

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

MARCOS OTÁVIO RIBEIRO

Análise da variabilidade citogenética e genética em espécies da sub-família
Hypostominae e Tribo Ancistrini (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) na
região Sul do Brasil

Maringá
2022

MARCOS OTÁVIO RIBEIRO

Análise da variabilidade citogenética e genética em espécies da sub-família Hypostominae e Tribo Ancistrini (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) na região Sul do Brasil

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Luíza de Brito Portela Castro

Maringá

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

R484a Ribeiro, Marcos Otávio

 Análise da variabilidade citogenética e genética em espécies da sub-família
Hypostominae e Tribo Ancistrini (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) na região Sul do Brasil
: / Marcos Otávio Ribeiro. -- Maringá, PR, 2022.
66 f.: il. color., figs., tabs., maps.

 Orientadora: Profa. Dra. Ana Luíza de Brito Portela Castro.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas,
Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2022.

 1. Citogenética de Peixes. 2. *Ancistrus abilhoai*. 3. COI . 4. *Hemiancistrus fuliginosus*.
5. Alto Uruguai. I. Castro, Ana Luíza de Brito Portela, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biotecnologia, Genética e
Biologia Celular. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular).
III. Título.

CDD 23.ed. 597.49

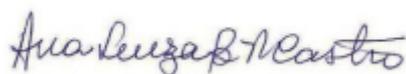
MARCOS OTÁVIO RIBEIRO

Análise da variabilidade citogenética e genética em espécies da sub-família Hypostominae e Tribo Ancistrini (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) na região Sul do Brasil

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 23/03/2022

***BANCA EXAMINADORA**



Profa. Dra. Orientadora Ana Luiza de Brito Portela Castro
Universidade Estadual de Maringá-UEM



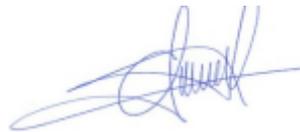
Profa. Dra. Lucia Giuliano Caetano
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Rafael Bueno Noletto

Prof. Dr. Rafael Bueno Noletto
Universidade Estadual do Paraná-UNESPAR



Profa. Dra. Luciana Andréia Borin de Carvalho
Universidade Estadual de Maringá-UEM



Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes
Universidade Estadual de Maringá-UEM

BIOGRAFIA

Marcos Otávio Ribeiro, filho de João Maria Ribeiro e Aurea Maria Muller Ribeiro, nasceu em 22 de março de 1987 na cidade de União da Vitória-PR.

Concluiu em 2004 o ensino médio no colégio Santos Anjos, Porto União-SC. Em 2005, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Paraná, *campus* União da Vitória-PR, o qual concluiu em 2008, recebendo o título de licenciatura plena em Ciências Biológicas.

Ingressou em 2011 no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com área de concentração em Biologia Celular e Molecular, da Universidade Estadual de Maringá, obtendo o título de mestre em 2013. Em 2018, ingressou no curso de Doutorado do mesmo programa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus, pelo dom da vida e oportunizar mais essa grande experiência nessa breve jornada terrena.

À minha família, pai, mãe e irmã, por estarem juntos comigo nessa breve caminhada.

À minha namorada Lígia, amiga e parceira que compartilha ao meu lado mais de sete anos de muita parceria, amizade e companheirismo.

Aos meus amigos, parceiros e colegas de trabalho, que de alguma forma somaram e somam em minha vida.

À todos os amigos e colegas de laboratório, que me acolheram e foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal.

Em especial, gostaria de agradecer a minha orientadora, professora Dra. Ana Luiza de Brito Portela Castro, que desde o mestrado me acolheu em seu laboratório e sem sombra de dúvidas, além de uma excelente orientadora é uma pessoa com uma generosidade e bondade incrível.

À professora Dra. Alessandra Valéria de Oliveira, por todo suporte e orientação na parte das análises moleculares deste trabalho.

Agradecer à amiga e colega de laboratório Isabelle, que auxiliou em todas as análises moleculares e sem dúvida, sem sua ajuda e orientação, seria muito difícil de realizar tais análises.

Agradecer a Bárbara do laboratório da professora Alessandra, que forneceu todo o suporte e auxílio nas análises moleculares, sempre muito prestativa e colaborativa.

Agradecer ao CNPq, por todo o suporte financeiro para a realização desse trabalho a Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR) pelo apoio logístico e laboratorial e a Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelo suporte no desenvolvimento do trabalho.

APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta de dois artigos científicos completos, os quais são apresentados abaixo.

Artigo um será submetido ao periódico Neotropical Ichthyology:

Análise da variabilidade citogenética de representantes da tribo Ancistrini da região Sul do Brasil

Artigo dois será submetido ao periódico Comparative Cytogenetics:

Diversidade cromossômica em *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), da região Sul do Brasil

RESUMO GERAL

A região Neotropical é compreendida em dimensões geográficas, desde a América Central até o sul da América do Sul. Tal região é caracterizada por exibir um elevado grau de biodiversidade e de processos de irradiação adaptativa em diversos organismos, incluindo o maior grupo de vertebrados que são os peixes. Essa característica propiciou com o passar dos anos, um aumento significativo no número de espécies de diversos organismos, entre elas os vertebrados. Os peixes são considerados o grupo mais diversificado dentre os vertebrados e estão amplamente dispersos na região Neotropical. Dentre as inúmeras ordens e famílias de peixes descritas nessa região, à família Loricariidae, pertencente à ordem Siluriforme, exibe ampla distribuição e diversidade nesses ecossistemas. Espécies dessa família popularmente conhecidos como cascudos, exibem complexidade taxonômica devido ao grande número de espécies e elevada variação intraespecífica, caracterizada pelos diferentes padrões morfológicos e de pigmentação. Esse grupo está longe de ser consenso entre taxonomistas, pois suas peculiaridades morfológicas colocam constantemente à prova, as revisões taxonômicas desse grupo. A região sul do Brasil pertencente à região Neotropical é caracterizada pela abundância de recursos hídricos e formada geologicamente por inúmeras quedas, corredeiras e riachos, ambiente altamente favorável na formação de nichos ictiofaunísticos. Dentre as diversas bacias hidrográficas da região sul brasileira, se destacam a bacia do rio Iguaçu e do rio Uruguai, englobando os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Levando em consideração as características singulares da região Neotropical, em especial da região sul brasileira, se faz necessário prover constantes estudos ictiofaunísticos, utilizando ferramentas de citogenética objetivando ampliar os dados, como também propor novas sugestões para conflitos taxonômicos que são recorrentes dentro de Loricariidae, em especial nos gêneros: *Ancistrus*, *Hemiancistrus* e *Hypostomus*. Sendo assim, o presente estudo objetivou realizar análises cromossômicas através de ferramentas da citogenética e molecular, bem como identificar e caracterizar geneticamente espécies desses gêneros da região sul do Brasil, contribuindo com a discussão carioevolutiva e compilando novas perspectivas filogenéticas desses grupos. Espécimes do gênero *Ancistrus*, *Hemiancistrus* e *Hypostomus* foram coletados, no médio Iguaçu-SC/PR região de Porto União-SC e no alto Uruguai-SC, região de Concórdia-SC. Os resultados citogenéticos exibiram $2n=48$ para *A. abilhoai* e o FISH com sondas de DNAr 18S e 5S, apontou sintenia de sítios no par 16 e um sítio adicional de DNAr 5S no par 19. Poucos blocos heterocromáticos foram observados nesta espécie destacando-se marcações no braço curto do par 16 (Ag-RON positivo). *H. fuliginosus* exibiu $2n=56$ e marcações Ag-RON positivo no par 12, confirmado com FISH (18S) e a sonda de DNAr 5S hibridizou na região pericentromérica do par 7 (metacêntrico). Poucos blocos heterocromáticos (banda C positivos) foram observados nos cromossomos desta espécie com algumas discretas marcações centroméricas, destacando-se marcações intersticiais nos pares 12 e 7 adjacentes e/ou intercalares aos sítios de DNAr 18S e 5S. Parciais do gene, *Citocromo c oxidase I (COI)* das populações de *A. abilhoai* (rio dos Pardos-SC e rio Iratim-PR)

mostraram que ambas são 100% semelhantes apresentando menores valores de distância K2P para *Ancistrus cirrhosus* (1.1%) e maiores para *A. chagresi* (9.3%). Já as sequências de *H. fuliginosus* foram 100% semelhantes as outras da mesma espécie disponíveis no banco de dados, confirmando assim a identificação dos exemplares do presente trabalho. Em *Hypostomus*, os resultados apontaram $2n=76$ para *Hypostomus* cf. *agna*, $2n=68$ para *H. commersoni* com variação interpopulacional na fórmula cariotípica e $2n=74/2n=75$ para *H. myersi* com variação intrapopulacional. Sistema de RON simples foi observado em *Hypostomus* cf. *agna* e *H. myersi*, e sistema múltiplo com variação de número e posição nas populações de *H. commersoni*. O bandamento C, exibiu marcações associadas a RON, nas populações de *H. commersoni*, marcações predominantemente pericentroméricas em *H. myersi* e marcações teloméricas em cromossomos do tipo acrocêntrico em *Hypostomus* cf. *agna*. A análise das sequências parciais do gene *Citocromo c oxidase I (COI)* de *H. myersi* apresentou 100% de similaridade com sequências disponíveis na base de dados. *Hypostomus* cf. *agna* exibiu 100% de similaridade com *H. isbrueckeri* e 0.6% de distância genética com *H. luteus*. Os resultados moleculares e citogenéticos apresentados em nosso trabalho, foram resolutivos na identificação da maioria dos espécimes coletados e também apontaram possíveis problemas taxonômicos em *Hypostomus* cf. *agna* previamente descritas na literatura. Dados citogenéticos inéditos para *H. fuliginosus* foram apresentados em nosso estudo e reforçamos a importância de estudos citogenéticos com ferramentas múltiplas, buscando auxiliar na identificação correta das espécies e contribuir na discussão carioevolutiva desses grupos.

Palavras-chave: *Ancistrus*, Citogenética, *COI*, *Hypostomus*.

The Neotropical region is comprised in geographical dimensions from Central America to southern South America. This region is characterized by a high degree of biodiversity and adaptive irradiation processes in several organisms, including the largest group of vertebrates, which are the fish. This characteristic has provided, over the years, a significant increase in the number of species of various organisms, including vertebrates. Fish are considered to be the most diverse group of vertebrates and are widely dispersed in the Neotropical region. Among the numerous orders and families of fish described in this region, the family Loricariidae, belonging to the order Siluriformes, has a wide distribution and diversity in these ecosystems. Species of this family, popularly known as rattlesnakes, exhibit taxonomic complexity due to the large number of species and high intraspecific variation, characterized by different morphological and pigmentation patterns. This group is far from being a consensus among taxonomists, because its morphological peculiarities constantly put to test the taxonomic revisions of this group. The southern region of Brazil, belonging to the Neotropical region, is characterized by the abundance of water resources and geologically formed by numerous waterfalls, rapids and streams, a highly vulnerable environment in the formation of ichthyofaunal niches. Among the several hydrographic basins in the southern Brazilian region, the Iguazu and Uruguay River basins stand out,

encompassing the states of Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul. Taking into account the unique characteristics of the Neotropical region, especially the southern Brazilian region, it is necessary to provide constant ichthyofaunistic studies, using cytogenetic tools to expand the data, as well as to propose new suggestions for taxonomic conflicts that are recurrent within Loricariidae, especially in the genera: *Ancistrus*, *Hemiancistrus* and *Hypostomus*. Thus, the present study aimed to carry out chromosome analyses using cytogenetic and molecular tools, as well as to identify and genetically characterize species of these genera from the southern region of Brazil, contributing to the karyoevolutionary discussion and compiling new phylogenetic perspectives of these groups. Specimens of the genera *Ancistrus*, *Hemiancistrus* and *Hypostomus* were collected in the medium Iguaçú-SC/PR region of Porto União-SC and in the upper Uruguay-SC, region of Concórdia-SC. Cytogenetic results showed $2n=48$ for *A. abilhoai* and FISH with 18S and 5S rDNA probes indicated synteny of sites on pair 16 and an additional 5S rDNA site on pair 19. Few heterochromatic blocks were observed in this species, with the short arm of pair 16 (Ag-NOR positive). *H. fuliginosus* exhibited $2n=56$ and Ag-NOR positive markings on pair 12, confirmed with 18S FISH and the 5S rDNA probe hybridized to the pericentromeric region of pair 7 (metacentric). Few heterochromatic blocks (C-band positive) were observed in the chromosomes of this species with some discrete centromeric markings, highlighting interstitial markings in pairs 12 and 7 adjacent and/or intercalary to the 18S and 5S rDNA sites. Partials of the cytochrome c oxidase I (COI) gene from *A. abilhoai* populations (Rio dos Pardos-SC and Rio Iratim-PR) showed that both are 100% similar, presenting lower K2P distance values for *Ancistrus cirrhosus* (1.1%) and higher values for *A. chagresi* (9.3%). The sequences of *H. fuliginosus* were 100% similar to others of the same species available in the database, thus confirming the identification of the specimens of the present work. In *Hypostomus*, the results showed $2n=76$ for *Hypostomus* cf. *agna*, $2n=68$ for *H. commersoni* with interpopulational variation in the karyotypic formula and $2n=74/2n=75$ for *H. myersi* with intrapopulational variation. Single NOR system was observed in *Hypostomus* cf. *agna* and *H. myersi*, and multiple system with variation in number and position in *H. commersoni* populations. C-banding showed markings associated with NOR in the populations of *H. commersoni*, predominantly pericentromeric markings in *H. myersi* and telomeric markings on chromosomes of the acrocentric type in *Hypostomus* cf. *agna*. Analysis of partial sequences of the cytochrome c oxidase I (COI) gene from *H. myersi* showed 100% similarity with sequences available in the database. *Hypostomus* cf. *agna* exhibited 100% similarity with *H. isbrueckeri* and 0.6% genetic distance with *H. luteus*. The molecular and cytogenetic results presented in our work were resolute in identifying most of the collected specimens and also pointed out possible taxonomic problems in *Hypostomus* cf. *agna* previously described in the literature. Unpublished cytogenetic data for *H. fuliginosus* were presented in our study, and we reinforce the importance of studies to help in the correct identification of species and contribute to the karyoevolutionary discussion of these groups.

Key-words: *Ancistrus*, Cytogenetic, COI, *Hypostomus*

SUMÁRIO

ARTIGO I

Análise da variabilidade citogenética de representantes da tribo Ancistrini da região Sul do Brasil através de ferramentas clássicas e moleculares.....	13
Resumo.....	13
Introdução.....	15
Materiais e Métodos.....	17
Resultados.....	20
Discussão.....	26
Refêrências.....	32
Material Suplementar.....	38

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Resepresentação geográfica dos pontos das coletas.....	17
Figura 2. Cariótipo representativo de ambas as populações de <i>A. abilhoai</i>	21
Figura 3. Cariótipo sequencial representativo de <i>H. fuliginosus</i>	22
Figura 4. Árvore de distância genética.....	25
Tabela 1. Distâncias K2P médias entre grupos.....	24
Tabela 2. Descrições de espécies do gênero <i>Hemiancistrus</i>	31

ARTIGO II

Diversidade cromossômica em <i>Hypostomus</i> Lacépède, 1803(Siluriformes, Loricariidae), da região Sul do Brasil.....	40
Resumo.....	40
Introdução.....	42
Materiais e Métodos.....	44
Resultados.....	47
Discussão.....	54
Refêrências.....	60
Material Suplementar.....	66

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Representação geográfica dos pontos das coletas.....	45
Figura 2. Cariótipo de <i>Hypostomus</i> cf. <i>agna</i> do rio do Pardos-SC.....	48
Figura 3. Cariótipo de <i>Hypostomus myersi</i> do rio Timbó-SC.....	49
Figura 4. Cariótipo de <i>H. commersoni</i> rio Fragosos-SC.....	50
Figura 5. Cariótipo de <i>Hypostomus</i> cf. <i>agna</i> rio do Pardos-SC <i>double</i> FISH.....	51
Figura 6. Árvore gênica construída pelo modelo Neighbor-joining.....	54
Tabela 1. Distâncias K2P obtidas a partir de sequências parciais do gene <i>COI</i>	53

Artigo I

Análise da variabilidade citogenética em representantes da tribo Ancistrini da região Sul do Brasil

Marcos Otávio Ribeiro e Ana Luíza de Brito Portela Castro

Resumo

Ancistrus é um gênero especioso dentro da tribo Ancistrini, e dados referentes à *Ancistrus* e *Hemiancistrus* para região do sul do Brasil, ainda são escassos. Majoritariamente em ambos os gêneros, as descrições se encontram na bacia do Paraguai e Amazonas. Com o objetivo de ampliar com dados citogenéticos e moleculares em espécies desses gêneros, o presente trabalho teve como objetivo analisar marcadores cromossômicos e sequências parciais do gene *Citocromo oxidase I COI*, em representantes de Ancistrini que ocorrem na região sul do Brasil. Duas populações de *Ancistrus abilhoai* foram coletadas, uma no rio dos Pardos (Porto União-SC) outra no rio Iratim (General Carneiro-PR) e uma população de *Hemiancistrus fuliginosus* no alto rio Uruguai (Concórdia-SC). Os resultados citogenéticos encontrados exibiram $2n=48$ para *A. abilhoai* e os sítios Ag-RON e FISH com sondas de DNAr 18S e 5S, apontaram marcações no par 16 em sintenia de ambas as populações em sítios 18S e um sítio adicional 5S no par 19. Poucos blocos heterocromáticos foram observados em *A. abilhoai*. *H. fuliginosus* exibiu $2n=56$ e Ag-RON positivo no par 12, confirmado com FISH sonda DNAr 18S e marcações de DNAr 5S no par sete. As análises moleculares de sequências parciais do gene, *Citocromo c oxidase I (COI)* das populações de *A. abilhoai*, apontaram 100% de similaridade entre si. Dentre todos os haplótipos do gênero *Ancistrus*, *A. abilhoai* exibiu menor valor de distância K2P para *Ancistrus cirrhosus* (1.1%) e o maior para *A. chagresi* (9.3%). Para *H. fuliginosus* as sequências do *COI* foram 100% semelhantes às sequências desta espécie, disponível no banco de dados, confirmando assim a identificação dos exemplares do presente trabalho. Nossos resultados trouxeram o primeiro sequenciamento do gene *COI* para a espécie de *A. abilhoai* e também a primeira descrição citogenética de *H. fuliginosus*, contribuindo com novos dados citogenéticos em Ancistrini para a região sul do Brasil.

Palavras-chave: *Ancistrus abilhoai*, Alto Uruguai, *COI*, *Hemiancistrus fuliginosus*.

