A presença de RONS simples terminais juntamente com o  $2n=58$  e a predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos no cariótipo são características marcantes da família Doradidae. Todos os exemplares de *P. armatulus* coletados no rio Paraná possuem RONS simples terminais em cromossomos submetacêntricos, assim como a maioria daqueles provenientes do rio Miranda. Contudo, três indivíduos exibiram um sistema de RONS múltiplas, com um sítio adicional no braço curto de um dos cromossomos 23, além do par 17. Esses espécimes portadores de três sítios de DNAr 18S constituem o primeiro relato de um sistema de RONS múltiplas na família Doradidae e juntamente com *Trachydoras paraguayensis* (Fenocchio et al. 1993) e *Hassar gabiru* (Milhomem et al. 2008) são as únicas exceções ao padrão de RONS considerado ancestral nesse grupo de peixes (Auchenipteridae + Doradidae) (Fenocchio et al. 1993; Venere 1998; Garcia 2005; Eler et al. 2007; Milhomem et al. 2008; Lui et al. 2010; Paiva 2012; Lui et al. 2013a; Lui et al. 2013b; presente estudo).



Polimorfismos de RONS têm sido constantemente descritos em diferentes grupos de Siluriformes neotropicais, sendo que a maioria deles ocorre á nível intrapopulacional. Essa variação resulta na coexistência de diferentes citótipos, caracterizados tanto por divergências numéricas (simples ou múltiplas) (Errero-Porto et al. 2014a; Errero-Porto et al. 2014b), assim como por alterações na disposição desses sítios (Mariotto et al. 2009). A origem desses polimorfismos é extremamente heterogênea podendo estar relacionada com diferentes tipos de rearranjos cromossômicos (inversões e translocações), variações na atividade transcricional (expressão gênica) ou devido à associação de elementos transponíveis com ás RONS (Santi-Rampazzo et al. 2008; Mariotto et al. 2009; Errero-Porto et al. 2014a; Errero-Porto et al. 2014b ).

No caso de *P. armatulus*, o sistema de RONS múltiplas aparentemente é uma característica derivada e com baixa incidência na população do rio Miranda. Provavelmente, esse é um evento recente cuja origem tem relação direta com a atividade saltatória de elementos transponíveis. De acordo com Dimitri e Junakovic (1999), os DNA repetitivos, como é o caso dos transposons, estão frequentemente localizados em regiões de heterocromatina pericentromérica e terminal. Os exemplares de *P. armatulus* apresentaram blocos heterocromáticos flanqueando as regiões organizadoras de nucléolo no par 17. Desse modo, a provável origem do sistema de RONS múltiplas observado nessa espécie seria a partir da dispersão dos transposons associados a essas regiões enviando cópias de DNAr 45S do par 17 para a região terminal do braço curto de apenas um dos cromossomos submetacêntricos do par 23.

A atividade saltatória de elementos transponíveis explica a origem de polimorfismos de RONS intra-populacionais em diferentes grupos de peixes, como é o caso do pequeno caracídeo *Serrapinnus notomelas* (Santi-Rampazzo et al. 2008) e também dos cascudinhos-chinelo *Rineloricaria lanceolata* (Errero-Porto et al. 2014b) e *Loricaria*



*cataprhacta* (Errero-Porto et al. 2014a). Em nenhuma dessas espécies, porém, foi comprovada de fato a existência de elementos transponíveis associados às RONS. No entanto, com o crescente aprimoramento das técnicas de citogenética molecular, tais componentes genômicos têm sido identificados em diferentes grupos de peixes, atuando principalmente na regulação gênica e também promovendo variabilidade cariotípica através do envolvimento em rearranjos cromossômicos (Kidwell 2002; Polavarapu et al. 2008).

Em peixes da ordem Siluriformes, os elementos transponíveis mais bem estudados e que exercem importante papel na evolução estrutural e funcional dos genomas são os *Rex* (retroelementos não-LTRs, cuja primeira identificação ocorreu em *Xiphophorus*). Esses elementos *Rex* encontram-se dispersos preferencialmente em regiões heterocromáticas (terminais e centroméricas), incluindo aquelas associadas às RONS, como já descrito em: *Paratocinclus maculicaudas*, *Pseudotocinclus tietensis* e *Hisonotus leucofrenatus* (Ferreira et al. 2011), em sete espécies de *Harttia* (Blanco 2012), no siluriforme estuarino *Genidens genidens* (família Ariidae) e nos bagres de grande porte (Pimelodidae) *Sorubim lima*, *Pimelodus britskii*, *Steindachneridion melanodermatum* e *Steindachneridion parahybae* (Sczepanski 2012).

Contrastando com a variabilidade observada no padrão de RONS, o DNAr 5S revelou um arranjo mais conservado do ponto de vista intra e interpopulacional. A maioria das espécies de Doradidae exibiram sítios de DNAr 5S situados terminalmente no braço curto de apenas um par cromossômico submetacêntrico (Garcia 2005; Takagui 2014). As exceções a esse padrão seriam *Trachydoras paraguayensis* que possui quatro sítios terminais (braço curto e longo) localizados num mesmo par cromossômico (Takagui 2014) e *Platydoras armatulus* que exibiu um padrão múltiplo de DNAr 5S distribuídos em dois pares submetacêntricos, sendo este um arranjo que provavelmente é uma condição derivada nessa família, mas que



precisa ser confirmada realizando o mapeamento dessa sequências em um numero maior de espécies.