Analysis of the cytogenetic variability of representatives of the Ancistrini tribe from southern Brazil

Abstract

Ancistrus is a special genus within the tribe Ancistrini, and data concerning *Ancistrus* and *Hemiancistrus* for the southern region of Brazil are still scarce. Mostly for both genera, the descriptions are found in the Paraguay and Amazon basin. With the objective of expanding cytogenetic and molecular data on species of these genera, the present study aimed to analyze chromosomal markers and partial sequences of the Cytochrome oxidase I COI gene, in representatives of Ancistrini occurring in the south region of Brazil. Two populations of *Ancistrus abilhoai* were collected, one at Rio dos Pardos (Porto União-SC) and the other at Iratim River (General Carneiro-PR), and one population of *Hemiancistrus fuliginosus* at upper Uruguai River (Concórdia-SC). Cytogenetic results showed $2n=48$ for *A. abilhoai* and Ag-NOR sites and FISH with 18S and 5S rDNA probes, indicated markings on pair 16 in synteny of both populations at 18S sites and an additional 5S site on pair 19. Few heterochromatic blocks were observed in *A. abilhoai*. *H. fuliginosus* exhibited $2n=56$ and Ag-NOR positive in pair 12, confirmed with FISH probe rDNA 18S and 5S rDNA markings in pair seven. Molecular analyses of partial sequences of the gene, Cytochrome c oxidase I (COI) of the *A. abilhoai* populations showed 100% similarity between them. Among all haplotypes of the genus *Ancistrus*, *A. abilhoai* exhibited the lowest K2P distance value for *Ancistrus cirrhosus* (1.1%) and the highest for *A. chagresi* (9.3%). For *H. fuliginosus* the COI sequences were 100% similar to the sequences of this species, available in the database, thus confirming the identification of the specimens in the present work. Our results brought the first sequencing of the COI gene for the species of *A. abilhoai* and also the first cytogenetic description of *H. fuliginosus*, contributing new cytogenetic data in Ancistrini for the southern region of Brazil

Key-words: *Ancistrus abilhoai*, COI, *Hemiancistrus fuliginosus*, High Uruguai.

Introdução

O Brasil é dividido em doze regiões hidrográficas segundo a Agência Nacional das Águas Ana, (2021). A bacia do rio Iguaçu e do rio Uruguai, engloba porções dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, exibindo grande importância em recursos hídricos. Entre as diversas famílias de peixes encontradas nessa região, se destacam representantes da família Loricariidae, família mais representativa dentro da ordem Siluriformes e compreende atualmente, 1198 espécies válidas (Fricke *et al.*, 2022). Problemas relacionados à taxonomia dentro de Loricariidae são recorrentes ao passo que novas descrições de espécies são publicadas. Dentro dessa família, se destaca o clado Ancistrini, composto por inúmeros gêneros e com elevada diversidade morfológica, que passa constantemente por reformulações sistemáticas (Lujan *et al.*, 2015).

O gênero *Ancistrus* Kner, 1854, é considerado o mais diversificado em Ancistrini, apresentando amplitude cromossômica de $2n=34$ em *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999, (Mariotto *et al.*, 2009) a $2n=54$ em *Ancistrus claro* Knaack, 1999, (Mariotto *et al.*, 2013). *Ancistrus* exibe uma dinâmica cromossômica peculiar dentro de Ancistrini, apresentando sistemas de determinação sexual diversos como: ZZ/ZW em *A. ranunculus* Muller, Rapp Py-Daniel e Zuanon, 1994, (de Oliveira *et al.*, 2007), XX/XY em *Ancistrus* cf. *dubius* (Mariotto e Miyazawa, 2006), XX/XY1Y2 em *Ancistrus* sp. Balbina (de Oliveira *et al.*, 2008), XX/X0 em *Ancistrus* n. sp.1 (Alves *et al.*, 2006) e Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2 em *Ancistrus* sp. Barcelos (de Oliveira *et al.*, 2008). Outro gênero inserido em Ancistrini é *Hemiancistrus* Bleeker, 1862, o qual atualmente exibe poucas descrições, sendo apenas cinco com dados citogenéticos: *H. spilomma* Cardoso e Lucinda, 2003, *H. spinosissimus* Cardoso e Lucinda, 2003, (de Oliveira, Souza e Venere, 2006), *Hemiancistrus* sp. (Artoni e Bertollo, 2001) e *H. punctulatus* Cardoso e Malabarba, 1999, (Rubert, 2011), todas com $2n=52$ cromossomos e predominância de cromossomos do tipo metacêntricos e submetacêntricos. Além disso, sistema de determinação sexual ZZ/ZW foi registrado em *H. spilomma* (de Oliveira, Souza e Venere, 2006). Armbruster, Werneke e Tan (2015) em seu trabalho de revisão taxonômica e descrição com *Hemiancistrus*, *Peckoltia* e gêneros aliados, apontaram várias mudanças de nomenclatura e taxonomia nesses gêneros, ocorrendo transição de

espécies que no passado eram abrigadas no gênero *Ancistrus* e agora estão em *Hemiancistrus*, algumas de *Hemiancistrus* para *Peckoltia* e até mesmo de *Hemiancistrus* para *Hypostomus*, indicando uma grande problemática relacionada à taxonomia desses grupos. Lujan *et al.* (2015) em seu amplo estudo de revisão filogenética em Loricariidae, com ênfase em Hypostominae, sugere que *Peckoltia* e *Hemiancistrus* não são monofiléticos como proposto anteriormente e oferecerem uma nova taxonomia para espécies de *Peckoltia* e *Hemiancistrus*.

Gugloski *et al.* (2020) em seu trabalho de descrição e revisão listaram 53 espécies de *Ancistrus*, e a medida que o número de descrições aumentam, problemas relacionados à taxonomia do grupo ainda são presentes, haja vista que técnicas clássicas de citogenética e taxonômicas em alguns casos, não são suficientes para realizar uma correta identificação. Assim, técnicas moleculares como DNA barcode, que consiste na análise de aproximadamente 650pb de um segmento do gene *citocromo c oxidase subunidade I (COI)*, podem ser mais elucidativas, na busca pela real compreensão da citotaxonomia desse grupo. Esta metodologia utiliza as vantagens das técnicas de PCR e sequenciamento de DNA, ligadas a análises de bioinformática, permitindo identificações taxonômicas e melhores elucidações sistemáticas (Hebert *et al.*, 2003). Prizon *et al.* (2017) diferenciaram cinco linhagens de *Ancistrus* na bacia do rio Paraná utilizando DNA barcode, mas estudos moleculares com espécies da bacia hidrográfica da região Sul do país, alto Uruguai-SC e médio Iguaçu-PR/SC, são ainda inexistentes utilizando esse tipo de ferramenta. *Ancistrus agostinhoi*, *A. mullerae* e *A. abilhoai* foram descritos por Bifi *et al.* (2009), compreendendo o alto, médio e baixo Iguaçu, entre os estados do Paraná e Santa Catarina. Posteriormente *A. abilhoai*, foi descrito citogeneticamente por Ribeiro *et al.* (2015), sendo essa considerada endêmica Baumgartner *et al.* (2012).

Com base na complexidade citotaxonomica de *Ancistrus* e *Hemiancistrus*, escassez de dados citogenéticos e endemismo de espécies de peixes da região Sul do Brasil, o presente estudo objetivou com o uso de ferramentas da citogenética e molecular, caracterizar geneticamente espécies desses gêneros, contribuindo com a discussão carioevolutiva e compilando novas perspectivas citogenéticas desse grupo.

Materiais e Métodos

Amostras biológicas

Espécimes dos gêneros *Ancistrus* e *Hemiancistrus* (Tribo Ancistrini, Loricariidae) foram utilizados em estudos citogenéticos e moleculares (Fig.1). Para o gênero *Ancistrus*, foram coletadas duas populações: *Ancistrus abilhoai* rio Iratim, município de General Carneiro-PR, bacia do rio Iguaçu ($26^{\circ}19'44.21''S$, $51^{\circ}34'39.37''O$) totalizando 13 machos e seis fêmeas e uma população de *Ancistrus abilhoai* rio dos Pardos, distrito de Santa Cruz do Timbó-SC, Porto União-SC ($26^{\circ}26'39.08''S$ $50^{\circ}58'44.98''O$) totalizando quatro fêmeas e um macho. Exemplares de *Hemiancistrus fuliginosus* foram coletados no rio Fragosos, município de Concórdia-SC, bacia do alto Uruguai ($27^{\circ}13'27.7''S$, $52^{\circ}10'07.9''W$) totalizando cinco fêmeas e quatro machos.

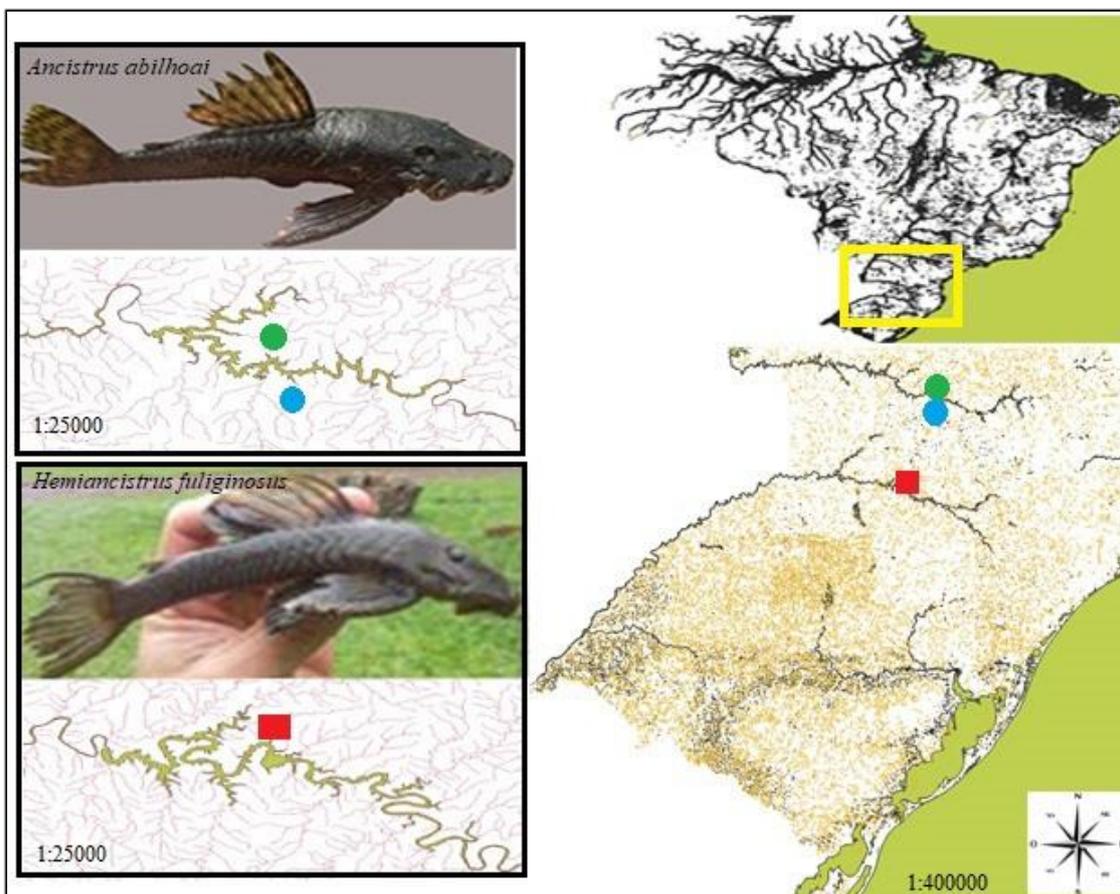


FIGURA 1. Resepresentação geográfica dos pontos da região sul do Brasil onde foram coletados os espécimes. Círculo verde corresponde a população de *A. abilhoai* do rio Iratim-PR e círculo azul população de *A. abilhoai* rio dos Pardos-SC. Retângulo em vermelho simboliza a população de *H. fuliginosus* coletadas no rio Fragosos-SC. Tracejados na cor marrom representam as microbacias e áreas de drenagem e em verde áreas de inundação.

Procedimentos de citogenética convencional

Após as coletas, os espécimes foram transportados em caixas aeradas para o laboratório de citogenética de peixes da Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), *campus* União da Vitória-PR. A identificação dos exemplares foi realizada pelo taxonomista Dr. Claudio Henrique Zawadzki (Universidade Estadual de Maringá), sendo alguns exemplares depositados na coleção ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA), da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil (NUP-21922). A coleta dos espécimes foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente, através do Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBIO) número da licença 68533-1. Todo o procedimento de eutanásia e sacrifício dos espécimes realizado nesse trabalho, foi autorizado pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Paraná (CEUA número 002-2021). Os exemplares foram anestesiados e eutanasiados por meio de superdosagem com óleo de cravo (Griffiths, 2000) e os cromossomos mitóticos foram obtidos através de células do rim de acordo com Bertollo *et al.* (1978). As regiões organizadoras do nucléolo (RONs), foram reveladas por meio da técnica de impregnação por nitrato de prata (Howell e Black, 1980). As regiões de heterocromatina constitutiva, foram determinadas pela técnica de bandeamento C (Sumner, 1972), e coradas com iodeto de propídeo, conforme descrito em Lui *et al.* (2012).

O mapeamento físico das sequências de DNAr 5S e 18S, foi realizado pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) de acordo com Pinkel *et al.* (1986), utilizando sondas obtidas de *Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850, (Martins e Galetti, 1999) e *Prochilodus argenteus* Spix e Agassiz, 1829, (Hatanaka e Galetti, 2004). As sondas foram marcadas por Nick Translation com biotina-16-dUTP (DNAr 5S) e digoxigenina-11-dUTP (DNAr 18S). O processo de hibridização foi conduzido sob condições de alta estrigência (77%). Os sinais foram detectados utilizando antidigoxigenina-rodamina, conjugada para sondas de DNAr 18S e avidina-FITC conjugada para sondas de DNAr 5S. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI. A captura das imagens foi realizada através do microscópio de fluorescência modelo Zeiss Axio Lab. A1. Para a montagem dos cariótipos, os cromossomos foram pareados em grupos de: (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico, (st) subtelocêntrico e (a) acrocêntrico conforme Levan *et al.* (1964).

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

A extração total de DNA genômico foi realizada a partir de amostras de fígado, utilizando o kit Promega Wizard ®Genomics, seguindo as instruções do fabricante. Após a extração o DNA foi quantificado, utilizando eletroforese em gel de agarose 1%, por meio de comparação com DNA lambda de concentração conhecida. A região mitocondrial do citocromo c oxidase subunidade 1 (*COI*), foi parcialmente amplificada utilizando os iniciadores L6448-F2 (5'-TCGACTAATCATAAAGATCGGCGCAC-3') e H7152 (5'-CACCTCAGGGGTGTCCGAARAAYCARA-3') descritos por Ivanova *et al.* (2007). A reação em cadeia da polimerase (PCR) consistiu em Tris-HCl [Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM], MgCl₂ (1,5 mM), primers (2,5 µM cada), dNTPs (0,1 mM cada), Taq Polimerase de DNA (1U) e DNA molde na concentração de 10ng/ul para perfazer um volume final de 25 µl. As condições incluíam uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 30s, 52°C durante 30s e 72°C durante 1 min com um ciclo de alongamento final a 72°C durante 10 min. Os amplicons foram verificados em gel de agarose a 1% por eletroforese e purificados com polietilenoglicol. Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit Big Dye Terminator. As reações e o sequenciamento foram realizados na ACTGene Análises Moleculares Ltda, utilizando o sequenciador automatizado ABI-3500.

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas utilizando-se os softwares BioEdit (Hall, 1999) e MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016), respectivamente. Além das sequências obtidas nesse trabalho, todas as sequências disponíveis no Genbank para espécies de *Ancistrus* e *Hemiancistrus* (exceto *Ancistrus* sp. e *Hemiancistrus* sp.) foram utilizadas para seleção de haplótipos, realizada pelo software DnaSP 6 (Rozas *et al.*, 2017). As distâncias genéticas foram calculadas par a par entre os haplótipos e também entre grupos pelo método de Kimura-2-parametros. As matrizes de distância genética foi construída pelo modelo de Neighbor-joining, através do software MEGA 7.0. *Rhinelepis aspera* Spix & Agassiz, 1829 foi utilizada como grupo externo (MZ052007.1).

Resultados

Descrição cariotípica

Ancistrus abilhoai coletados no rio Iratim (município de General Carneiro-PR) e rio dos Pardos (município de Santa Cruz do Timbó-SC) exibiram $2n=48$ em ambos os sexos, com fórmulas cariotípicas compostas de $18m+8sm+12st+10a$ (Fig.2). O bandamento C revelou poucos blocos heterocromáticos sendo destacados na região centromérica de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, destacando-se blocos fortemente corados na extensão do braço curto do par submetacêntrico 16, sendo este o par Ag-RON (Fig.2). *Hemiancistrus fuliginosus* Cardoso e Malabarba, 1999, exibiu número diplóide de $2n=56$, com fórmula cariotípica $22m+18sm+16st$ em machos e fêmeas (Fig. 3A). Poucos blocos heterocromáticos (banda C positivos), foram observados nos cromossomos desta espécie, destacando-se marcações mais fortes no par 12 em posição proximal ao centrômero braço curto e par sete em posição centromérica (Fig.3B) e algumas discretas marcações centroméricas em outros segmentos cromossômicos. O par 12 foi evidenciado pela técnica de impregnação por nitrato de prata, no braço curto em posição proximal ao centrômero, Ag-RON positivo (Fig.3B, *in box*).

As sondas de DNAr 18S e 5S, nas populações de *A. abilhoai* hibridizaram no par 16 coincidente com sítios Ag-RON em sintenia e ainda, um sítio adicional de DNAr 5S foi evidenciado no par cromossômico 19, subtelocêntrico (Fig.2C). *Hemiancistrus fuliginosus* exibiu marcações proximal ao centrômero no braço curto do par 12 com sonda DNAr 18S, coincidentes com as marcações de Ag-RON (Fig. 3C, sinal rosa), e a sonda de DNAr 5S (sinal verde) hibridizou na região pericentromérica do par 7 (Fig. 3C).

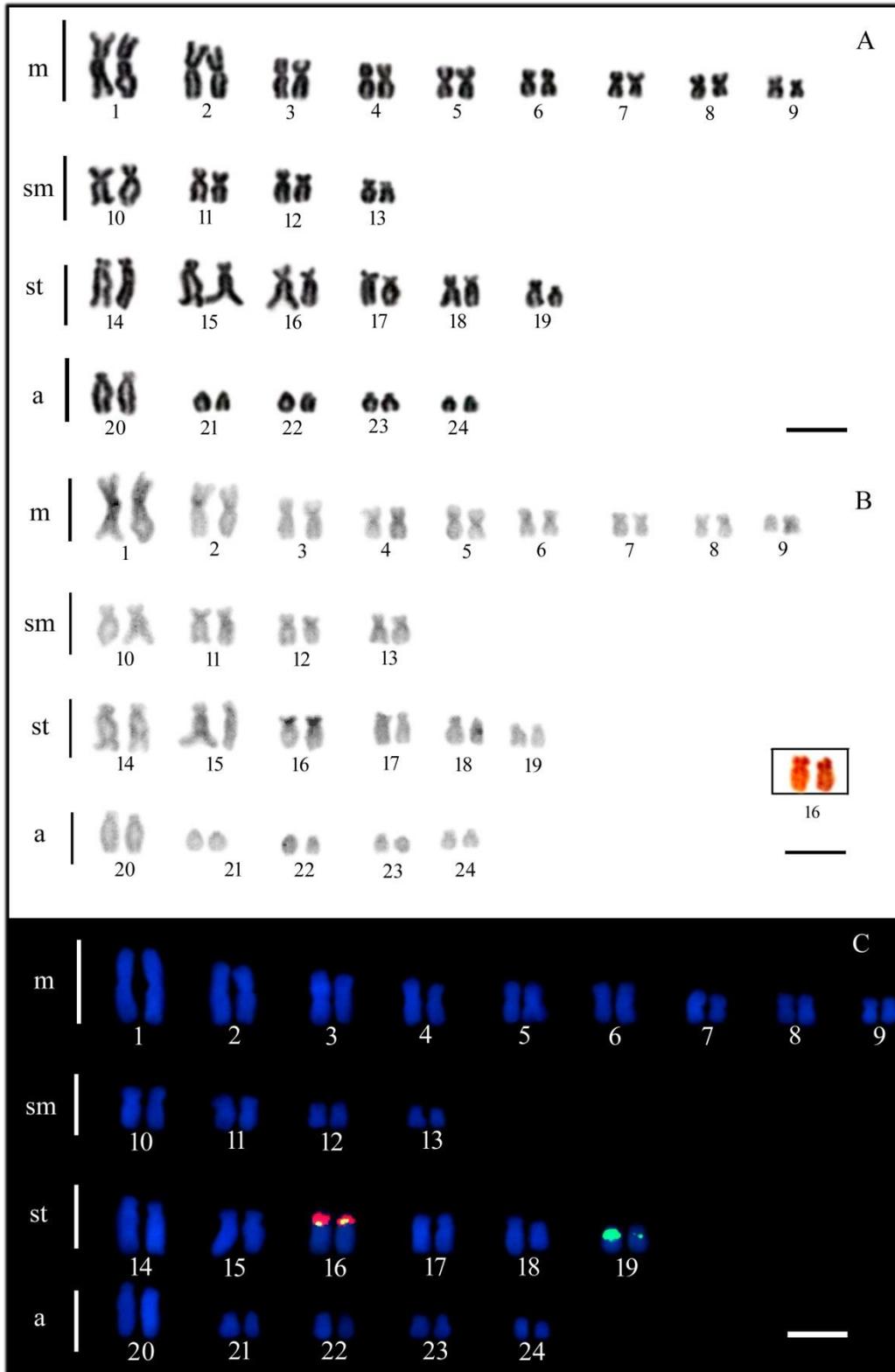


FIGURA 2. Cariótipo representativo de ambas as populações de *A. abelhoai*. (A) coloração Giemsa; (B) após Bandamento C, *in box* par 16 portador da Ag-RON; (C) cariótipo após *double FISH* com sondas de DNAr 18S(rosa) e 5S (verde). Sintenia dos sítiosde DNAr no par 16 e um sítio adicional 5S DNAr no par 19. Barra =10µm.