Os cromossomos supranumerários observados em alguns exemplares de *P. armatulus* coletados no rio Miranda constituem o terceiro relato desse tipo de polimorfismo numérico em Doradidae (Presente estudo – Capítulos 1 e 2). Analisando a Tabela 2, dentre os 20 exemplares de *P. armatulus*, apenas em sete os cromossomos Bs foram observados, numa frequência que variou desde 19.4% até 63.04%. Essa variação na frequência dos cromossomos Bs, é segundo Jones e Ress (1982), uma característica marcante desses elementos adicionais e geralmente intrínseca de cada espécie ou população onde ocorre.

Além disso, entre os exemplares portadores de cromossomos supranumerários, também ocorreu uma diferença na quantidade desses elementos adicionais por célula, sendo que a maioria dos indivíduos exibiu somente 1 cromossomo B (**Tabela 2**). Tal condição já foi reportada para aproximadamente 40% das espécies de peixes neotropicais onde esse polimorfismo numérico ocorre (Carvalho et al. 2008; Lui et al. 2009; Almeida et al. 2013). O caso mais extremo foi relatado por Erdtmann et al. (1990) em exemplares de *Callichthys callichthys* que exibiram até 16 cromossomos B por célula.

Para explicar essa variação na frequência de cromossomos supranumerários, Camacho et al. (2000), propôs que existe um número máximo que uma população pode suportar, e esse valor é resultante do balanço entre o sistema de acúmulo com os efeitos prejudiciais que esses cromossomos eventualmente podem desencadear aos seus portadores. Nesse sentido, pode-se admitir que exista uma acentuada heterogeneidade em relação às possíveis origens ou fatores que exercem influência no sistema acumulativo de Bs. Complementando essa discussão acerca dos fatores ambientais e seu papel controlador na frequência e, portanto dinâmica evolutiva de cromossomos Bs, Jones e Rees (1982) postulam que a variabilidade na quantidade de cromossomos Bs geralmente ocorre em função da



interação de vários fatores e não somente a uma condição ambiental.

Sob essa perspectiva, analisando a frequência observada nos exemplares do rio Miranda, nota-se que nos indivíduos portadores de RONS múltiplas, ocorreu um aumento tanto na taxa de frequência quanto na quantidade de microcromossomos Bs por célula (**Tabela 2**). Essa correlação pode ser um indicativo de que os mesmos fatores ambientais que desencadearam a atividade saltatória dos elementos móveis responsáveis pelo deslocamento de sítios de RONS para um dos cromossomos 23, também exercem uma influência na manutenção dos cromossomos supranumerários, que por serem totalmente heterocromáticos podem apresentar em sua constituição as mesmas famílias de elementos transponíveis que estão associadas às RONS.

A origem dos cromossomos supranumerários ainda não é claramente conhecida, entretanto a maioria dos autores acredita na hipótese de que esses segmentos adicionais surgiram a partir de elementos constituintes do complemento padrão (Camacho et al. 2000; Lui et al. 2009; Blanco et al. 2012; entre outros). Em *Platydoras armatulus*, os mecanismos responsáveis pela diversificação cariotípica dessa espécie, podem ter contribuído para o surgimento e manutenção desses cromossomos Bs na população do rio Miranda, como produtos secundários de rearranjos cromossômicos estruturais ou numéricos. Esses pequenos segmentos, posteriormente seguiram uma evolução cariotípica independente, sofrendo modificações em sua estrutura (como o acúmulo de sequências de DNA repetitivo), que contribuíram significativamente para diminuir sua similaridade com o complemento A, tornando-se definitivamente elementos adicionais, com pouca ou nenhuma homologia em relação aos cromossomos do cariótipo padrão, segregação meiótica não mendeliana e acentuada variação na frequência, sendo mais elevada nos indivíduos portadores de RONS múltiplas.



A presença de cromossomos supranumerários, assim como ocorrência de RONS múltiplas são características nunca antes descritas na família Doradidae, e que aparentemente são condições derivadas e originadas a partir de eventos independentes. Contudo, o teste de qui-quadrado ( $X^2$ ), apontou que existe variação significativa na frequência de microcromossomos B entre exemplares portadores de RONS simples e múltiplas. Tal hipótese, embora tenha suporte estatístico ainda não foi compreendida totalmente, mas sua ocorrência provavelmente deve ser consequência da interação entre determinados componentes genômicos (DNA repetitivo) dessas estruturas com algum fator químico ou físico intrínseco do ambiente onde seus portadores ocorrem.

Por fim, o presente estudo além de fornecer as primeiras informações acerca da organização cariotípica de *Platydoras armatulus*, também revelou a existência de pouca variação entre duas populações dessa espécie coletadas em importantes drenagens da bacia Platina. Ainda descreveu a ocorrência de um polimorfismo de RONS intrapopulacional, cuja relação com a origem e manutenção de cromossomos supranumerários deverá ser investigada, utilizando diferentes metodologias que possibilitem isolar, caracterizar e mapear as famílias de DNA repetitivos presentes no genoma dessa espécie. Assim, espera-se saber se existe similaridade composicional, e se essa condição realmente exerce um papel importante na dinâmica evolutiva dos cromossomos B.

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos a Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Biologia Geral, por disponibilizar toda estrutura laboratorial para realização desse trabalho. À Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, por autorizar a utilização de sua base de pesquisa às margens do rio Miranda. Aos amigos



Nathalia Bortolazzi Venturelli, Edson, Cido, Robson e especialmente ao Sr. Geraldo pelo auxílio nas coletas de campo. A aluna de Iniciação Científica Junior, Beatriz Ocanha, por auxiliar nas etapas iniciais de caracterização citogenética dessa espécie. A CAPES pelo suporte financeiro e ao ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), por permitir a coleta do material biológico.

ANEXOS

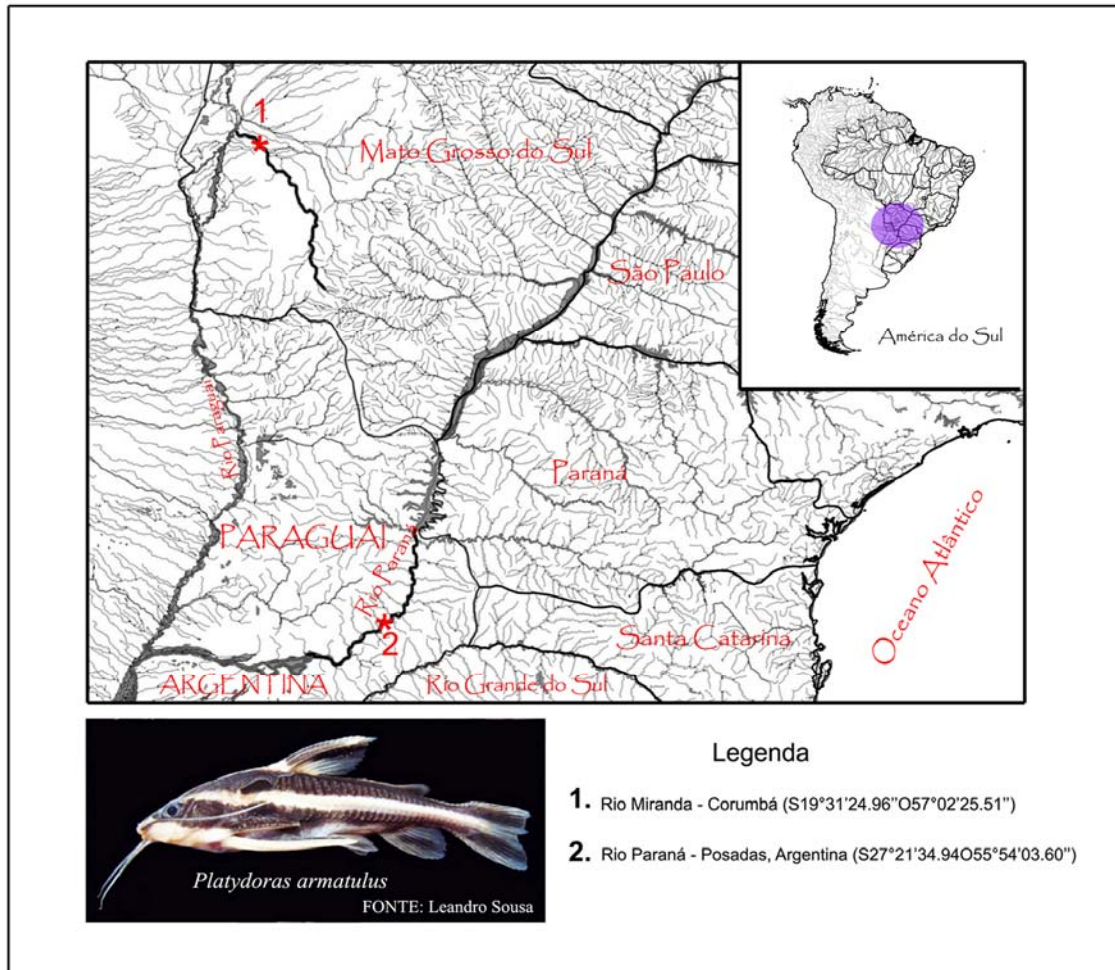


**TABELA 1** – Tamanho amostral separado de acordo com a localidade onde foram capturados os exemplares de *Platydoras armatulus* analisados no presente estudo. **M**= machos; **F**= fêmeas; **SNI**= sexo não identificado; **T**= total; **S**= Sul; **O**= Oeste.