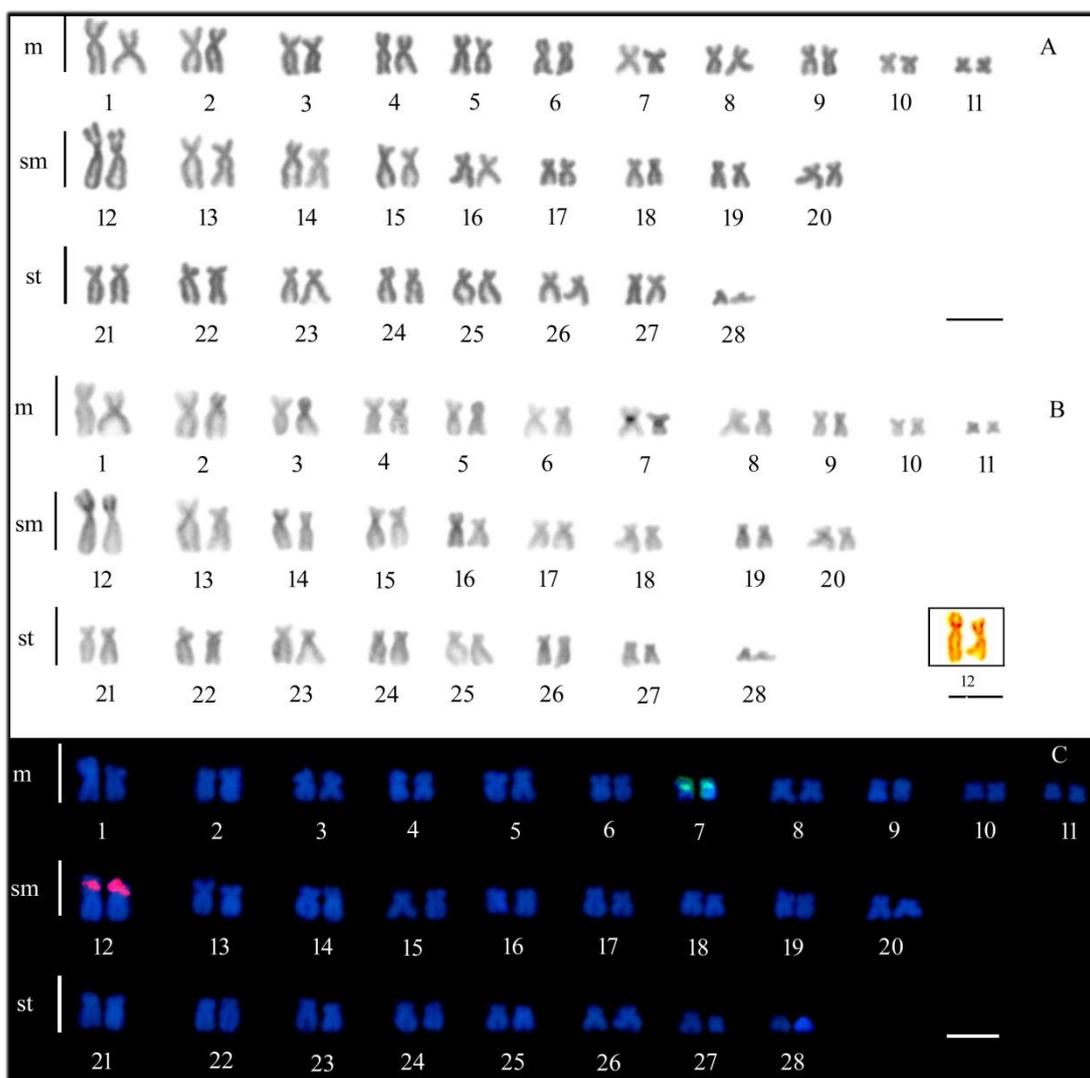


FIGURA 3. Cariótipo sequencial representativo de *H. fuliginosus*. (A) coloração com Giemsa; (B) após Bandamento C com o par 12 Ag-RON *in box*; (C) cariótipo após FISH com sondas de DNAr 18S (rosa) e 5S (verde) em (C), observem as marcações C-positivas e de FISH nos pares 12 e 7. Barra =10µm.

Análises moleculares COI

Um total de 80 sequências do gene *COI*, com 474pb após alinhamento e edição, foram obtidas, sendo duas para *Ancistrus abilhoai* e uma para *Hemiancistrus fuliginosus* do presente trabalho, e 77 sequencias disponíveis para estes dois gêneros no GenBank. Devido ao alto número de sequências, 25 haplótipos distintos foram selecionados pelo software DnaSP 6 sendo utilizados para os cálculos de distância genética K2P par a par (Material Suplementar-Tabela 2) e entre grupos (Tab.1). As populações de *Ancistrus abilhoai* (rio Iratim-General Carneiro-PR e rio dos Pardos-Santa Cruz do Timbó-SC),

apresentaram 100% de similaridade entre si, enquanto a população de *Hemiancistrus fuliginosus* apresentou 100% de similaridade para sequencias de *H. fuliginosus* provenientes do banco de dados. Não foram encontradas sequencias do gene *COI* referentes à *A. abilhoai* no banco de dados, sendo este o primeiro depósito para a espécie. *Ancistrus cirrhosus* Valenciennes, 1836, foi a espécie geneticamente mais próxima de *A. abilhoai* com distância K2P de 1.1%, enquanto que *A. chagresi* Eigenmann e Eigenmann, 1889, foi a mais distante com distância de 9.3% (Tab.1). *Hemiancistrus fuliginosus* apresentou distancia K2P média de 11.2% para *Hemiancistrus medians* Kner, 1854, e 11.1 % para *Hemiancistrus subviridis* Sabaj Pérez, Lujan e Armbruster, 2005 (Tab.1).

Na arvore de distância genética (Fig.4) construída a partir do método neighbor-joining, os espécimes de *A. abilhoai* formaram um agrupamento próximo à *A. cirrhosus*. Já o espécime de *H. fuliginosus* do presente estudo se agrupou com outro exemplar da mesma espécie, disponível no banco de dados, formando um clado distinto tendo como grupo irmão *H. medians*.

TABELA 1. Distâncias K2P médias entre grupos, obtidas a partir de sequências parciais do gene *COI* de espécies de *Ancistrus* e *Hemiancistrus* do GenBank e do presente trabalho. Em negrito na tabela, maior e menor valor de distância genética para *Ancistrus* e *Hemiancistrus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>Ancistrus abilhoai</i> *														
2. <i>Ancistrus aguaboensis</i>	0,059													
3. <i>Ancistrus brevipinnis</i>	0,039	0,072												
4. <i>Ancistrus cf. leucostictus</i>	0,086	0,087	0,072											
5. <i>Ancistrus chagresi</i>	0,093	0,116	0,095	0,112										
6. <i>Ancistrus cirrhosus</i>	0,011	0,060	0,041	0,085	0,097									
7. <i>Ancistrus cryptophthalmus</i>	0,052	0,059	0,058	0,088	0,103	0,051								
8. <i>Ancistrus dolichopterus</i>	0,080	0,097	0,087	0,084	0,097	0,083	0,084							
9. <i>Ancistrus multispinis</i>	0,033	0,067	0,029	0,086	0,090	0,032	0,051	0,084						
10. <i>Ancistrus spinosus</i>	0,083	0,112	0,082	0,112	0,035	0,088	0,087	0,089	0,090					
11. <i>Ancistrus temminckii</i>	0,061	0,073	0,048	0,026	0,093	0,065	0,068	0,067	0,062	0,096				
12. <i>Hemiancistrus fuliginosus</i> *	0,138	0,153	0,139	0,138	0,175	0,138	0,142	0,144	0,139	0,172	0,134			
13. <i>Hemiancistrus medians</i>	0,155	0,161	0,161	0,146	0,174	0,151	0,141	0,144	0,156	0,168	0,148	0,112		
14. <i>Hemiancistrus subviridis</i>	0,155	0,144	0,150	0,147	0,164	0,149	0,143	0,143	0,138	0,164	0,136	0,111	0,115	
15. <i>Rhinelepis aspera</i>	0,194	0,177	0,185	0,193	0,173	0,198	0,185	0,182	0,179	0,201	0,177	0,195	0,206	0,173

(*) Indicam as espécies descritas no presente estudo.

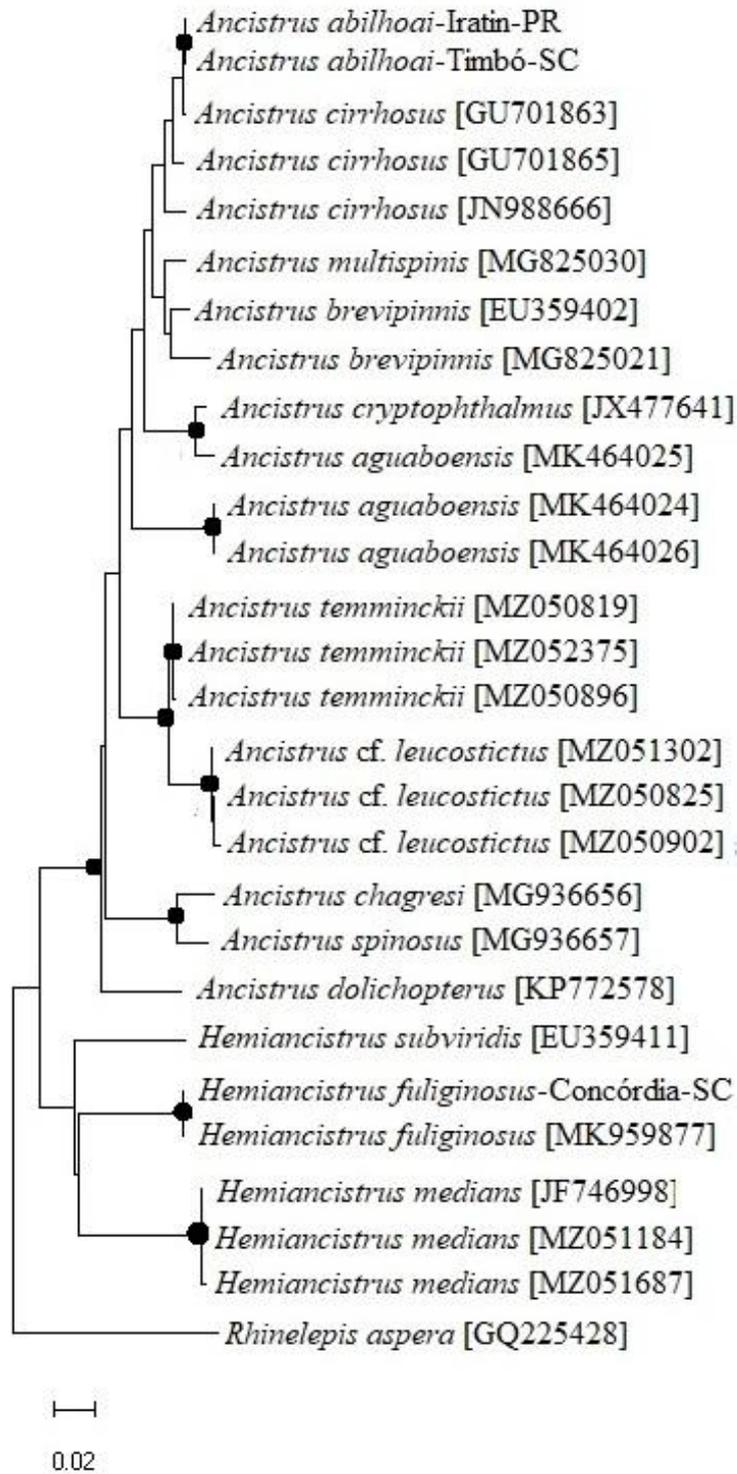


FIGURA 4. Árvore de distância genética construída pelo modelo Neighbor-joining a partir de seqüências parciais do gene *COI* de espécies de *Ancistrus* e *Hemiancistrus* do GenBank e presente estudo. Pontos pretos nos ramos representam valores de suporte acima de 95%. *Rhinelepis aspera* foi utilizada como grupo externo.

Discussão

O valor $2n=48$ apontado neste estudo para *Ancistrus abilhoai*, foi encontrado em poucas espécies desse gênero, como em *Ancistrus ranunculus* (de Oliveira *et al.*, 2007, Favarato *et al.*, 2017) e *Ancistrus abilhoai* Ribeiro *et al.* (2015). Embora nossos resultados apontem, o mesmo número diplóide para a população de *A. abilhoai* estudada por Ribeiro *et al.* (2015), foi observado diferenças na composição das suas fórmulas cariotípicas. Tais diferenças pode ser o resultado do reposicionamento do centrômero pelo segmento cromossômico, culminando em diferentes fórmulas cariotípicas em populações da mesma espécie. *Ancistrus* demonstra uma amplitude cromossômica de $2n=34$ em *A. cuiabae* (Mariotto *et al.*, 2009) à $2n=54$ cromossomos em *Ancistrus* sp. 01 (Mariotto *et al.*, 2013). Espécies desse gênero exibem predomínio de cromossomos do tipo metacêntrico e submetacêntrico em sua fórmula cariotípica, como apontado no trabalho de revisão e descrição de Glugoski *et al.* (2020). Predomínio desse tipo de cromossomo pode estar relacionado com eventos Robertsonianos do tipo fusão cêntrica. Além de eventos cariodinâmicos envolvidos no gênero *Ancistrus*, a grande variação entre os cariótipos dessas espécies, pode estar ligada à sua biologia e etologia, haja vista seus habitats heterogêneos e um comportamento restrito a determinada região, como fendas ou troncos de rios, contribui com o isolamento do fluxo gênico e possível diferenciação (de Oliveira, Souza e Venere, 2006).

O gênero *Hemiancistrus* exibe poucas descrições, tanto taxonômicas quanto citogenéticas. A descrição citogenética de *Hemiancistrus fuliginosus* do presente estudo, é a primeira para essa espécie. Atualmente existem oito espécies descritas e dentre elas, apenas cinco citogeneticamente estudadas (Tab. 2). O valor $2n=56$ para esta espécie é o primeiro encontrado em nível de tribo Ancistrini, ampliando a variação cromossômica em Ancistrini de $2n=34$ em *Ancistrus cuiabae* (Mariotto, 2004) à $2n=56$ em *H. fuliginosus* presente estudo. *H. fuliginosus* exibiu predomínio de cromossomos do tipo meta e submetacêntricos, em consonância com as demais espécies descritas para esse gênero (Tab.2). Essa característica é concordante com a proposição de Artoni e Bertollo (2001), que sugeriram um cariótipo de $2n=54$ com predominância de cromossomos metas e submetacêntricos, como condição basal para a família Loricariidae. Alguns autores têm proposto que em Ancistrini, o número diploide basal é de $2n=52$ (Artoni e Bertollo, 2001, Alves, Oliveira e Foresti, 2003, de Oliveira *et al.*, 2009) e Bueno *et al.*

(2018) em sua revisão sobre a tribo Ancistrini, apontou que grande parte dos representantes desta tribo, exibem $2n=52$, ocorrendo nos gêneros: *Ancistrus*, *Baryancistrus*, *Megalancistrus*, *Hemiancistrus*, *Hypancistrus*, *Panaque*, *Peckoltia* e *Scobinancistrus*. Entretanto, Borba *et al.* (2018) a partir de dados moleculares obtidos em espécies de *Ancistrus* das bacias dos rios Paraguai e Amazonas, concluíram que as linhagens formam uma unidade monofilética nestas bacias e o que o número diploide de 54 cromossomos seria uma condição basal para o grupo. Alves, Oliveira e Foresti (2003) sugeriram que a dinâmica cromossômica nesse grupo, tem sido principalmente a redução do número diploide e que mecanismos cromossômicos do tipo fusão, tem sido determinantes para esse efeito reducional.

A presença de heterocromatina nas regiões centroméricas é uma distribuição comum, à maioria das espécies de *Ancistrus* e *Hemiancistrus*. *Ancistrus abilhoai* e *Hemiancistrus fuliginosus* exibiram dispersão de heterocromatina similares entre si, com blocos mais evidentes na região do par portador da RON. Esse padrão também foi encontrado em *A. cirrhosus* (rio Mourão) no trabalho de Prizon *et al.* (2017) e Mariotto *et al.* (2009 e 2013) em seu estudo com *Ancistrus*, apontou essa característica em *Ancistrus claro*, *Ancistrus* sp. 01, *Ancistrus* sp. 03, *Ancistrus* sp. 04, *Ancistrus* sp. 06, *Ancistrus tombador* Fisch-Muller, Cardoso, da Silva e Bertaco, 2005, e *Ancistrus cuiabae*. Contudo espécies *Ancistrus* podem variar quanto à quantidade e presença de blocos heterocromáticos, em outras regiões dos cromossomos, exibindo número e localização de heterocromatina variável (Mariotto, Artoni e Miyazawa, 2004, Prizon *et al.*, 2016, 2017 e 2018).