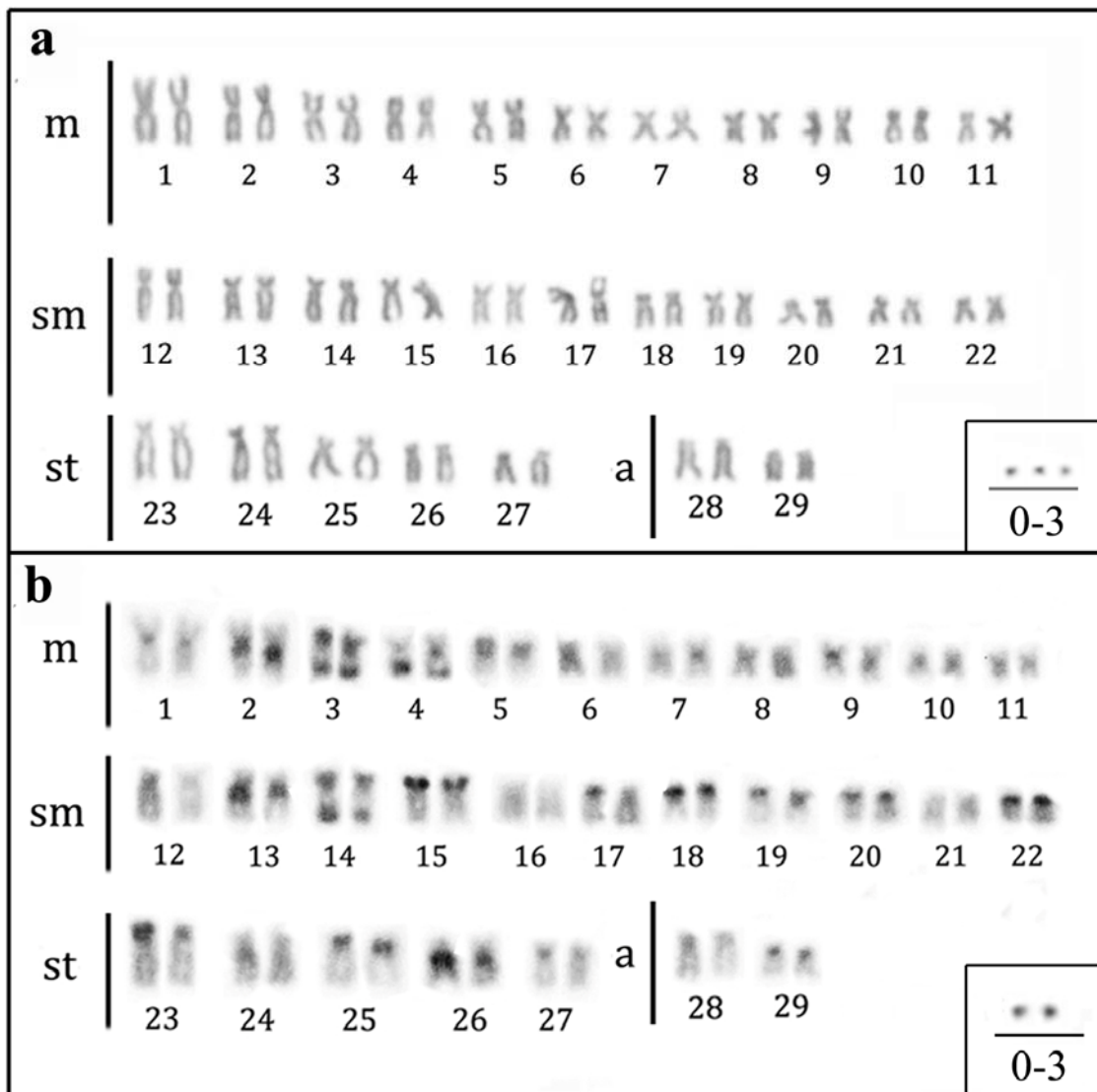
LOCAIS DE COLETA	COORDENADAS		Nº EXEMPLARES			
			M	F	SNI	T
Rio Miranda – Corumbá, Mato Grosso do Sul.	S 19°31'24.9"	O 57°02'25.5"	3	2	8	<b>13</b>
Rio Paraná – Posadas, Misiones, Argentina	S 19°31'24.9"	O 57°02'25.5"			4	<b>4</b>
						<b>20</b>

**TABELA 2** – Frequência dos cromossomos supranumerários em exemplares de *Platydoras armatulus* provenientes do rio Miranda-Corumbá (bacia hidrográfica do rio Paraguai).

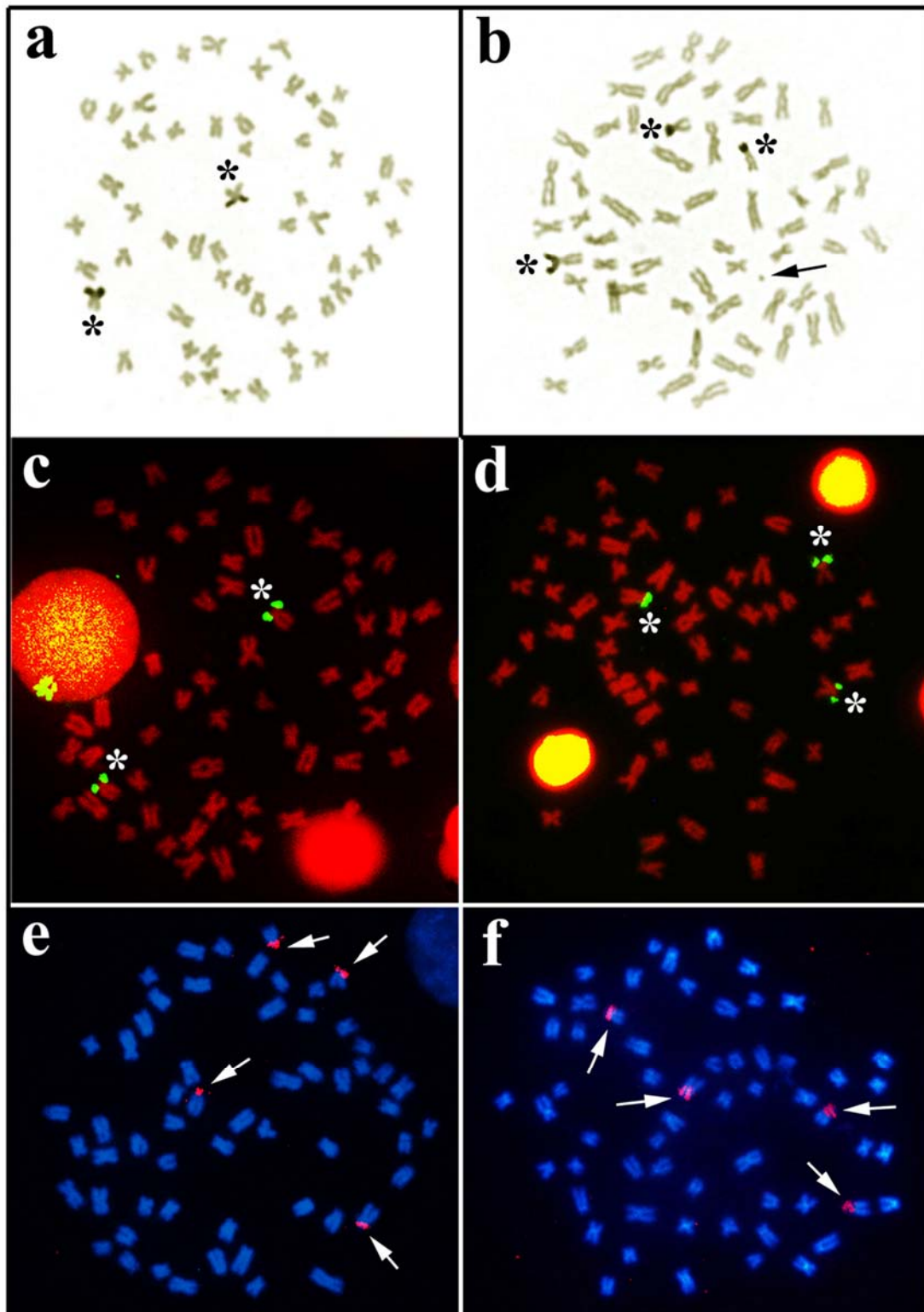
Exemplares	Sexo	Nº de cromossomos B por célula				Total de células analisadas	Frequência de células com B (%)	Padrão de RONs
		0	1	2	3			
		<b>4156</b>	♂	17	6			
<b>4157</b>	♀	29	4	3	*	<b>36</b>	<b>19.4%</b>	<b>Simple</b>
<b>4158</b>	♂	33	6	3	2	<b>43</b>	<b>23.25%</b>	<b>Simple</b>
<b>4159</b>	♀	14	4	2	1	<b>21</b>	<b>33.33%</b>	<b>Simple</b>
<b>4160</b>	♂	16	8	12	6	<b>42</b>	<b>61.90%</b>	<b>Múltiplo</b>
<b>4161</b>	♂	17	7	17	5	<b>46</b>	<b>63.04%</b>	<b>Múltiplo</b>
<b>5032</b>	♂	22	4	1	*	<b>27</b>	<b>18.51%</b>	<b>Simple</b>