Sistema de RONs simples em *Hemiancistrus* são predominantes (Tab.2), característica compartilhada para todo gênero *Ancistrus*, sendo observado sistema múltiplo apenas em *H. spilomma* (Oliveira, Souza e Venere, 2006) e sistema múltiplo em apenas *Ancistrus* sp. (Reis *et al.*, 2012). Em Ancistrini também é observado predominância de sistema de RONs simples, exceto para as espécies: *Hypancistrus* cf. *debilitera*, *Peckoltia cavatica* Armbruster e Werneke, 2005, *Peckoltia oligospila* Günther, 1864, *Peckoltia sabaji* Armbruster, 2003, *Peckoltia* sp.01, *Peckoltia* sp. 02 que exibem RONs múltiplas, como revisado no trabalho de Bueno *et al.* (2018). Sistema de RONs simples, tem sido postulado como característica basal em Loricariidae segundo Artoni e Bertollo (2001), e compartilhado esse sistema, para toda a tribo Ancistrini

majoritariamente. O gênero *Ancistrus* também compartilha desta característica na maioria de suas descrições citogenéticas, como exibido no trabalho de descrição e revisão de Glugoski *et al.* (2020).

Os resultados da hibridização *in situ* com DNAr 18S e 5S em *A. abilhoai* foram similares aos encontrados na população de *A. abilhoai* do rio Iguçu-PR por Ribeiro *et al.* (2015), indicando sintenia de sítios ribossomais 18S e 5S. Eventos de sintenia de sítios ribossomais, já foram reportados em várias espécies desse gênero. Glugoski *et al.* (2021), encontraram sintenia em *A. aguaboensis* Fisch-Muller, Mazzoni e Weber, 2001, bacia do Tocantins. Mariotto *et al.* (2011), estudando *Ancistrus* da bacia do Amazonas, Paraguai e Araguaia, das sete espécies descritas em seu trabalho, quatro exibiram sintenia: *A. claro*, *Ancistrus* sp. 08, *Ancistrus* cf. *dubius* e *Ancistrus* sp. 06. Prizon *et al.* (2017) também encontraram sintenia em três, das cinco populações de *A. cirrhosus* estudadas da bacia do alto Paraná. Sintenia na tribo Ancistrini não é exclusividade em *Ancistrus*, Santos da Silva *et al.* (2021) apontou sintenia em *Peckoltia* sp. 3 Jarumã. O evento de sítios sintênicos nesse grupo, tem sido sugerido como uma característica comum e também basal (Mariotto *et al.*, 2011, Santos da Silva *et al.*, 2021). Além da sintenia, foram encontrados sítios adicionais de DNAr 5S na população do *A. abilhoai*. Favarato *et al.* (2017) descrevendo várias espécies de *Ancistrus*, encontrou sítios simples de DNAr 5S em *A. dubius* Eigenmann e Eigenmann, 1889, *A. maximus* de Oliveira, Zuanon, Zawadzki e Rapp Py-Daniel, 2015, *A. ranunculus* Muller, Rapp Py-Daniel e Zuanon, 1994, e múltiplos em *Ancistrus* sp. “Purus”, *Ancistrus* sp. “Catalão” *A. dolichopterus* Kner, 1854, e *Ancistrus* aff. *dolichopterus*, sugerindo que sítios internos teloméricos, podem atuar no aumento e dispersão desse segmento pelo genoma. Pulverizações de sítios adicionais de DNAr 5S pelo genoma, podem ser resultantes de duplicações de cópias dessa região, e sua dispersão pode estar associada a elementos retrotransponíveis. Prizon *et al.* (2018) evidenciaram em seu estudo, associações entre elementos Rex-3 aos sítios de DNAr 18S e 5S, em diferentes populações de *Ancistrus*, da bacia do alto rio Paraná. As localizações dessas marcações em *Hemiancistrus* e *Ancistrus*, estão dispersas predominantemente em regiões intersticiais, pericentroméricas, algumas centroméricas e teloméricas, como já mencionados nos trabalhos anteriormente citados. Para Mariotto *et al.* (2011) em *Ancistrus*, a variação de DNAr 5S tem sido atribuído a mecanismo genéticos como inversões pericêntricas e permutas desiguais, resultando na atual diversidade de números de pares marcados e

tipos de cromossomos com DNAr 5S. Entretanto, Mariotto *et al.* (2011) sugeriram que sintonia de sítios ribossomais, pode ser uma condição basal para o gênero. Medeiros *et al.* (2016) apontam que a variação e ampla distribuição de sítios ribossomais, pode caracterizar um estado derivado nesse gênero.

As sequências do gene *Citocromo C oxidase subunidade I (COI)* tem sido frequentemente utilizadas na identificação de espécies de peixes, bem como em estudos populacionais (Hebert *et al.*, 2003, Waugh *et al.*, 2007). Os resultados obtidos em nosso trabalho indicam que dentro do gênero *Ancistrus*, *A. abilhoai* aproxima-se geneticamente de *A. cirrhosus*. De acordo com a abordagem clássica proposta por Hebert *et al.* (2003), pares de sequências que apresentam divergência >2%, são consideradas espécies diferentes. Nesse contexto se aplicarmos esse limiar no presente trabalho, *A. abilhoai* e *A. cirrhosus* seriam pertencentes à mesma espécie. Entretanto, o limiar de distância genética ideal a ser utilizado em espécies de peixes Neotropicais, ainda não é consenso entre os pesquisadores. Pereira *et al.* (2013) apontam que, distâncias <2%, já foram observadas para alguns grupos de peixes Neotropicais, indicando que o valor proposto por Hebert *et al.* (2003), pode em alguns gêneros, esconder a real diversidade de espécies. Queiroz *et al.* (2020) em sua reconstrução filogenética em *Hypostomus* da região Neotropical, utilizando diversos marcadores incluindo *COI*, sugerem que para espécies-irmãs, o valor de <2% defendido por Hebert *et al.* (2003), pode ser substituído por <0.5 %. Pereira *et al.* (2013) também reforçam que, 2% pode ser o ponto de partida, mas não a regra para todas as espécies Neotropicais.

Prizon *et al.* (2017), utilizando o mesmo marcador mitocondrial, associado a ferramentas citogenéticas, apontou cinco linhagens distintas de *A. cirrhosus*, para a bacia do rio Paraná, exibindo distâncias genéticas entre 3 a 5%. Borba *et al.* (2019) utilizando *COI* em *Ancistrus*, discriminou 7 linhagens da bacia do Amazonas e 8 da bacia do Paraguai, com distancia média de 8.4% entre as linhagens, sendo que duas dessas linhagens, exibia mesmo número diplóide, $2n=54$ cromossomos e com morfologia muito semelhante, entretanto o resultado do *COI*, apontou distância de 3.3% entre elas.

Na Figura 4 observa-se que as espécies de *A. aguaboensis*, formaram dois agrupamentos distintos com valores de suporte superior a 95%, um deles composto por dois haplótipos de *A. aguaboensis* e o outro com um haplótipo de *A. aguaboensis* e um de *A. cryptophthalmus* Reis, 1987. Esse resultado pode ser confirmado em (Tab.1 material suplementar), onde um dos haplótipos descritos como *A. aguaboensis* apresenta distancia de 8.8% dos demais *A. aguaboensis*, enquanto que a distância para o haplótipo de *A. cryptophthalmus* é de 1.6%. Achados como estes demonstram que, dentro de *Ancistrus* problemas relacionados à taxonomia são presentes, e o uso de ferramentas múltiplas na identificação das espécies é de fundamental importância para uma descrição mais acertiva.

Os resultados moleculares e citogenéticos de nosso estudo, auxiliaram na identificação das espécies de *Ancistrus* e *Hemiancistrus* estudadas. Os resultados para *A. abilhoai*, corroboraram os dados pré-existentes da citogenética para essa espécie conforme analisada por Ribeiro *et al.* (2015) e assim, podemos inferir que as similaridades cariotípicas entre as três populações (rio Iratin, município de General Carneiro-PR e rio dos Pardos, município de Santa Cruz do Timbó-SC) e rio Iguaçu (Ribeiro *et al.*, 2015), sugerem tratar-se da mesma espécie, consistindo esta a referência principal para *A. abilhoai*. Todavia os achados em nosso trabalho, para as populações de *A. abilhoai* divergindo em fórmula cariotípica, localização do par portador da RON e sítios adicionais de DNAr 5S, podem ser o resultado da restrição do fluxo gênico, associado a etologia dessas espécies, culminando na fixação dessas características. Também, os resultados do *COI* dão suporte para novas investigações em Ancistrini para a região do médio Iguaçu, objetivando ampliar dados de citotaxonomia dentro desse grupo. Dados do *COI* obtidos para *Ancistrus* nesse trabalho apontaram conflitos taxonômicos, sugerindo uma revisão taxonômica para algumas espécies previamente descritas. Além deste estudo trazer pela primeira vez sequências de *COI* para populações de *A. abilhoai*, este é também o primeiro a descrever citogeneticamente *H. fuliginosus*, cujos dados moleculares confirmam seu status taxonômico e sua estrutura cromossômica será referência para discussão carioevolutiva dentro desses gêneros.

TABELA 2. Descrições de espécies do gênero *Hemiancistrus* realizadas até o presente momento nas bacias hidrográficas do Brasil.

Espécies	2n	Fórmula Cariotípica	Sítios DNAr 18s (pares)	Sítios DNAr 5s (pares)	C. Sexual	Bacia Hidrográfica	Referência
<i>Hemiancistrus spiloma</i>	52	24m+22sm+6st	Múltiplo* 2,3,18	-----	ZZ/ZW	Araguaia-MT	01
<i>Hemiancistrus spinosissimus</i>	52	26m+22sm+4st	Simples* 17	-----	-----	Araguaia-MT	02
<i>Hemiancistrus</i> sp.	52	20m+20sm+12st-a	Simples*	-----	-----	Araguaia-MT	03
<i>Hemiancistrus punctulatus</i>	52	14m+40sm+12st-a	Simples** 10	-----	-----	Uruguai-RS	04
<i>Hemiancistrus fuliginosus</i>	56	22m+18sm+16st	Simples** 12	Simples 7	-----	Alto Uruguai-SC	Presente Estudo
<i>Hemiancistrus votouro</i>	—	-----	-----	-----	-----	Uruguai-RS	06
<i>Hemiancistrus meizospilus</i>	—	-----	-----	-----	-----	Uruguai-SC	07
<i>Hemiancistrus chlorostictus</i>	—	-----	-----	-----	-----	Uruguai-RS	08

Referências: 2n: número diploide, C. sexual: cromossomo sexual, m: metacêntrico, sm: submetacêntrico, st: subtelocêntrico, st-a: subteloacrocentrico. * Obtido através de impregnação por nitrato de prata Ag-RON, ** Obtido através de Hibridização *in situ* (FISH). SC: Santa Catarina, RS: Rio Grande do Sul, MT: Mato Grosso. 01 e 02: de Oliveira, Souza e Venere, (2006); 03: Artoni e Bertollo, (2001); 04: Rubert (2011); 05: Presente estudo, 06 e 07: Cardoso e Pezzi da Silva, (2004) e 08: Cardoso e Malabarba, (1999).

Agradecimentos

Universidade Estadual de Maringá-UEM e Universidade Estadual do Paraná-UNESPAR, pelo suporte logístico e experimental. Ao CNPq pelo suporte financeiro da pesquisa e Dr. Claudio Henrique Zawadzki da Universidade Estadual de Maringá-UEM pela identificação taxonômica dos espécimes.

Referências

Agencia Nacional das Águas, ANA. Acesso em 28/12/2021, link: <http://www.aguas.sc.gov.br/base-documental/bacias-hidrograficas-do-estado>, 2021.

Armbruster JW, Werneke DC, Tan M. Three new species of saddled loricariid catfishes, and a review of *Hemiancistrus*, *Peckoltia*, and allied genera (Siluriformes). *ZooKeys*. 2015. 480: 97–123. doi: 10.3897/zookeys.480.6540.

Artoni RF, Bertollo LAC. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*. 2001. 134:201–210. doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00201.x.

Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica*. 2006. 128, 1–9. doi.org/10.1007/s10709-005-0715-1.

Alves AL, Oliveira C, Foresti F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*. 2003. 56:57-63. doi.org/10.1080/00087114.2003.10589308.

Baumgartner G, Pavanelli CS, Baumgartner D, Bifi AG. Peixes do Baixo Iguçu. Maringá, Eduem. 2012. 129.

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Bras. Genet.* 1978. 1,103–120.

Bifi AG, Pavanelli CS, Zawadzki CH. Three new species of *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Iguçu basin, Paraná State, Brazil. *Zootaxa*. 2009. 2275: 41-59.

Borba RS, Mariotto S, Centofante L, Zawadzki CH, Parise-Maltempi PP. Molecular discrimination of *Ancistrus* lineages (Siluriformes: Loricariidae) using barcode DNA tool. *Mitochondrial DNA Part A*, 14 Apr. 2019. doi.org/10.1080/24701394.2019.1597071

Bueno V, Konerat JT, Zawadzki CH, Venere PC, Blanco DR, Margarido VP. Divergent chromosome evolution in Hypostominae Tribes (Siluriformes: Loricariidae): correlation of chromosomal data with morphological and molecular phylogenies. *Zebrafish*. 2018; 15(5):492– 503. doi.org/10.1089/zeb.2018.161.

Cardoso, AR, Malabarba, LR. Description of three new species of *Hemiancistrus* Bleeker, 1862 from southern Brazil (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). *Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Série Zoologia*. 1999, 12: 141-161.

Cardoso AR, Pezzi da Silva JF. Two new species of the genus *Hemiancistrus* Bleeker (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Uruguai basin. *Neotropical Ichthyology*, 2004, 2(1):1-8.

de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotrop Ichthyology*. 2007; 5:301-306. doi.org/10.1590/S1679-62252007000300010.

de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica*. 2008; 134, 243–249. doi 10.1007/s10709-007-9231-9.

de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos, MB, Zuanon J. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *J. Fish. Biol.* 2009; 75: 2209-2225. doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02450.x

de Oliveira RR, Souza IL, Venere PC. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotropical Ichthyology*. 2006; 4, 93–97. doi.org/10.1590/S1679-62252006000100010.

Favarato RM, Ribeiro LB, Feldberg E, Matoso DA. Chromosomal Mapping of Transposable Elements of the Rex Family in the Bristlenose Catfish, *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae), from the Amazonian Region. *Journal of Heredity*. 2017; 254–261. doi.org/10.1093/jhered/esw084.

Fricke R, Eschmeyer WN, Fong JD. Species by subfamily/ subfamily [Internet]. San Francisco: California Academy of Science; 2022. Available from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em 02/01/2022.

Glugoski L, Deon GA, Schott S, Vicari MR, Nogaroto V, Moreira-Filho O. Comparative cytogenetic analyses in *Ancistrus* species (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*. 2020; v. 18, p. E 200013. doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0013.

Griffiths SP. The use clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J. Fish Biol.* 2000; 57, 1453–1464. doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02224.x.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999 ;41: 95–98.

Hatanaka T, Galetti PMJr. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 2004, 122, 239–244.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci.* 2003; 270. doi.org/10.1098/rspb.2002.2218.

Howell WM, Black DA. Controlled silverstaining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 1980; 36(8):1014–15. doi.org/10.1007/bf01953855.

Ivanova, NV, Zemlak, TS, Hanner, RH, Hebert, PDN. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 2007, Volume 7, Issue 4 p. 544-548. doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33:1870–1874. doi.org/10.1093/molbev/msw054

Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.* 1964; 52(2):201– 20. doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x

Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry.* 2012; 87(7): 433-438. https://doi.org/10.3109/10520295.2012.696700

Lujan NK, Armbruster JW, Lovejoy NR, López-Fernández H. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Mol Phylogenetics Evol.* 2015; 82PtA: 269–88. doi.org/10.1016/j.ympev.2014.08.020.

Mariotto S, Artoni RF, Miyazawa CS. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae: Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia.* 2004; 57 (4):327–31. doi.org/10.1080/00087114.2004.10589413.

Mariotto S, Centofante L, Miyazawa CS, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotrop Ichthyol.* 2009;7(4):595–600. doi.org/10.1590/S1679-62252009000400006.

Mariotto S, Centofante L, Moreira Filho O. Diversity and chromosomal evolution in the genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae: Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso State, Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2013; 11(1):125 – 31. doi.org/10.1590/S1679- 62252013000100015

Mariotto S, Centofante L, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comp Cytogenet.* 2011; 5(4):289–300.doi.org/10.3897/CompCytogen. v5i4.1757.

Mariotto S, Miyazawa CS. *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes: Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomal characterization of four populations and occurrence of sex chromosomes of the type XX/XY, in the Pantanal Basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia.* 2006; 59(4):299– 304. doi.org/10.1080/00087114.2006 .10797929.

Martins C, Galetti Jr PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* Fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.* 1999; 7(5):363–67. doi.org/10.1023/a:1009216030316.

Medeiros, LA, Ginani, EG, Sousa, LM, Py-Daniel, LHR & Feldberg, E. Cytogenetic analysis of *Baryancistrus xanthellus* (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini), an ornamental fish endemic to the Xingu River, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 2016 14:e150108. doi: 10.1590/1982-0224- 20150108.

Pereira LH, Hanner R, Foresti F, Oliveira. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genet.* 2013; 14: 20. doi:10.1186/1471-2156-14-20

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83(9):2934–38. doi.org/10.1073/ pnas.83.9.2934.

Prizon AC, Borin-Carvalho LA, Bruschi DP, Ribeiro MO, Barbosa LM, Ferreira GEB, Cius A, Zawadzki CH, PortelaCastro ALB. Cytogenetic data on *Ancistrus* sp. (Siluriformes, Loricariidae) of the Paraguay River basin (MS) sheds light on intrageneric karyotype diversification. *Comp Cytogenet.* 2016; 10(4):625–36. doi.org/10.3897/CompCytogen. v10i4.8532.

Prizon AC, Bruschi DP, Borin-Carvalho LA, Cius A, Barbosa LM, Ruiz HB, Zawadzki CH, Fenocchio AS, PortelaCastro ALB. Hidden diversity in the populations of the armored catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná River basin revealed by molecular and cytogenetic data. *Front Genet.* 2017; 8:185. doi.org/10.3389/fgene.2017.00185.

Prizon, AC, Bruschi DP, Gazolla CB, Borin-Carvalho LA, Portela-Castro ALB. Chromosome spreading of the retrotransposable Rex-3 element and microsatellite repeats in karyotypes of the *Ancistrus* populations. *Zebrafish.* 2018; v. 00, p. 1-11. doi.org/10.1089/zeb.2018.1620.

Queiroz LJ, Cardoso Y, Jacot-des-Combes C, Bahechara IA, Lucena CA, Py-Daniel LR, Soarese LMS, Nylinder S, Oliveira C, Parente TE, Vilarai GT, Covain R, Buckup P, Montoya-Burgos JI. Evolutionary units delimitation and continental multilocus phylogeny of the hyperdiverse catfish genus *Hypostomus* Molecular Phylogenetics and Evolution. 2020; 145 (2020) 106711.doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106711.

Reis DAR, Brandão KO, Toledo LFA, Pazza R, Kavalco KF. Localização física dos genes ribossomais 5S e 18S em *Ancistrus* sp. (Loricariidae: Ancistrini) de Angra dos Reis/RJ, Bacia dos Rios Costeiros. Evol Conserv Biodivers. 2012; 3:39–44.

Ribeiro MO, Noleto RB, Lorscheider ACA, Porto FE, Prizon AC, Zawadzki CH, Oliveira LC, Portela-Castro ALB. Cytogenetic description of *Ancistrus abilhoai* (Siluriformes: Loricariidae) from Iguaçú River basin, southern Brazil. Genet Mol Res. 2015; 14(2):4051–57.doi. org/10.4238/2015.April.27.20.

Rubert M. (2011). Estudos citogenéticos em espécies das tribos Hypostomini e Ancistrini (Loricariidae, Hypostominae). Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-DelBarrio, JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sanchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. Mol. Biol. Evol. 2017; 34(12):3299–3302. doi.org/10.1093/molbev/msx248

Santos da Silva K, Paes de Souza AC, Pety AM, Noronha RCR, Vicari MR, Pieczarka JC, Nagamachi CY. Comparative Cytogenetics Analysis Among *Peckoltia* Species (Siluriformes, Loricariidae): Insights on Karyotype Evolution and Biogeography in the Amazon Region. Front. Genet. 2021; 12: 779-464. doi: 10.3389/fgene.2021.779464

Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res. 1972; 75(1):304–06.doi.org/10.1016/0014- 4827(72)90558-7

Waugh J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. Bioessays. 2007; 29:188–197.doi.org/10.1002/bies.20529.

Material Suplementar- Tabela 1. Sequências do gene *COI* do presente trabalho e do Genbank utilizadas nos calculos de distancia K2P e construção da árvore genética.

Espécie	Haplótipo	Localização	GenBank	Marcador	Referência
<i>A. aguaboensis</i>	1	Brazil: Ribeirão Cafuringa, tributário do rio Alto Tocantins, DF	MK464024.1	<i>COI</i>	Bagle et al. (Não publicado)
<i>A. aguaboensis</i>	2	Brazil: Ribeirão Cafuringa, tributário do rio Alto Tocantins, DF	MK464025.1	<i>COI</i>	Bagle et al. (Não publicado)
<i>A. aguaboensis</i>	3	Brazil: Ribeirão Cafuringa, tributário do rio Alto Tocantins, DF	MK464026.1	<i>COI</i>	Bagle et al. (Não publicado)
<i>A. brevipinnis</i>	4	Rio Grande do Sul: Rio Caraa, Bacia dos Sinos	MG825021.1	<i>COI</i>	Buckup et al. (Não publicado)
<i>A. brevipinnis</i>	5		EU359402.1	<i>COI</i>	Cramer et al., 2007
<i>A. chagresi</i>	6	Panamá: Rio Cocle del Norte	MG936656.1	<i>COI</i>	Bermingham et al. (Não publicado)
<i>A. cirrhosus</i>	7	Upper Paraná Basin	GU701863.1	<i>COI</i>	Pereira et al., 2013
<i>A. cirrhosus</i>	8	Upper Paraná Basin	GU701865	<i>COI</i>	Pereira et al., 2013
<i>A. cirrhosus</i>	9	Upper Paraná Basin	JN988666.1	<i>COI</i>	Pereira et al., 2013
<i>A. cryptophthalmus</i>	10		JX477641.1	<i>COI</i>	Carvalho et al. (Não publicado)
<i>A. dolichopterus</i>	11	Brazil	KP772578.1	<i>COI</i>	Collins (Não publicado)
<i>A. multispinis</i>	12	Rio de Janeiro: Mage, Cachoeira das andorinhas, Rio roncadador	MG825030.1	<i>COI</i>	Buckup et al. (Não publicado)
<i>A. spinosus</i>	13	Panamá: Dariem, Rio Tuira, Rio Membrillo	MG936657.1	<i>COI</i>	Bermingham et al. (Não publicado)
<i>A. cf. leucostictus</i>	14	French Guiana: Maripasoula, Crique Limonade	MZ050825.1	<i>COI</i>	Papa et al., 2021 (Não publicado)
<i>A. cf. leucostictus</i>	15	French Guiana: St-Laurent-du-Maroni, Upper Maroni, Tampoc River, Saut Tampoc	MZ050902.1	<i>COI</i>	Papa et al., 2021
<i>A. cf. leucostictus</i>	16	French Guiana: St-Laurent-du-Maroni, Upper Maroni, Litany River, Sector Apsik	MZ051302.1	<i>COI</i>	Papa et al., 2021
<i>A. temminckii</i>	17	Suriname: Sipaliwini, Tapanahony River, Paloemeu River, Weyu Camp"	MZ051375.1	<i>COI</i>	Papa et al., 2021
<i>A. temminckii</i>	18	French Guiana: St-Laurent-du-Maroni, Saint-Laurent du Maroni, Maroni River, Crique Voltaire	MZ050896.1	<i>COI</i>	Papa et al., 2021

<i>A. temminckii</i>	19	French Guiana: St-Laurent-du-Maroni, Saint-Laurent du Maroni, Maroni River, Crique Balate	MZ050819.1	<i>COI</i>	Papa et al., 2021 (Não publicado)
<i>H. fuliginosus</i>	01		MK959877.1	<i>COI</i>	Cardoso, Y.P et al (Não publicado)
<i>H. medians</i>	02	"French Guiana"	JF746998.1	<i>COI</i>	Fisch Muller, S. (Não publicado)
<i>H. medians</i>	03	Country "Suriname: Sipaliwini, Tapanahony River, Paloemeu River, Weyu Camp"	MZ051687.1	<i>COI</i>	Papa, Y. et al 2021
<i>H. medians</i>	04	French Guiana: St-Laurent-du-Maroni, Upper Maroni, Marouini River, Langa Sula"	MZ051184.1	<i>COI</i>	Papa, Y. et al 2021
<i>H. subviridis</i>	05		EU359411.1	<i>COI</i>	Christian A. Cramer et al 2007.

Material Suplementar- Tabela 2. Distâncias K2P obtidas a partir de sequências parciais do gene *COI* de todo o gênero *Ancistrus* e *Hemiancistrus* do GenBank e do presente trabalho.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1. <i>A. abilhoai</i> *																												
2. <i>A. abilhoai</i> *	0,000																											
3. <i>A. aguaboensis</i>	0,062	0,062																										
4. <i>A. aguaboensis</i>	0,055	0,055	0,086																									
5. <i>A. aguaboensis</i>	0,062	0,062	0,002	0,086																								
6. <i>A. brevipinnis</i>	0,033	0,033	0,066	0,064	0,069																							
7. <i>A. brevipinnis</i>	0,045	0,045	0,089	0,056	0,089	0,030																						
8. <i>A. cf. leucostictus</i>	0,086	0,086	0,087	0,087	0,087	0,077	0,061																					
9. <i>A. cf. leucostictus</i>	0,091	0,091	0,092	0,087	0,092	0,082	0,066	0,004																				
10. <i>A. cf. leucostictus</i>	0,083	0,083	0,084	0,084	0,084	0,079	0,064	0,002	0,007																			
11. <i>A. chagresi</i>	0,093	0,093	0,119	0,111	0,116	0,095	0,095	0,114	0,111	0,111																		
12. <i>A. cirrhosus</i>	0,002	0,002	0,061	0,056	0,061	0,035	0,047	0,087	0,092	0,085	0,092																	
13. <i>A. cirrhosus</i>	0,021	0,021	0,066	0,056	0,066	0,035	0,047	0,082	0,087	0,079	0,103	0,018																
14. <i>A. cirrhosus</i>	0,011	0,011	0,064	0,049	0,064	0,035	0,047	0,085	0,090	0,082	0,095	0,014	0,023															
15. <i>A. cryptophthalmus</i>	0,052	0,052	0,081	0,016	0,081	0,056	0,059	0,089	0,089	0,087	0,103	0,054	0,054	0,047														
16. <i>A. dolichoapterus</i>	0,080	0,080	0,097	0,097	0,097	0,079	0,095	0,082	0,085	0,084	0,097	0,079	0,089	0,082	0,084													
17. <i>A. multispinis</i>	0,033	0,033	0,071	0,059	0,071	0,023	0,035	0,087	0,087	0,085	0,090	0,035	0,030	0,030	0,051	0,084												
18. <i>A. spinosus</i>	0,083	0,083	0,119	0,100	0,116	0,084	0,079	0,111	0,111	0,114	0,035	0,082	0,092	0,090	0,087	0,089	0,090											
19. <i>A. temminckii</i>	0,060	0,060	0,076	0,066	0,076	0,052	0,042	0,023	0,027	0,025	0,092	0,064	0,069	0,059	0,069	0,066	0,062	0,095										
20. <i>A. temminckii</i>	0,062	0,062	0,079	0,064	0,079	0,054	0,044	0,025	0,030	0,027	0,095	0,067	0,072	0,062	0,066	0,069	0,064	0,097	0,002									
21. <i>A. temminckii</i>	0,060	0,060	0,076	0,066	0,076	0,052	0,042	0,023	0,027	0,025	0,092	0,064	0,069	0,059	0,069	0,066	0,062	0,095	0,000	0,002								
22. <i>H. fuliginosus</i> *	0,138	0,138	0,159	0,144	0,156	0,133	0,145	0,138	0,138	0,138	0,175	0,136	0,136	0,142	0,142	0,144	0,139	0,172	0,133	0,135	0,133							
23. <i>H. fuliginosus</i>	0,138	0,138	0,159	0,144	0,156	0,133	0,145	0,138	0,138	0,138	0,175	0,136	0,136	0,142	0,142	0,144	0,139	0,172	0,133	0,135	0,133	0,000						
24. <i>H. medians</i>	0,154	0,154	0,169	0,146	0,166	0,155	0,164	0,145	0,146	0,145	0,173	0,152	0,152	0,146	0,140	0,143	0,155	0,167	0,146	0,149	0,146	0,111	0,111					
25. <i>H. medians</i>	0,154	0,154	0,169	0,146	0,166	0,155	0,164	0,145	0,146	0,145	0,173	0,152	0,152	0,146	0,140	0,143	0,155	0,167	0,146	0,149	0,146	0,111	0,111	0,000				
26. <i>H. medians</i>	0,157	0,157	0,172	0,149	0,169	0,158	0,167	0,148	0,149	0,148	0,176	0,155	0,155	0,149	0,143	0,146	0,158	0,170	0,149	0,152	0,149	0,113	0,113	0,002	0,002			
27. <i>H. subviridis</i>	0,155	0,155	0,143	0,149	0,140	0,138	0,162	0,146	0,149	0,146	0,164	0,153	0,147	0,147	0,143	0,143	0,138	0,164	0,135	0,138	0,135	0,111	0,111	0,114	0,114	0,116		
28. <i>Rhinelepis aspera</i>	0,194	0,194	0,170	0,194	0,168	0,179	0,191	0,194	0,191	0,194	0,173	0,198	0,204	0,191	0,185	0,182	0,179	0,201	0,176	0,179	0,176	0,195	0,195	0,205	0,205	0,208	0,173	

(*) Indica as espécies descritas nesse estudo.

Artigo II

Diversidade cromossômica e molecular em *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), da região Sul do Brasil

Marcos Otávio Ribeiro e Ana Luíza de Brito Portela Castro

Resumo

Hypostomus é um gênero muito diverso em Loricariidae, atualmente é composto por 229 espécies. Entretanto, dados desse gênero para a região sul do Brasil ainda são escassos. Portanto, o nosso estudo objetivou ampliar dados citogenéticos para espécies desse gênero existentes em bacias hidrográficas da região sul do Brasil. Representantes de *Hypostomus* do médio Iguaçu, região de Porto União-SC/União da Vitória-PR e alto Uruguai Concórdia-SC, foram analisados a partir de dados citogenéticos e de marcador molecular de DNA mitocondrial. *Hypostomus* cf. *agna* revelou $2n=76$, *Hypostomus commersoni* apresentou $2n=68$ com variação interpopulacional na fórmula cariotípica e espécimens de *H. myersi* revelaram dois números diploides, $2n=74$ e 75 sugerindo um polimorfismo cromossômico intrapopulacional. RON simples foram observadas em *Hypostomus* cf. *agna*, *Hypostomus myersi*, e sistema múltiplo com variação de número e posição nas populações de *H. commersoni*. O bandamento C, exibiu marcações conspícuas e associadas a RON, nas populações de *H. commersoni*, marcações predominantemente pericentroméricas em *H. myersi* e marcações teloméricas em cromossomos do tipo acrocêntrico em *Hypostomus* cf. *agna*. A análise das sequências parciais do gene *Citocromo c oxidase I (COI)* de *H. myersi* apresentou 100% de similaridade com outras disponíveis na base de dados. *Hypostomus* cf. *agna* exibiu 100% de similaridade com *H. isbrueckeri* e 0.6% de distância genética com *H. luteus*. Nossos resultados citogenéticos e moleculares apontaram, possíveis conflitos taxonômicos em *Hypostomus*, sugerindo uma futura revisão na identificação de alguns espécimes desse gênero, elucidando então, o seu real *status* taxonômico.

Palavras-chave: Alto Uruguai, Citogenética, *COI*, *Hypostomus commersoni*.

Chromosomal and molecular diversity in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from southern Brazil

Abstract

Hypostomus is a very diverse genus in Loricariidae, currently consisting of 229 species. However, data on this genus for the southern region of Brazil are still scarce. Therefore, our study aimed to expand cytogenetic data for species of this genus found in river basins of southern Brazil. Representatives of *Hypostomus* from the middle Iguaçu, Porto União-SC/União da Vitória-PR and upper Uruguay Concórdia-SC, were analyzed using cytogenetic data and mitochondrial DNA molecular markers. *Hypostomus* cf. *agna* revealed $2n=76$, *Hypostomus commersoni* showed $2n=68$ with interpopulational variation in the karyotypic formula and specimens of *Hypostomus myersi* revealed two diploid numbers, $2n=74$ and 75 suggesting an intrapopulational chromosomal polymorphism. Single NOR were observed in *Hypostomus* cf. *agna*, *Hypostomus myersi*, and multiple system with number and position variation in *H. commersoni* populations. C-banding showed conspicuous markings associated with NOR in *H. commersoni* populations, predominantly pericentromeric markings in *H. myersi*, and telomeric markings on chromosomes of the acrocentric type in *Hypostomus* cf. *agna*. Analysis of partial sequences of the cytochrome c oxidase I (COI) gene from *H. myersi* showed 100% similarity with others available in the database. *Hypostomus* cf. *agna* exhibited 100% similarity with *Hypostomus isbrueckeri* and 0.6% genetic distance with *Hypostomus luteus*. Our cytogenetic and molecular results pointed to possible taxonomic conflicts in *Hypostomus*, suggesting a future revision in the identification of some specimens of this genus, thus elucidating its real taxonomic status.

Key-words: COI, Cytogenetic, High Uruguai basin, *Hypostomus commersoni*.

Introdução

O sul do Brasil é composto por inúmeros rios e riachos, que desempenham papel fundamental na abundância de recursos hídricos, como também potencial hidroelétrico. A região do alto Uruguai que abriga parte do rio Uruguai, divisa dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, é composta por uma sequência de poços e corredeiras percorrendo um vale bastante encaixado (Di Pérsia e Neiff, 1986 e Zaniboni-Filho e Shulz 2003). Outro rio de grande relevância para a região sul do Brasil é o rio Iguaçu, que abrange uma área de aproximadamente 72.000 km² da qual, 79% pertencem ao estado do Paraná, 19% ao estado de Santa Catarina e 2% à Argentina (Eletrosul, 1978). O médio Iguaçu é considerado trecho entre Porto Amazonas-PR e União da Vitória-PR, tal região é composta por inúmeras cachoeiras pequenos rios e riachos de cabeceira, que desembocam no rio Iguaçu (Maack, 1981).

As condições peculiares dessas bacias propiciam a formação de espécies endêmicas e restritas a pequenas áreas, córregos ou microbacias. Dentre as espécies encontradas nessa região, representantes da família Loricariidae estão amplamente distribuídos. Loricariidae exibe 229 espécies (Fricke et al. 2022), e dentro dessa família o gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803, é caracterizado por agregar características singulares que propiciam uma ótima adaptação a essas condições. Seu corpo recoberto por placas ósseas e boca modificada em formato de ventosa, contribui com sua dispersão em locais como corredeiras, poços e margens costeiras (Armbruster, 2004, Chiacho, Oliveira e Montoya-Burgos 2008, Garavello e Garavello 2004). São caracterizados por exibirem uma elevada variação intraespecífica em padrões de coloração (Weber 2003). A problemática para a descrição dessas espécies, também se encontra na grande variação morfológica do grupo (Dias e Zawadzki 2018).

A citogenética clássica associada a técnicas moleculares, tem contribuído para a real estimativa de diversidade neste grupo. Mezzomo et al. (2020) aponta que 57% dos trabalhos publicados sobre o gênero são utilizando marcadores citogenéticos. Em aspectos citogenéticos, *Hypostomus* exibe uma amplitude cromossômica de $2n=64$ cromossomos em *H. cochliodon* Kner, 1854, Cereali (2006) à $2n= 84$ em *H. perdido*

Zawadzki, Tencatt e Froehlich, 2014, Cereali et al. (2008). Essa amplitude cromossômica é sugerida por alguns autores, como resultado de rearranjos cromossômicos do tipo fissão cromossômica, acarretando no aumento do número diploide, seguido de inversões pericêntricas, originando uma gama de fórmulas cariotípicas (Artoni e Bertollo 1996 e 2001, Alves et al. 2005, Kavalco et al. 2005; Bueno et al. 2012. Sistemas de determinação de cromossomos sexuais neste gênero ainda restritos á algumas espécies, como em estágio inicial em *H. soniae* Hollanda Carvalho e Weber, 2005, XX/XY (Oliveira et al. 2019), *Hypostomus* cf. *plecostomus* ZZ/ZW (Oliveira et al. 2015), XX/XY em *H. ancistroides* Ihering, 1911, e *H. macrops* Eigenmann e Eigenmann, 1888, (Michele et al. 1977) e *Hypostomus* sp. ZZ/ZW (Artoni et al. 1998). Cromossomos supranumerários já foram descritos em duas espécies desse gênero, *Hypostomus* sp. 3 (Cereali et al. 2008) e *Hypostomus* sp. Xingu-3 (Milhomem et al. 2010).

Descrições citogenéticas em espécies de *Hypostomus* para a bacia do alto Uruguai-SC e médio Iguaçu-SC são recentes e ainda escassas. Lorscheider et al. (2018) descreveram *H. myersi* Gosline, 1947, *H. commersoni* Valenciennes, 1836, e *H. derbyi* Haseman, 1911, para a região do médio Iguaçu, utilizando ferramentas de citogenética e Sorrentino (2019) utilizando ferramentas de DNA barcode, descreveu 5 espécies de *Hypostomus* para a região do alto Uruguai-SC: *H. spiniger* Hensel, 1870, *H. isbrueckeri* Weber e Malabarba, 1990, *H. roseopunctatus* Reis, Weber e Malabarba, 1990, *H. luteus* Godoy, 1980, e *H. uruguayensis* Reis, Weber e Malabarba, 1990. Considerando a ampla diversidade deste gênero na região Neotropical e a sua complexidade taxonômica, ao passo que mais espécies desse gênero são descritas, se faz necessário e importante, ampliar os estudos, utilizando diversas ferramentas da citogenética e moleculares, objetivando buscar a real estimativa e abundância de espécies nessas localidades, angariando novas perspectivas na discussão taxonomica de *Hypostomus*, na região sul do Brasil.

Materiais e Métodos

Amostras biológicas

Espécimes do gênero *Hypostomus* foram utilizados em estudos citogenéticos e moleculares (Fig.1). Para *Hypostomus* cf. *agna* foram coletados sete fêmeas e três machos, rio dos Pardos, cidade de Porto União-SC, distrito de São Pedro do Timbó (26°29'37"S 51°00'35"W). Duas populações de *Hypostomus commersoni* foram coletadas, onze machos e seis fêmeas, rio Fragosos cidade de Concórdia-SC (27°13'27.7"S 52°10'07.9"W) e quatro fêmeas e dois machos coletados no rio Iguaçu, cidade de Porto Vitória-PR (26°08'49"S 51°14'35"W). Também foram coletados espécimes de *Hypostomus myersi*, cinco fêmeas e um macho rio Timbó e *Hypostomus commersoni* um macho e duas fêmeas cidade de Porto União-SC, distrito de Santa Cruz do Timbó-SC (26°28'04.9"S 50°49'11.4"W).