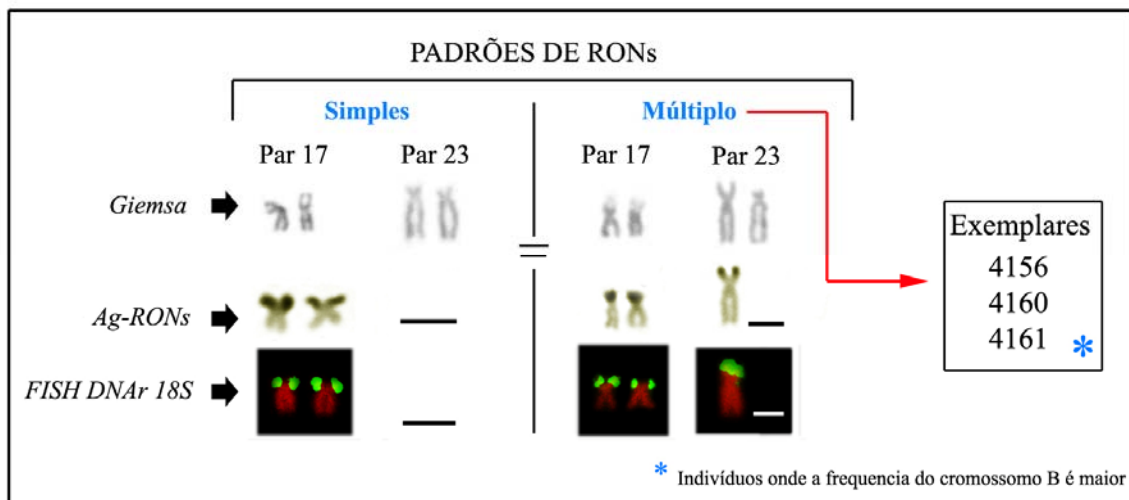
**FIGURA 1** – Mapa indicando os locais onde foram coletados os exemplares de *Platydoras armatulus*.