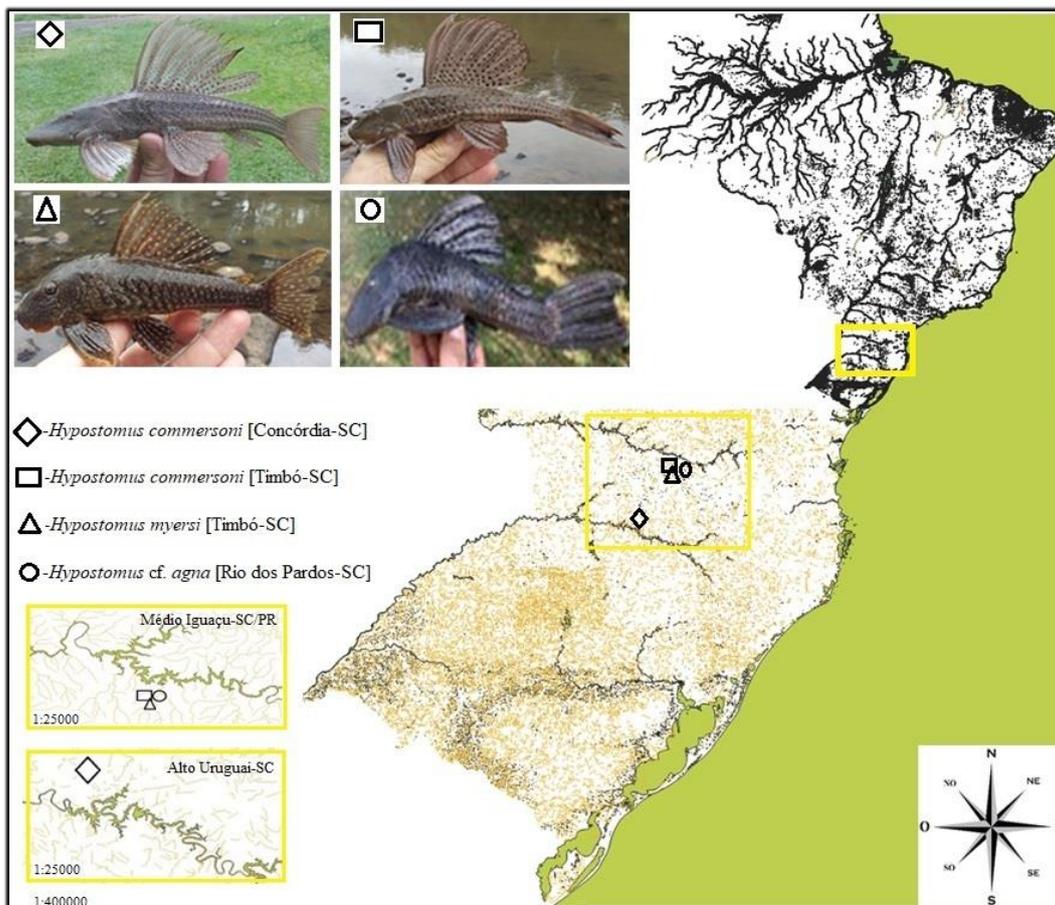


FIGURA 1. Representação geográfica dos pontos da região sul do Brasil, onde foram coletados os espécimes. Em destaque nos quadrantes amarelos, as localidades amostradas nas coletas. Símbolos significam os locais/espécimes coletadas. Tracejados na cor marrom claro, simbolizam as microbacias e áreas de drenagem e em verde áreas de inundação.

Procedimentos de citogenética convencional

Após as coletas os espécimes foram transportados em caixas aeradas para o laboratório de citogenética de peixes da Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), *campus* União da Vitória-PR. A identificação dos exemplares foi realizada pelo taxonomista Dr. Claudio Henrique Zawadzki (Universidade Estadual de Maringá) e alguns exemplares depositados na coleção de Limnologia, Ictiologia e Aquicultura do Núcleo de Pesquisa (NUPÉLIA) (NUP-21921), Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. As coletas dos foram autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente, através do Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBIO) número da licença 68533-1. Todo o procedimento de eutanásia e sacrifício dos animais realizado nesse trabalho, foi autorizado pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Paraná (CEUA número 002-2021). Os exemplares foram anestesiados e eutanasiados por meio de superdosagem com óleo de cravo (Griffiths, 2000) e os cromossomos mitóticos foram obtidos através de células do rim de acordo com Bertollo et al., (1978). As regiões organizadoras do nucléolo (RONs), foram reveladas por meio da técnica de impregnação por nitrato de prata (Howell e Black, 1980). As regiões de heterocromatina constitutiva, foram determinadas pela técnica de bandeamento C (Sumner, 1972), e coradas com iodeto de propídeo (Lui et al. 2012).

O mapeamento físico das sequências de DNAr 5S e 18S, foi realizado pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) de acordo com Pinkel et al. (1986), utilizando sondas obtidas de *Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850, (Martins e Galetti, 1999) e *Prochilodus argenteus* Spix e Agassiz, 1829, (Hatanaka e Galetti, 2004). As sondas foram marcadas por Nick Translation com biotina-16-dUTP (DNAr 5S) e digoxigenina-11-dUTP (DNAr 18S). O processo de hibridização foi conduzido sob condições de alta estringência (77%). Os sinais foram detectados utilizando antidigoxigenina-rodamina conjugada para sondas de DNAr 18S e avidina-FITC conjugada para sondas de DNAr 5S. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI. A captura das imagens foi realizada através da utilização do microscópio de fluorescência modelo Zeiss Axio Lab. A1. Para a montagem dos cariótipos, os cromossomos foram pareados em grupos de: (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico, (st) subteloentríco e (a) acrocêntrico conforme Levan et al. (1964).

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

A extração total de DNA genômico foi realizada a partir de amostras de fígado, utilizando o kit Promega Wizard [®]Genomics, seguindo as instruções do fabricante. Após a extração o DNA, foi quantificado utilizando eletroforese em gel de agarose a 1% por comparação com o padrão de concentração de DNA lambda. A região mitocondrial da Subunidade 1 (*COI*) citocromo oxidase 1, foi parcialmente amplificada utilizando os iniciadores L6448-F2 (5'-TCGACTAATCATAAAGATCGGCGCAC-3') e H7152 (5'-CACCTCAGGGGTGTCCGAARAAYCARA-3') descritos por Ivanova et al., (2007). A reação em cadeia da polimerase (PCR) consistiu em Tris-KCl [Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM], MgCl₂ (1,5 mM), primers (2,5 µM cada), dNTPs (0,1 mM cada), Taq Polimerase de DNA (1U) e DNA modelo na concentração de 5ng/ul para perfazer um volume final de 25 µl. As condições incluíam uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 30s, 52°C durante 30s e 72°C durante 1 min com um ciclo de alongamento final a 72°C durante 10 min.

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas utilizando-se o software BioEdit (Hall, 1999) e MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016) respectivamente. Sequências de espécimes de *Hypostomus* descritos para a região do médio Iguaçu-SC/PR e alto Uruguai-SC disponíveis no Genbank/BOLD, foram utilizadas para seleção de haplótipos realizada pelo software DNAsp 6 (Rozas et al. 2017). As distâncias genéticas foram calculadas par a par entre os haplótipos pelo método de Kimura-2-parametros (Tab.1), e as árvores genéticas construídas pelo modelo de neighbor-joining através do software MEGA 7.0. *Pterygoplichthys etentaculatus* foi utilizado como grupo externo (HM404959).

Resultados

Descrição cariotípica

Hypostomus cf. agna apresentou um número diploide de $2n=76$, com fórmula cariotípica composta de $10m+8sm+10st+48a$ (Fig.2A). Blocos heterocromáticos conspícuos foram evidenciados no par seis, em região proximal ao centrômero do braço curto e em região subtelomérica do braço longo do mesmo par. No par 22 foi observado marcação subtelomérica no braço longo, e em região terminal dos pares: 26, 27, 28, e 30 (Fig. 2B). O par 22 foi marcado pelo nitrato de prata em posição terminal do braço longo sendo portanto, Ag-RON positivo (Fig. 2B, *in box*).

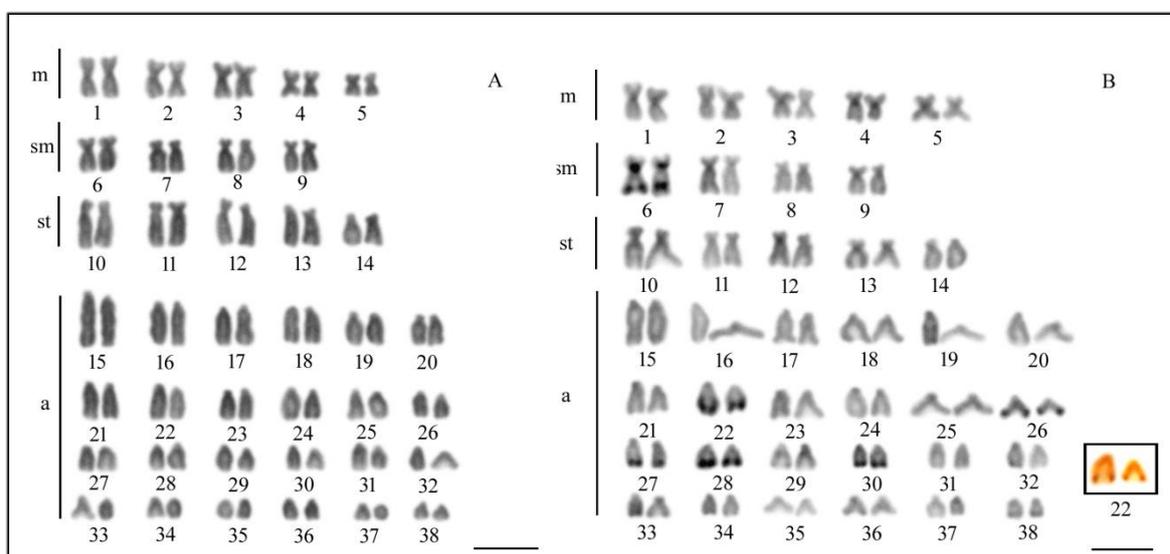


Figura 2. Cariótipo de *Hypostomus cf. agna* do rio do Pardos-SC, colônia Quati. Cariótipo (A) submetido à técnica de Giemsa e (B) Bandamento C, *in box* par portador da Ag-RON, barra = 10 μ m..

Dos seis exemplares de *Hypostomus myersi* coletado, quatro apresentaram cariótipo $2n=74$ e dois exibiram cariótipo $2n=75$ (Fig. 3) sendo um macho e uma fêmea com fórmula cariotípica de $8m+10sm+17st+40a$. O cromossomo extra foi observado em 95% das células metafásicas nos dois exemplares. Blocos heterocromáticos foram observados no par cinco, em região pericentromérica do braço curto, e outras marcações discretas em regiões centroméricas e terminais de outros segmentos cromossômicos (Fig.3B). A impregnação por nitrato de prata, apontou marcações no par 36 em posição terminal do braço longo (Fig. 3B *in box*).

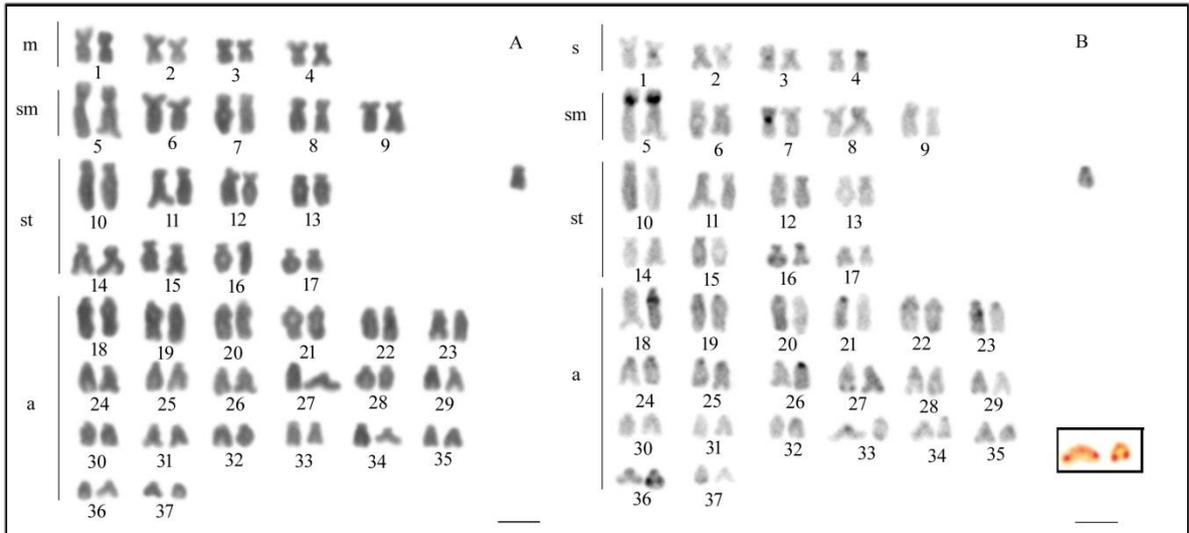


Figura 3. Cariótipo de *H. myersi* da população rio Timbó-SC. Cariótipo com $2n=75$ após coloração Giemsa (A) e banda C (B), *in box* par portador da Ag-RON. barra = $10\mu\text{m}$. Em destaque o cromossomo extra alinhado com os demais subtelocêntricos.

A duas populações de *Hypostomus commersoni*, rio Fragosos Concórdia-SC e Rio Iguaçu-PR exibiram um mesmo número diploide, $2n=68$, com fórmulas cariotípicas de $12m+8sm+20st$ e $28a$ (Fig.4A) e $10m+10sm+20st$ e $28a$ (Fig.4C), respectivamente. Após o bandeamento C, foram observadas marcações heterocromáticas em regiões pericentroméricas nos pares 7, 9 e 13 e no braço longo de um dos homólogos do par 23, na população do rio Fragosos (Fig. 4B). A população do rio Iguaçu, exibiu blocos fortemente corados em grande extensão do braço longo do par 22, revelando também um heteromorfismo de tamanho destes blocos. Outras marcações em regiões preferencialmente terminais foram observadas como em alguns dos homólogos dos pares: 2, 13, 18 e 28 (Fig. 4D) população do rio Iguaçu. A impregnação por nitrato de prata Ag-RON, revelou marcações terminais em cinco cromossomos do tipo subtelocêntrico, pares 13, 15 e um dos homólogos do par 16 na população do rio Fragosos (Fig.4B *in box*). Na população do rio Iguaçu, os sítios Ag-RON foram identificados no par 22 e em um dos homólogos do par 2e 13.

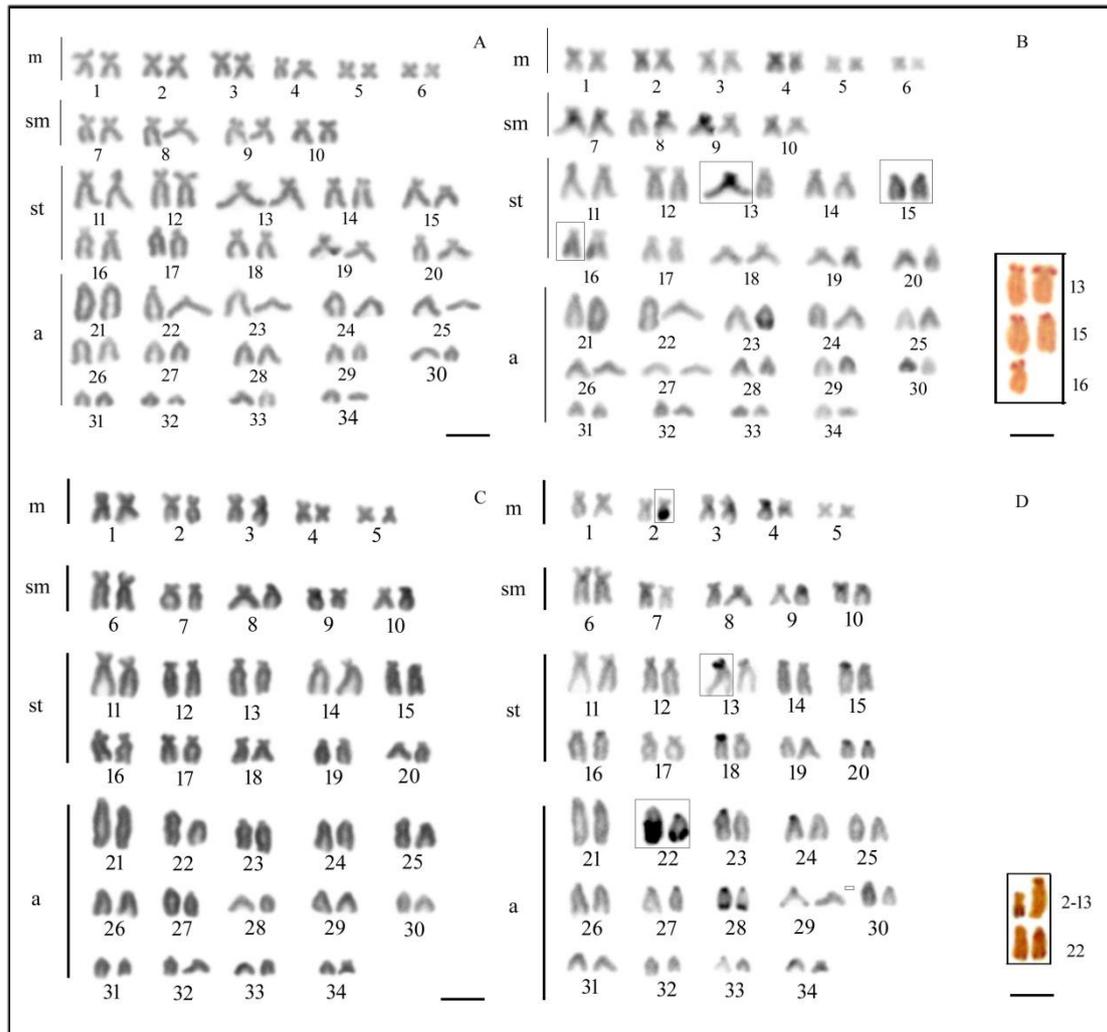


Figura 4. Cariótipo de *H. commersoni*, população rio Fragosos-SC, Giemsa (A) e (B) bandamento C. População de *H. commersoni* rio Iguazu-PR, Giemsa (C) e (D) bandamento C, *in box* para ambos os cariótipos são destacados os pares Ag-RON, barra = 10μm.

Os sítios ribossomais evidenciados pelo FISH em *Hypostomus* cf. *agna* com sondas de DNAr 18S e DNAr 5S, demonstraram marcações coincidentes com o par 22 (18S, sinal rosa) e a sonda 5S hibridizou no par três, em posição pericentromérica (Fig.5).