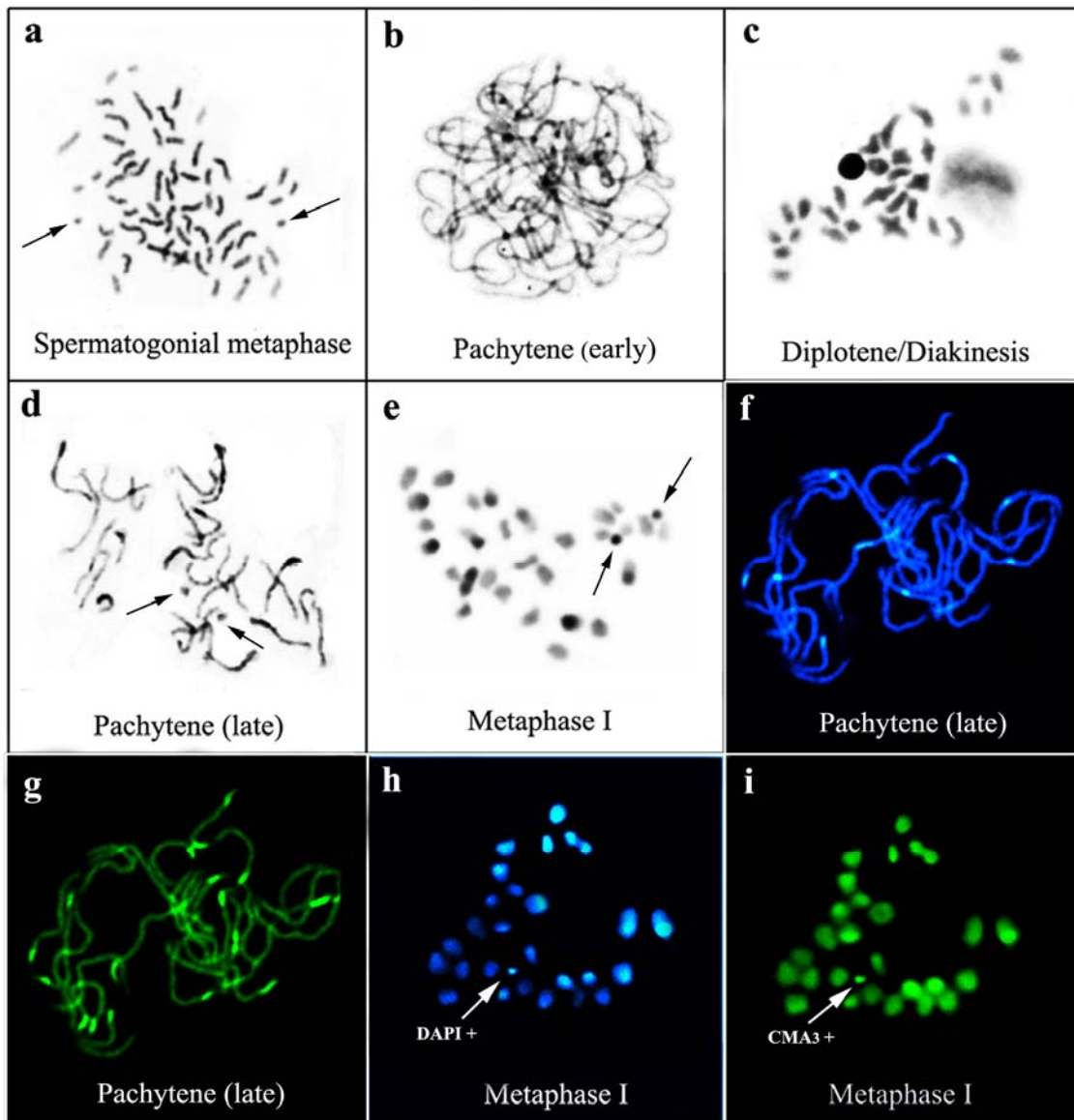
**FIGURA 2** – Cromossomos mitóticos metafásicos de duas populações de *Platydoras armatulus*: **a**) Cariótipo (coloração com Giemsa); **b**) Cariótipo submetido ao bandamento C. Os boxes contêm os microcromossomos supranumerários.



**FIGURA 3** – Distribuição dos DNA ribossômicos: *Impregnação pelo nitrato de prata* a) padrão simples (rio Paraná e rio Miranda); b) padrão múltiplo (rio Miranda); *FISH com sonda DNaR 18S* c) padrão simples (rio Paraná e rio Miranda); d) padrão múltiplo (rio Miranda); *FISH com sonda DNaR 5S* e) exemplares do rio Miranda f) exemplares do rio Paraná. Os asteriscos indicam as RONS; a seta preta evidencia o microcromossomo B; setas brancas: sítios de DNaR 5S.



**FIGURA 4** – Esquema demonstrando os padrões de RONS que ocorrem em exemplares simpátricos no rio Miranda (bacia hidrográfica do rio Paraguai). O **asterisco azul** destaca a correlação que existe entre a maior frequência de cromossomos supranumerários nos indivíduos portadores de sítios múltiplos de RONS.



**FIGURA 5** – Análise do comportamento meiótico do cromossomo B de *Platydoras armatulus*: **Coloração Convencional** a) metáfase espermatogonial; b) Paquíteno inicial; c) Diplóteno/Diacinese; **Bandamento C**: d) Paquíteno final; e) Metáfase I. **Coloração com Fluorocromos**: f) Paquíteno tardio corado com DAPI g) Paquíteno tardio corado com CMA<sub>3</sub>; h) Metáfase I corada com DAPI; i) Metáfase I após coloração com CMA<sub>3</sub>.



## Referências Bibliográficas

Arce MH, Reis ER, Geneva AJ, Sabaj PHM (2013) Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes:Doradidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67:560-577.

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética* 1: 103-120.

Birindelli JLO (2014) Phylogenetic relationships of the South American Doradoidea (Ostariophysi: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology*. 12(3): 451-564.

Blanco DR, Vicari MR, Artoni RF, Traldi JB, Moreira-Filho O (2012) Chromosomal Characterization of Armored Catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): First Report of B Chromosomes in the Genus. *Zoological Science* 29 (1): 604-609.

Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome Evolution. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci*. 55: 163–178.

Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL (2008) B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology* 72: 1907–1932.

Dimitri P, Junakovic N (1999) Revising the selfish DNA hypothesis: New evidence on accumulation of transposable elements in heterocromatin. *Trends in Genetics* 15: 123-124.

Eler ES, Dergam JA, Vênere PC, Paiva LC, Miranda GA, Oliveira 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. *Genética* 130:99-103.

Erdtmann B, Calcagnoto D, Rabolini L, Malabarba LR (1990) Variabilidade cromossômica em *Callichthys callichthys* (Callichthyidae, Pisces). *Ciênc Cult* 42: 452.



Errero-Porto F, Gindri BS, Vieira MM, Borin LA, Portela-Castro AL, Martins-Santos IC (2014a) Polymorfism 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.

Errero-Porto F, Vieira MM, Magrinelli LB, Borin-Carvalho LA, Vicari MR, Portela-Castro AL, Martins-Santos IC (2014b) Chromosomal Polymorfism in *Rineloricaria lanceolata* Gunther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of Fusions and their Consequences in the population. Zebrafish 11(4): 318-324.

Fenocchio AS, Jorge LC, Venere PC e Bertollo LAC (1993) Karyotypic characterization and nucleolous organizer regions in three species of Doradidae (Pisces, Siluriformes). Revista Brasileira de Genetica. 4:1097-1101.

Ferraris CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalog primary types. Zootaxa.

Ferreira DC, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F (2011) Transposable elements as a potential source for understanding Fish genome. Mobile Genetic Elements 1: 1-6.

Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. Experientia 49: 810–813.

Garcia C (2005) Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos-SP.

Gomes FP (1987) Curso de Estatística Experimental. 12ª edição, Nobel S.A. Piracicaba.

Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2004) Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica; 122: 239-244.



Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: as 1-step method. *Experientia*. 36: 1014-1015.

Jones RN, Rees HB (1982) *Chromosomes*. Academic Press. London.

Kidwell MG and Lisch DR (2000) Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecology Evolution* 15: 95-99.

Kligerman AD, Bloom SE (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 34: 266-269.

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 chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron*. 40: 552–559.

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society*. 99: 648–656. 2010.

Lui RL, Margarido VP, Moreira-Filho O (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry*. 87 (7): 433–438.

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Troy MP, Moreira-Filho O (2013a) Comparative chromosomal analysis and evolutionary considerations concerning two species of genus *Tatia* (Siluriformes, Auchenipteridae). *Comparative Cytogenetics*. 7(1): 63-71.

Lui RL, Blanco DR, Martinez JL, Margarido VP, Venere PC, Moreira-Filho O (2013b) The role of chromosomal fusion in the karyotypic evolution of the genus *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae). *Neotropical Ichthyology*. 11 (2).



Mariotto S, Centofante L, Miyazawa CS, Bertollo LAC e Moreira-Filho O (2009) Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotropical Ichthyology*. 7(4): 595-6000.

Milhomem SSR, Souza ACP, Nascimento AL, Carvalho Jr. JR, Feldberg E, Pieczarka JC, Nagamichi CY (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.

Néo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2000) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*. 108: 211–215.

Paixão AEM (2010) Estudos genéticos em *Kalyptodoras bahiensis*, capturada na bacia do médio e baixo Paraguaçu-BA, através de marcadores citogenéticos e moleculares. Monografia. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 83: 2934-2938.

Piorski NM, Garavello JC, Arce MH, Sabaj PH (2008) *Platydoras brachylecis*, a new species of thorny catfish (Siluriformes:Doradidae) from northeastern Brazil. *Neotropical ichthyology* 6:3.

Sabaj MH (200) Taxonomy of the neotropical thorny catfishes (Siluriformes:Doradidae) and revision of the genus *Leptodoras*. Tese não publicada. University of Illinois. Urbana-Champaign.

Santi-Rampazzo AP, Nishiyama PB, Ferreira PEB e Martins-Santos IC (2008) Intrapopulational polymorphism of nucleolus organizer regions in *Serrapinnus notomelas* (Characidae, Cheirodontinae) from the Paraná River. *J. Fish Biol.* 72: 1236-1243.



Schweizer D, Loidl J (1978) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-banding patterns. *Chromosome Today*.9: 61-74.

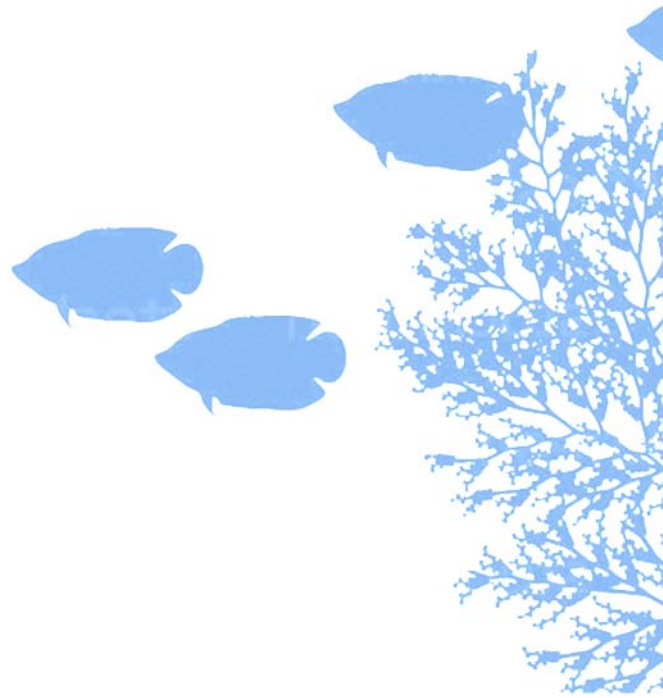
Szczepanski TS (2012) Organização citogenômica dos elementos de repetição em duas famílias de Siluriformes: Pimelodidae e Ariidae. Tese não publicada. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Sumner AMT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.

Venere PC (1998) Diversificação cariotípica em peixes do médio rio Araguaia, com ênfase em Characiformes e Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi). Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.



## Considerações Finais





## Considerações Finais

Além de fornecer as primeiras evidências para delinear possíveis eventos evolutivos relacionados à diversificação cromossômica de Doradidae, nesse estudo foi descrita uma diversidade cariotípica até então desconhecida nessa família, possibilitando concluir que:

1- A manutenção do cariótipo ancestral formado a partir de 58 cromossomos é a condição mais frequente, sendo descrita para 16 espécies dentre as 21 já cariotipadas. No entanto, entre as espécies portadoras de  $2n=58$  existe uma intensa variação nas fórmulas cariotípicas promovida por inversões pericêntricas.