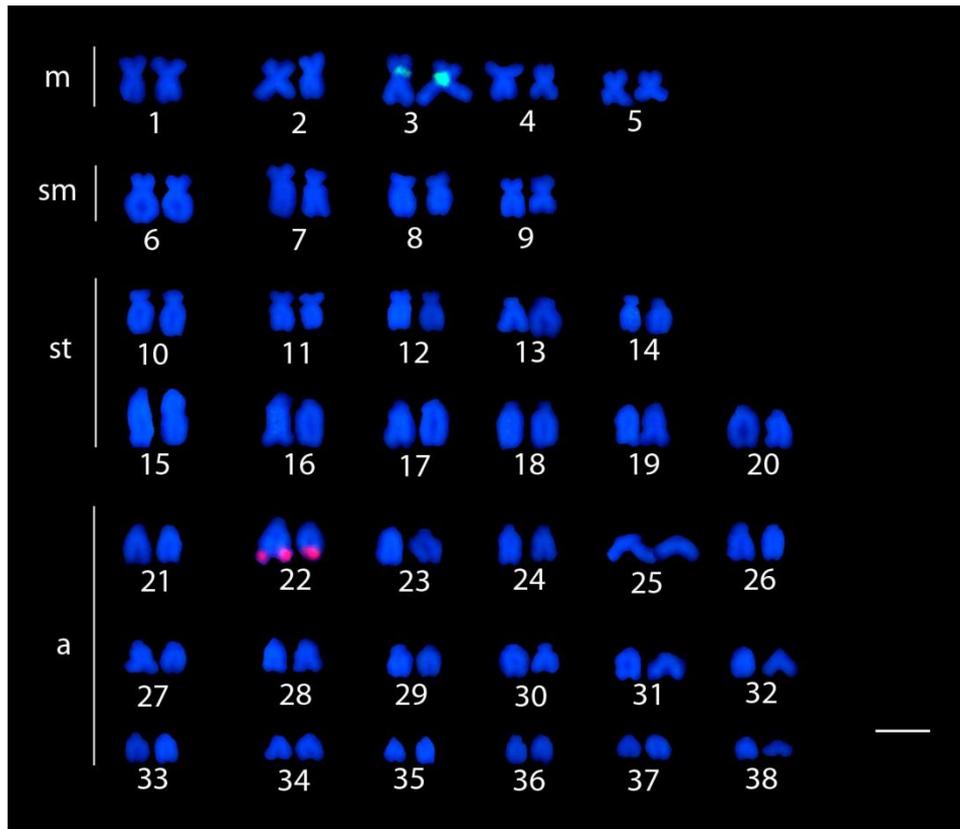


Figura 5. Cariótipo de *Hypostomus cf. agna* rio do Pardos-SC, após *double FISH*. Sinais fluorescentes em rosa, representam marcações com sonda DNAr 18S e em verde com a sonda DNAr 5S, barra = 10µm.

Análises moleculares COI

Um total de 19 sequências com 494 pb, após o alinhamento e edição, foram obtidas para o gene *COI*, sendo uma para *H. myersi*, duas para *H. commersoni* e uma para *Hypostomus cf. agna* do presente trabalho. As demais sequências referentes aos diferentes haplótipos obtidos a partir do DnaSp, foram obtidas do GenBank/BOLD para *Hypostomus* da região do médio Iguaçu-PR/SC e Alto Uruguai-SC (Material Suplementar – Tabela 1). *H. myersi* apresentou 100% de similaridade com a sequência de *H. myersi* disponível no banco de dados e apontou 3.6% de distância genética com *H. commersoni* e 3.5% para *Hypostomus cf. agna*. *Hypostomus cf. agna* exibiu distância genética de 5.3% para os espécimes de *H. commersoni* do presente trabalho e 100% de similaridade com *Hypostomus isbrueckeri* e 0.6% de distância genética para *Hypostomus luteus* (Tab.1).

Os dois espécimes das duas populações de *H. commersoni* descritas nesse trabalho, exibiram 100% de similaridade entre si (Tab.1), agrupando-se com as demais

populações de *H. commersoni* descritas para essa região (Fig.6). Também foi observado que os espécimes de *H. commersoni* do presente estudo, exibiram 100% de similaridade com *Hypostomus spiniger* e distância genética de 0.8% de *Hypostomus derbyi* (Tab.1). Esses resultados também são observados na figura seis, onde *H. spiniger* e *H. derbyi*, agruparam-se em um clado majoritário de *H. comersoni*, com valor de suporte superior a 95%. *Hypostomus* cf. *agna*, *H. isbrueckeri* e *H. luteus*, formam um clado bem evidente, com valor de suporte superior a 95% (Fig.6).

TABELA 1. Distâncias K2P obtidas a partir de sequências parciais do gene *COI* de espécimes de *Hypostomus*, descritas para bacia do médio Iguazu-PR/SC e alto Uruguai-SC e sequências do presente trabalho.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. <i>Hypostomus</i> cf. <i>agna</i> (Rio dos Pardos-SC)*																			
2. <i>Hypostomus commersoni</i> (Concórdia-SC)*	0,053																		
3. <i>Hypostomus commersoni</i> (Timbó-SC)*	0,053	0,000																	
4. <i>Hypostomus commersoni</i>	0,053	0,000	0,000																
5. <i>Hypostomus commersoni</i>	0,053	0,000	0,000	0,000															
6. <i>Hypostomus commersoni</i>	0,055	0,006	0,006	0,006	0,006														
7. <i>Hypostomus commersoni</i>	0,057	0,004	0,004	0,004	0,004	0,010													
8. <i>Hypostomus commersoni</i>	0,062	0,012	0,012	0,012	0,012	0,010	0,016												
9. <i>Hypostomus commersoni</i>	0,060	0,014	0,014	0,014	0,014	0,012	0,018	0,002											
10. <i>Hypostomus derbyi</i>	0,049	0,008	0,008	0,008	0,008	0,010	0,012	0,016	0,019										
11. <i>Hypostomus isbrueckeri</i>	0,000	0,053	0,053	0,053	0,053	0,055	0,057	0,062	0,060	0,049									
12. <i>Hypostomus luteus</i>	0,006	0,055	0,055	0,055	0,055	0,057	0,060	0,064	0,062	0,051	0,006								
13. <i>Hypostomus myersi</i> (Timbó-SC)*	0,035	0,036	0,036	0,036	0,036	0,038	0,038	0,040	0,042	0,036	0,035	0,038							
14. <i>Hypostomus myersi</i>	0,035	0,036	0,036	0,036	0,036	0,038	0,038	0,040	0,042	0,036	0,035	0,038	0,000						
15. <i>Hypostomus spiniger</i>	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,004	0,012	0,014	0,008	0,053	0,055	0,036	0,036					
16. <i>Hypostomus uruguayensis</i>	0,021	0,058	0,058	0,058	0,058	0,060	0,062	0,067	0,064	0,053	0,021	0,023	0,040	0,040	0,058				
17. <i>Hypostomus uruguayensis</i>	0,021	0,058	0,058	0,058	0,058	0,060	0,062	0,067	0,064	0,053	0,021	0,023	0,040	0,040	0,058	0,000			
18. <i>Hypostomus uruguayensis</i>	0,021	0,058	0,058	0,058	0,058	0,060	0,062	0,067	0,064	0,053	0,021	0,023	0,040	0,040	0,058	0,004	0,004		
19. <i>Pterygoplichthys etentaculatus</i>	0,073	0,078	0,078	0,078	0,078	0,080	0,082	0,073	0,076	0,078	0,073	0,071	0,064	0,064	0,078	0,076	0,076	0,080	

* Indica as espécies descritas no presente trabalho. *Pterygoplichthys etentaculatus* foi utilizado como grupo externo.

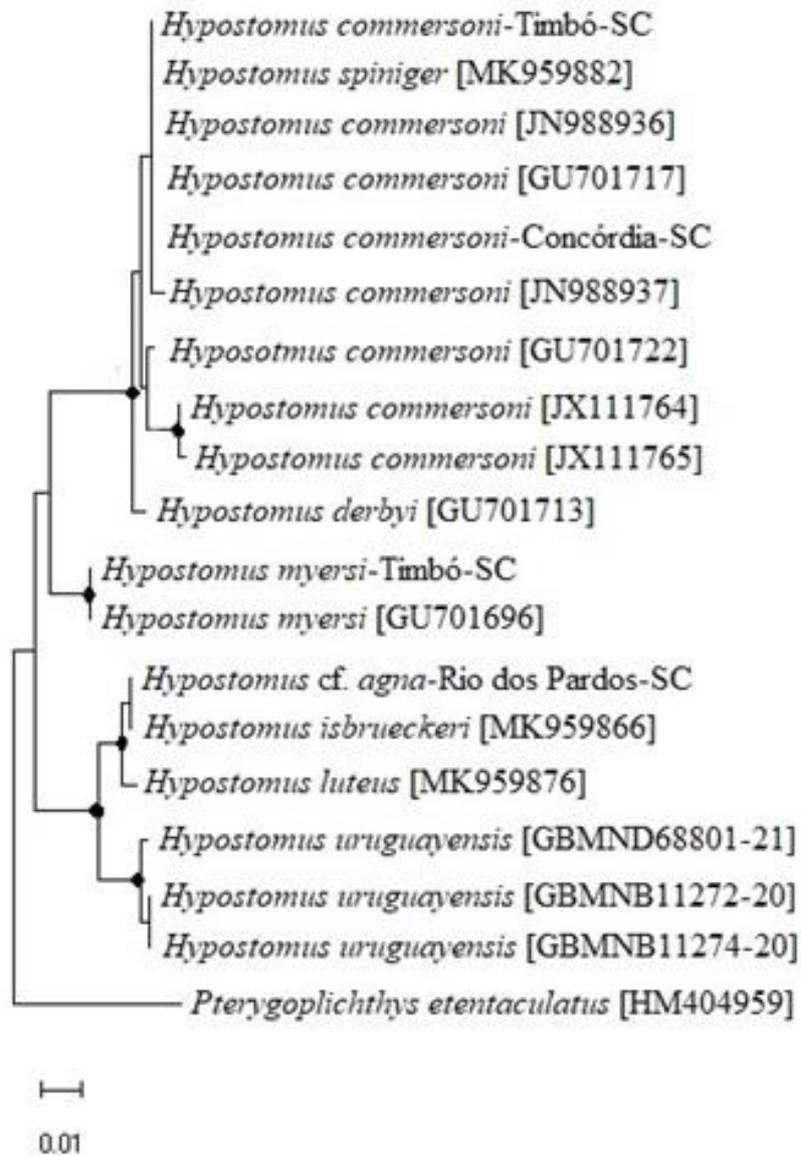


Figura 6. Árvore gênica construída pelo modelo Neighbor-joining a partir de sequências parciais do gene *COI* de espécies de espécies de *Hypostomus* descritas para o médio Iguaçu-SC/PR e alto Uruguai-SC do GenBank e Bold e do presente estudo. Pontos pretos nos ramos representam valores de suporte acima de 95%. *Pterygoplichthys etentaculatus* foi utilizado como grupo externo.

Discussão

A análise citogenética para as três espécies de *Hypostomus* do presente trabalho, revelou números diploides similares aos dados já existentes na literatura para *Hypostomus* cf. *agna*, *H. myersi* e *H. commersoni*. Contudo, variações cromossômicas inter e intrapopulacional são frequentes em *Hypostomus* e tornam-se evidentes à medida que novas descrições citogenéticas são registradas para essas espécies de diversas bacias hidrográficas brasileiras. Além da amplitude de números diploides existentes no gênero (64-84) cromossomos, há uma predominância de cromossomos dos tipos subtelo-acrocêntricos na estrutura cromossômica da maioria das espécies (Artoni e Bertollo, 2001). Artoni e Bertollo (2001) sugeriram haver uma correlação entre espécies de *Hypostomus* com números diploides elevados e maior porcentagem cromossomos dos tipos subteloacêntricos e acrocêntricos, o que poderia ser resultado de inúmeros rearranjos cromossômicos, em particular fissões cêntricas. Os mesmos autores ainda reforçam que eventos do tipo fissão cêntrica, não é exclusividade em peixes e tem sido observada em outros vertebrados.

Hypostomus cf. *agna* que revelou $2n=76$ cromossomos com $10m+8sm+10st+48a$ (presente estudo), enquanto que Martinez et al. (2011) registrou um valor de $2n=74$ ($8m+10sm+32st+24a$) para uma espécie designada como *Hypostomus* aff. *agna* coletada no Córrego Cavallo, Jaraguá do Sul (SC). Estas são as únicas referências para *H. agna* sendo ambas as populações analisadas provenientes da região Sul, apontando a necessidade de revisões taxonômicas para esta espécie. Recentemente, Navarro de Paula (2021), apontou em seu estudo com três populações de *Hypostomus tietensis* Ihering, 1905, populações com $2n=72$, fórmula composta de $8m+8sm+20st+36a$ e $2n=76$ com $8m+6sm+24st+38a$ cromossomos sugerindo a existência de espécies crípticas.

Dados cariotípicos divergentes também têm sido registradas para a espécie *Hypostomus commersoni*. O número diploide frequente para populações desta espécie é $2n=68$ (Bueno et al. 2013, Lorscheider et al. 2018), contudo, uma população de *H. commersoni* do rio Forquetinha (vale dos Canudos, RS) analisada por Rubert et al. (2016) apresentou um $2n=66$ cromossomos, enquanto que as demais populações analisadas até o presente momento apresentaram $2n=68$ cromossomos, incluindo dados do presente estudo. Bueno et al. (2013) encontraram $2n=68$ para *H. commersoni* do

baixo rio Iguaçu com fórmula cariotípica composta de $12m+14sm+14st+28a$ e Maurutto et al. (2012) também encontraram $2n=68$ cromossomos com $12m+12sm+8st+36a$ para *H. commersoni* médio Iguaçu-PR. Navarro de Paula (2021) aponta em seu estudo de revisão para esse gênero, que $2n=68$ totaliza 21% das descrições citogenéticas, prevalecendo número alto de subtelocêntricos e acrocêntricos, frequência para todo gênero. Estas divergências demonstram a complexidade citotaxonômica em espécies de *Hypostomus*.

Hypostomus myersi exibiu variação intrapopulacional em número diplóide e fórmula cariotípica, com $2n=74$ e $2n=74+1$. Lorscheider et al. (2018) reportaram em seu trabalho $2n=74$ para *H. myersi*, população do médio Iguaçu-PR porém, sem variação intrapopulacional. O cromossomo extra do presente estudo é um subtelocentrico pequeno com tamanho e morfologia semelhante ao par 17 (Fig.3). Duas hipóteses poderiam explicar o surgimento desse cromossomo extra; este subtelocentrico extra seria um cromossomo supranumerário com origem recente ou, alternativamente, o mesmo possa ser resultado de uma não disjunção cromossômica pós-zigótica caracterizando um polimorfismo cromossômico. Contudo, mais indivíduos necessitam ser analisados, para confirmação de uma destas hipóteses. Um polimorfismo cromossômico numérico intraindividual foi observado em um espécimen de *Trichomycterus davcujoisi* da bacia do rio Iguaçu-PR por Borin e Martins-Santos (2000), que apresentou números diploides de $2n=54$, 55 e 56 cromossomos, com a presença de um pequeno metacêntrico e dois acrocêntricos extras nos dois últimos valores de $2n$, respectivamente. Os autores atribuíram essas variações à ocorrência de não disjunção pós-zigótica e relacionaram o polimorfismo às condições ambientais adversas por ações antrópicas nesta bacia. As condições hidrográficas encontradas na região sul do Brasil, como inúmeras corredeiras e riachos de cabeceira, podem agir como facilitadores na fixação de eventuais polimorfismos dentro da ictiofauna dessas microbacias.

Hypostomus cf. *agna* e *H. myersi* exibiram sistema de RON simples, tal condição é sugerida como uma característica basal em Loricariidae (Artoni e Bertollo, 2001). Entretanto em *H. commersoni*, foi evidenciado sistema de RON múltiplo. Sistemas múltiplos para essa espécie, já foi observado em outras populações de *H. commersoni* rio Iguaçu-PR, abaixo das cataratas (Bueno et al. 2013) e *H. commersoni*

médio Iguaçu, (Lorscheider et al. 2018). Sistema de RON múltipla são predominantes para todo o gênero *Hypostomus*. Essa característica de multiplicidade nesses sítios, podem ser explicados por rearranjos não robertsonianos (Alves et al. 2005) e sistema múltiplo combinado com alto número diploide em *Hypostomus*, é sugerido uma condição derivada dentro de Loricariidae. O polimorfismo de RON observado na população de *H. comersoni* do Iguaçu-PR, pode ser resultado de mecanismos evolutivos importantes que atuam sobre sequências repetitivas *in tandem* (Dover 1986) agindo na translocação dessas regiões (Martins e Galetti, 1999).

A distribuição da heterocromatina constitutiva nas três espécies foi evidenciada preferencialmente em segmentos terminais de cromossomos acrocêntricos em *Hypostomus* cf. *agna*, segmentos pericentroméricos e intersticiais em *H. commersoni* e *H. myersi*. Em *Hypostomus* cf. *agna* e *H. myersi*, foi evidenciada quantidade de heterocromatina similar a população de *H. commersoni* do rio Iguaçu. Heteromorfismo de heterocromatina associada a RON ou em outros pares do segmento cromossômico, já foi reportado em inúmeras espécies de *Hypostomus* como em *Hypostomus* aff. *auroguttatus* e *H. albopunctatus* (Artoni e Bertollo. 1996), *H. nigromaculatus* (Rubert, Zawadzki e Giuliano-Caetano 2008), *Hypostomus* sp. (Martinez et al. 2011), *H. iheringii* Regan, 1908, (Traldi et al. 2012), *H. cochiliodon*, *Hypostomus* aff. *paulinus* e *H. topavae* (Bueno et al. 2013), *H. strigaticeps* (Baumgartner et al. 2014), *Hypostomus* cf. *plecostomus* (Oliveira et al. 2015), *H. sonie* (Oliveira et al. 2019), *H. regani* (Ferreira et al. 2019) e *H. tietensis* (Navarro de Paula, (2021). Processos de heterocromatinização e/ou amplificação desta região foram sugeridos como uma tentativa de explicar o polimorfismo cromossômico heterocromático em *Hypostomus iheringii* (Traldi et al. 2012), *H. strigaticeps* (Baumgärtner et al. 2014) e *Hypostomus* cf. *plecostomus* (Oliveira et al. 2015). Eventos de heterocromatinização não são exclusivos de peixes de água doce. Afonso e Galetti Jr. (2005) sugerem que esses segmentos heterocromáticos podem sofrer amplificação, acumulação, trocas desiguais e transposições como hipotetizado para o peixe marinho, *Centropyge aurantonotus*. Eventos de dispersão de segmentos retrotransponíveis foram apontados por Ferreira et al. (2011) em diversas espécies de ciclídeos em regiões heterocromáticas. Pansonato-Alves et al. (2013) analisando três espécimes de *Hypostomus*: *H. ancistroides*, *H. nigromaculatus* e *H. strigaticeps* da bacia do Paranapanema, Botucatu-SP, encontraram acúmulo de elementos *Rex1*, coincidente com algumas regiões heterocromáticas em *H.*

ancistroides e *H. nigromaculatus*. Observamos que processos de heterocromatinização de segmentos cromossômicos, associados ou não a RON, pode ser resultado de processos distintos dentro do genoma, desde duplicações *in tandem* até transposições de segmentos heterocromáticos, associado à elementos retrotransponíveis como já apontados em trabalhos anteriores.