2- As Fusões e Fissões cêntricas também atuaram na diversificação cariotípica de Doradidae, originando, a partir do cariótipo ancestral com 58 cromossomos, números diplóides menores (46 e 56) e maiores (60 e 66) respectivamente.

3- A presença de RONS simples terminais em cromossomos subtelocêntricos é uma característica plesiomórfica em Doradidae. Essa condição foi mantida nos clados basais e em algumas espécies da subfamília Doradinae, contudo diferenças relacionadas ao tipo cromossômico portador e à posição foram observadas, sugerindo a participação de inversões pericêntricas durante o processo de diversificação dessa família de DNAr.

4- A dispersão dos sítios de DNAr 5S apresentou diferentes padrões, o que impossibilitou sugerir qual seria a condição ancestral de Doradidae. Nessa família, a maioria das espécies possui sítios simples terminais geralmente em cromossomos submetacêntricos ou subtelocêntricos, mas outras apresentaram também sistemas múltiplos como é o caso de *Trachydoras paraguayensis*, *Franciscodoras marmoratus* e *Platydoras armatulus*. Esse



marcador, embora tenha sido pouco explorado, revelou-se mais variável do que o padrão de DNAr 18S, sendo em algumas espécies um excelente marcador cromossômico.

5- Existe em Doradidae, uma acentuada diversidade em relação à forma como as regiões heterocromáticas se distribuem pelo cariótipo, possibilitando distinguir pelo menos quatro padrões de heterocromatina de acordo com sua quantidade e localização. Tais padrões evidenciam que a subfamília Doradinae é o grupo com maior diversificação heterocromática, sendo que dentre eles, três (1, 3 e 4) foram identificados em espécies dessa subfamília. Já o padrão 2 foi uma característica compartilhada entre as subfamílias Whertheimerinae, *Franciscodoras marmoratus*, Astrodoradinae e espécies de *Platydoras*.

6- Os cromossomos supranumerários descritos em *Ossancora punctata*, *Pterodoras granulosus* e *Platydoras armatulus*, embora sejam morfologicamente similares (microcromossomos totalmente heterocromáticos), possuem origens independentes que remontam à eventos que atuaram em determinados cromossomos do complemento padrão.

7- Em *Ossancora punctata* a origem dos microcromossomos provavelmente tem relação com o aumento do número diplóide de  $2n=58$  para  $2n=66$ . Durante esse evento, fissões cêntricas ocorreram e conseqüentemente acabaram gerando pequenos fragmentos cromossômicos, sendo que a maioria deles foi naturalmente eliminada, mas alguns permaneceram por apresentarem resquícios de sequências centroméricas. Essa característica possibilitou uma correta segregação meiótica, garantindo a permanência em alguns exemplares como cromossomos supranumerários.

8- O microcromossomo supranumerário observado em *Pterodoras granulosus*, teve sua origem a partir de deleções em algum cromossomo do complemento padrão, sofrendo posteriormente um acúmulo de diferentes famílias de DNA repetitivo, dentre as



quais sequencias centroméricas que garantiram sua manutenção em diferentes linhagens celulares do portador.

9- *Platydoras armatulus* foi considerada uma das espécies mais variáveis, sendo portadora de sítios múltiplos de DNAr 5S e até o momento a única espécie de Doradidae com RONS múltiplas. Os exemplares portadores de RONS múltiplas exibiram uma maior frequência de microcromossomos supranumerários, sendo que esse evento foi considerado estatisticamente significativo. A origem dessas duas condições provavelmente está relacionada com a atividade de elementos transponíveis, no entanto, para confirmar essa hipótese, estudos complementares deverão ser realizados, visando isolar e caracterizar os DNAs repetitivos.

10- Os marcadores citogenéticos também foram importantes para auxiliar na compreensão de questões filogenéticas conflituosas. No gênero *Ossancora*, por exemplo, existem dúvidas referentes à sua condição monofilética, sendo que dados moleculares evidenciam que esse grupo é polifilético. Os resultados aqui obtidos corroboram os estudos morfológicos, sugerindo um maior grau de relacionamento entre *O. eigenmanni* e *O. asterophysa* do que com *O. punctata* que seria na realidade a espécie mais derivada do gênero.

11- Além de *Ossancora*, as espécies do gênero *Amblydoras* também não possuem suas relações filogenéticas bem esclarecidas. No presente estudo foram descritas duas formas cariotípicas para *Amblydoras affinis* sendo uma menos comum com  $2n=46$  e outra mais frequente com 60 cromossomos. Essa diferenciação cromossômica sugere que *Amblydoras* necessita de uma revisão taxonômica, utilizando não só parâmetros morfológicos, mas também marcadores genéticos, visto que a diversidade desse gênero encontra-se subestimada, devido à existência de diferentes espécies crípticas.



12-Diante desse novo cenário é cada vez mais evidente que esse grupo de peixes não segue um processo de diversificação cromossômica conservativo, como maioria dos autores acreditava. Essa variabilidade certamente ainda está subestimada, o que torna imprescindível a utilização de outros marcadores cromossômicos, dessa forma será possível compreender de fato, quais os mecanismos que atuaram durante a história evolutiva da família Doradidae promovendo essa acentuada variabilidade no número diplóide, padrões de heterocromatina e dispersão dos sítios de DNAr.