A utilização do DNA barcode, associado às características morfológicas e citogenéticas, proporcionaram satisfatório grau de resolução na identificação das populações de *Hypostomus* em nosso estudo. Nossos resultados apontaram possíveis conflitos taxonômicos para algumas espécies de *Hypostomus*, previamente descritas para essas localidades. *Hypostomus spiniger* e *H. derbyi* alocaram-se como grupo irmão de *H. commersoni*, como observado em nosso trabalho. *Hypostomus spiniger* já foi descrita molecularmente por Sorrentino (2019) na região do alto Uruguai-SC e em seus resultados *H. spiniger* exibiu conflito taxonômico. Sorrentino (2019) estudando variação intra e interespecíficas em espécies de *Hypostomus*, utilizando ferramenta de DNA barcode analisou sequencias parciais de *COI* de 35 exemplares deste gênero da bacia do rio Uruguai-SC, discriminando cinco grupos: *H. spiniger*, *H. isbrueckeri*, *H. roseopunctatus*, *H. luteus* e *H. uruguayensis*, exibindo distâncias interespecíficas médias de 0,68 a 8,24%, e as distâncias intraespecíficas médias de 0,0 a 0,58%. Nesse mesmo trabalho, Sorrentino (2019) através da análise bayesiana destas espécies, apontou um agrupamento polifilético entre estas, onde *H. spiniger* se separa das demais, sugerindo uma eventual polifilia entre elas.

Hypostomus cf. agna, *H. isbrueckeri* e *H. luteus* em nosso estudo, formaram um agrupamento bem distinto e tal resultado associado aos dados da citogenética para *Hypostomus* indicam uma incerteza taxonômica para essa espécie, pois a única descrição citogenética preexistente foi realizada por Martinez et al. (2011) e encontra-se em “status” *Hypostomus* aff. *agna*, divergindo tanto em número diplóide, quanto em fórmula cariotípica da espécie descrita em nosso trabalho. Além disso, não há registro citogenético para as espécies *H. isbrueckeri* e *H. luteus*. Assim, os dados obtidos apontam a necessidade de uma revisão taxonômica dos exemplares de *Hypostomus cf. agna* considerando agora o agrupamento desta espécie pelas sequencias *COI* com *H. isbrueckeri* e *H. luteus* para melhor definição do seu “status” taxonômico *cf. agna*.

Azevedo et al. (2021) em seu trabalho de taxonomia integrativa, utilizando *COI* para identificar espécies de *Hypostomus* do rio Grande, afluente do rio Paraná, apontaram que alguns espécimes de *H. margaritifer* Ihering, 1911 exibiram baixos valores de distância genética em relação à *H. variipictus*, uma espécie descrita há muito tempo atrás por Ihering em 1911 do rio Pardo, tributário do rio Grande, alto rio Paraná bacia hidrográfica no Estado de São Paulo, Brasil e que não tinha passado por revisões taxonômicas recentes. Os mesmos autores Azevedo et al. (2021), apontam em seus resultados que *H. variipictus* exibiu distância média K2P de 0,35% para *H. alatus* e 1.06% para *H. microstomus*, embora *H. variipictus* exiba caracteres morfológicos bem distintos das espécies acima mencionadas. Anjos et al. (2021) em sua revisão filogenética em *Hypostomus* utilizando um marcador mitocondrial e três marcadores nucleares com espécimes do nordeste da mata Atlântica (NMA) e do rio São Francisco (SF), validaram sete agrupamentos genéticos em ambas ecoregiões e uma linhagem exclusiva representada pela espécie *Hypostomus velhochico*.

Associando dados citogenéticos e moleculares com genes nucleares *rag-1* e *rag-2* e mitocondriais *COI* e *CYB* de 21 espécies de *Hypostomus* do Paranapanema bacia do Tietê-SP, Rocha-Reis, Pasa e Kavalco (2021), identificaram três clados, os quais permitiram o agrupamento das espécies com 66-68 cromossomos (haplogrupo I, compreendendo *H. ancistroides*, *Hypostomus* cf. *tietensis*, *H. affinis*, *H. commersoni* e *H. derbyi*), espécies com 70-80 cromossomos (haplogrupo II compreendendo *H. regani*, *H. strigaticeps*, *H. paulinus*, *H. margaritifer*, *Hypostomus* sp., *H. hermanni*, *H. iheringii*, *H. nigromaculatus* e *H. topavae*) e o haplogrupo III com duas espécies com $2n=64$ (*H. faveolus* e *H. cochliodon*). Esses agrupamentos, segundo sugestão dos autores resultariam na existência de pelo menos dois grandes grupos monofiléticos dentro de *Hypostomus*. Queiroz et al. (2020) em sua reconstrução filogenética em *Hypostomus* da região Neotropical, utilizando quatro marcadores nucleares e dois mitocondriais incluindo *COI*, relataram a eficiência do *COI* para delimitação de espécies nesse grupo. Em seus resultados com 108 espécies de *Hypostomus*, sugeriram algumas linhagens evolutivas para a região Neotropical: *H. cochliodon*, *H. hemiurus*, *H. auroguttatus* e *H. plecostomus* supergrupo. Também seus resultados apontam que 2% como cálculo de distância é válido para espécies distintas em *Hypostomus*, mas que para espécies irmãs, deve ser adotado o valor de 0.5% para a delimitação de espécies, sendo em seus resultados valor de $\geq 0,5\%$ foi encontrado em *H. carinatus* 0,8-1,2%, *H.*

hoplonites 1,4%, *H. oculus* 0,9-1,1%, *H. plecostomus* 1,4-2% e *H. topavae* 0,9%. Hebert et al. (2003) considera espécies diferentes, pares de sequências que apresentam divergência >2%. Pereira et al. (2013) sugerem que o valor de 2% pode ser utilizado como ponto inicial, mas que não aplicado a totalidade de espécies de peixes Neotropicais. Os resultados moleculares do presente trabalho em *Hypostomus*, associado aos resultados de estudos similares em outras espécies desse gênero, reforça a tese que esse grupo exhibe uma grande complexidade em características morfológicas e que a problemática taxonômica pode ser mais bem compreendida, com a utilização de taxonomia integrativa.

Os resultados do *COI* associado aos dados citogenéticos de nosso trabalho em *H. myersi* e populações de *H. commersoni*, se mostraram resolutivos e informativos representando uma contribuição importante sob o ponto de vista carioevolutivo para estas duas espécies coletados na região do médio Iguaçu-SC/PR e alto Uruguai-SC. Contudo, para os espécimens de *Hypostomus* cf. *agna*, os resultados citogenéticos apontaram possíveis conflitos devido ao fato de que não há uma definição da real estrutura cariotípica de *Hypostomus agna* e o agrupamento desta espécie pela análise do *COI* com *H. isbrueckeri* e *H. luteus* constitui uma importante referência que estimulam futuros estudos citogenéticos nestas duas últimas espécies, contribuindo assim para hipóteses filogenéticas para espécies de *Hypostomus* de bacias hidrográficas da região sul do Brasil.

Agradecimentos

Universidade Estadual de Maringá-UEM e Universidade Estadual do Paraná-UNESPAR, pelo suporte logístico e experimental e ao CNPq pelo suporte financeiro da pesquisa. Ao Dr. Claudio Henrique Zawadzki da Universidade Estadual de Maringá-UEM, pela identificação dos espécimes.

Referências

- Afonso, PRAM e Galetti Junior, PM, (2005). Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genética* (The Hauge), v. 123, p.227-233. doi: 10.1007/s10709-004-3214-x.
- Alves, AL, Oliveira, C, Foresti, F, (2003). Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*. 56:57-63. doi.org/10.1080/00087114.2003.10589308.
- Alves, AL, Oliveira C, Foresti, F, (2005). Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica* 124:127–136. doi:10.1007/s10709-004-7561-4.
- Anjos, MS, Queiroz, LJ, Iago de Souza Penido IS, Bitencourt, JA, Barreto, SB, Luisa Maria Sarmiento-Soares, LM, Batalha-Filho, HB, Affonso, PRAM, (2021). A taxonomically complex catfish group from an underrepresented geographic area: Systematics and species limits in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) from Eastern South America. *J Zool Syst Evol Res*. 59: 1994–2009. doi: 10.1111/jzs.12572
- Armbruster, JW, (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal Of The Linnean Society, Londres*, v. 141, p.1-80. doi.10.1111/j.1096-3642.2004.00109.x
- Artoni, RF, Venere, PC, Bertollo, LAC, (1998). A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia*. 63:421-425.
- Artoni, RF, Bertollo, LAC, (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49:81–90. doi.org/10.1080/00087114.1996.10797353.
- Artoni, RF, Bertollo, LAC, (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134:201–210. doi:10.1111/j.1601-5223.2001.00201.x.
- Artoni, RF, Bertollo, LAC, (1992). Regiões Organizadoras de Nucléolos e Heterocromatina Constitutiva em Peixes do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). *Anais do IV Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*.
- Azevedo, FM, Zawadzki, CH, Soria, TV, Fabrin, TMC, De Oliveira, AV, Prioli, SMAP, Prioli, AJ, (2021). Integrative taxonomy reveals the historically poorly defined armoured catfish *Hypostomus variipictus* (Ihering 1911), from the upper rio Paraná basin, Brazil (Siluriformes, Loricariidae). *J Fish Biol*;1–10. doi:10.1111/jfb.14706

- Baumgärtner, L, Paiz, LM, Zawadzki, CH, Margarido, VP, Portela-Castro, ALB. (2014) Heterochromatin polymorphism and physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in four populations of *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1907) from the Parana River Basin, Brazil: Evolutionary and Environmental Correlation. *Zebrafish* 11: 479–487. doi: 10.1089/zeb.2014.1028.
- Bertollo, LAC, Takahashi, CS e Moreira-Filho, O, (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Bras. Genet.* 1,103–120. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000100018>
- Borin, LA & Martins-Santos, IC, (2000). Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguaçú River basin in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 3, 605-607.
- Bueno, V, Venere, PC, Zawadzki, CH, Margarido V, (2013). Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 23, 103–112. doi:10.1007/s11160-012-9280-8
- Bueno, V, Zawadzki, CH, Margarido, VP, (2012). Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Rev Fish Biol Fish* 22:241–250. doi.10.1007/s11160-011-9215-9
- Cereali, SS, (2006). Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriformes) do Planalto da Bodoquena - Mato Grosso do Sul. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina.
- Cereali, SS, Pomini, E, Rosa, R, Zawadzki, CH, Froenlich, O, Giluiano-Caetano, L, (2008). Karyotype of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. *Genetic and Molecular Research*. 7(3):583-591. doi: 10.4238/vol7-3gmr404.
- Chiachio, MC, Oliveira, C, Montoya-Burgos, JI, (2008). Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics And Evolution*, [s.l.], v. 49, n. 2, p.606-617, nov. doi.10.1016/j.ympev.2008.08.013.
- Dias, AC, Zawadzki, CH, (2018). Identification key and pictures of the *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) from the rio Ivaí, upper rio Paraná basin. *Check List* 14 (2): 393–414. doi.org/10.15560/14.2.393
- Di Persia, DH, Neiff, JJ, (1986). The Uruguay River System. In: Davis, BR, Walker, K F. (Org.) *The ecology of river systems*. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, p. 599-621.
- Dover, G.A. (1986). Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet* 2:159–165.
- Eletrosul, (1978). O impacto ambiental da ação do homem sobre a natureza - rio Iguaçú, Paraná, Brasil: reconhecimento da ictiofauna, modificações ambientais e usos múltiplos dos reservatórios. Florianópolis, 33p.

Ferreira, DC, Porto-Foresti, F, Oliveira, C, Foresti, F. (2011). Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mobile Genetic Elements* 1: 112–117. doi:10.4161/mge.1.2.16731. Epub 2011 Jul 1.

Ferreira, GEB, Barbosa, LM, Prizon-Nakajima, AC, Paiva, S, Rossi Vieira, MM, Gallo, RB, Borin-Carvalho, LA, Rosa, R, Zawadzki, CH, Martins-Santos, IC, Portela-Castro, ALB. (2019). Constitutive heterochromatin heteromorphism in the Neotropical armored catfish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraguay River basin (Mato Grosso do Sul, Brazil). *Comparative Cytogenetic*, 13(1): 27-39. doi:10.3897/CompCytogen.v13i1.30134.

Fricke R, Eschmeyer WN, Van Der Laan R. (Eds). Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references. Electronic version. 2022. Available from: <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
Acesso em: 02/01/2022

Garavello, JC, Garavello, JP, (2004). Spatial distribution and interaction of four species of the catfish genus *Hypostomus* Lacépède with bottom of Rio São Francisco, Canindé do São Francisco, Sergipe, Brazil (Pisces, Loricariidae, Hypostominae). *Brazilian Journal Of Biology*, [s.l.], v. 64, n. 3, p.103-141, ago. doi.org/10.1590/S1519-69842004000400006.

Griffiths, SP, (2000). The use clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J. Fish Biol.* 57, 1453–1464.

Hall TA. BioEdit (1999): a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* ;41: 95–98.

Hatanaka T & Galetti PM Jr, (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122, 239–244.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci.* 2003; 270. doi.org/10.1098/rspb.2002.2218.

Howell, WM e Black, DA, (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36, 1014–1015. doi.org/10.1007/bf01953855

Ivanova, NV, Zemlak, TS, Hanner, RH, Hebert, PDN, (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, Volume 7, Issue 4 p. 544-548. doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x

Kavalco, KF, Pazza, R, Bertollo, LAC, Moreira-Filho, O, (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94:180–186. doi:10.1038/sj.hdy.6800595.

Kumar S, Stecher G, Tamura K, (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*; Mar 22. Epub 33:1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA, (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*; 52(2):201–20. doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x.

Lorscheider, CA, Oliveira, JIN, Dulz, TA, Nogaroto, V, Martins-Santos, IC, Vicari, MR, (2018). Comparative Cytogenetics Among Three Sympatric *Hypostomus* Species (Siluriformes: Loricariidae): An Evolutionary Analysis in a High Endemic Region. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.61: e18180417. doi.org/10.1590/1678-4324-2018180417.

Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry*; 87(7): 433-438. doi.org/10.3109/10520295.2012.696700.

Maack, R, (1981). Geografia física do Estado do Paraná. Apresentação Riad Salumuni. Introdução Aziz Nacib Ab'Sabber. 2.ed. Rio de Janeiro: J. Olympio; Curitiba: Secretaria da Cultura e do Esporte do Estado do Paraná, 442 p., il.

Martinez, ERM, Zawadzki, CH, Foresti, F, Oliveira, C, (2011). Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). *Genetics and Molecular Biology* 34, 562–568. doi.org/10.1590/S1415-47572011005000038.

Martins, C & Galetti, PMJr, (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363-367.

Maurutto FAM, Manvailer LFS, Sczepanski TS, Cestari MM & Artoni RF (2012). Cytogenetic characterization of three allopatric species of *Hypostomus* Lacépède (1803) (Teleostei, Loricariidae), *Caryologia*, 65:4, 340-346. doi.org/10.1080/00087114.2012.760882.

Mezzomo, P, Mielniczki-Pereira, AA, Sausen, LT, Marinho, JR, Cansian, RL, (2020). Molecular inferences about the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae): a review. *Molecular Biology Reports*.doi.org/10.1007/s11033-020-05542-z.

Michelle, JL, Takahashi, CS, Ferrari, I, (1977). Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia*.42: 536-549. doi.org/10.1508/cytologia.42.539.

Milhomem, SSR, Castro, RR, Nagamachi, CY, Souza, ACP, Feldberg, E, Pieczarka, JC, (2010). Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). *Comparative Cytogenetics*. 4(1):45- 54. doi.10.3897/compcytogen.v4i1.31.

Navarro de Paula, GB, (2021). Contribuições à Taxonomia de *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) através de análises citogenéticas. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Oliveira, LC, Ribeiro, MO, Dutra, ES, Zawadzki, CH, Portela-Castro, ALB, Martins-Santos, IC, (2015). Karyotype structure of *Hypostomus* cf. *plecostomus* (Linnaeus, 1758) from Tapajós River basin, Southern Amazon: occurrence of sex chromosomes (ZZ/ZW) and their evolutionary implications. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, p. 6625-6634. doi.org/10.4238/2015.June.18.5.

Oliveira, LC, Ribeiro, MO, Costa, GM, Zawadzki, CH, Prizon, AC, Borin, LA, Martins-santos, IC, Portela-Castro, ALB. (2019). Cytogenetic characterization of *Hypostomus soniae* Hollanda-Carvalho & Weber, 2004 from the Teles Pires River, southern Amazon basin: evidence of an early stage of an XX/XY sex chromosome system, v. 13, p. 411-422. doi.10.3897/CompCytogen.v13i4.36205.

Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F, (2013). Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. Review in Fish Biology and Fisheries 23: 477–489. doi.org/10.1007/s11160-013-9303-0.

Pereira LH, Hanner R, Foresti F, Oliveira C (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? BMC Genet 14: 20. doi:10.1186/1471-2156-14-20.

Pinkel D, Straume T, Gray JW, (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; 83 (9): 2934–38. doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934.

Queiroz LJ, Cardoso Y, Jacot-des-Combes C, Bahechara IA, Lucena CA, Py-Daniel LR, Soarese LMS, Nylinder S, Oliveira C, Parente TE, Vilarai GT, Covain R, Buckup P, Montoya-Burgos JI. Evolutionary units delimitation and continental multilocus phylogeny of the hyperdiverse catfish genus *Hypostomus* Molecular Phylogenetics and Evolution. 2020; 145 (2020) 106711. doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106711.

Rocha-Reis, DA, Pasa, R & Kavalco, KF, (2021). High congruence of karyotypic and molecular data on *Hypostomus* species from Brazilian southeast. Organisms Diversity & Evolution 21:135–143. doi.org/10.1007/s13127-021-00478-z.

Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-DelBarrio, JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sanchez-Gracia A, (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. Mol. Biol. Evol; 34(12):3299–3302. doi.org/10.1093/molbev/msx248.

Rubert, M, da Rosa, R, Zawadzki, C. H, Mariotto, S, Moreira-Filho, O, Giuliano-Caetano, L. (2016). Chromosome Mapping of 18S Ribosomal RNA Genes in Eleven *Hypostomus* Species (Siluriformes, Loricariidae): Diversity Analysis of the Sites. Zebrafish, 13(4), 360–368. doi:10.1089/zeb.2016.1279.

Rubert, M, Zawadzki, C. H, Giuliano-Caetano, L. (2008). Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). Neotropical Ichthyology, v. 6, p. 93–100. doi.org/10.1590/S1679-62252008000100011.

Sorrentino, LGP, (2019). Delimitação de espécies do gênero *Hypostomus* da bacia do Alto rio Uruguai. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis.

Sumner, AT, (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75, 304–306. doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7.

Traldi JB, Vicari MR, Blanco DR, Martinez JF, (2012). First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. *Comp. Cytogen.* 6: 115-125. doi.10.3897/CompCytogen.v6i2.2595

Weber, C, (2003). Hypostominae. In: Reis RE, Kullander, SO, Ferraris JrCJ, (eds.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America, Porto Alegre: Edipucrs. p. 351-372.

Zaniboni-Filho, E, Schulz, UH, (2003). Migratory Fishes of the Uruguay River. In: Carosfeld, J, Harvey, B, Ross, C, Baer, A. Migratory Fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. International Development Research Centre. World Fisheries Trust / The World Bank.

Material Suplementar- Tabela 1. Sequências do gene *COI* do presente trabalho e dos bancos de dados Genbank e BOLD utilizadas nos calculos de distancia K2P e construção da árvore genética.

Espécie	Haplótipo	Localidade	GenBank/Bold	Marcador	Ref.
<i>H. agna</i>	1	Brasil	JX048659.1	COI	Roxo et al., 2012 Não publicado
<i>H. agna</i>	2	Brasil	KT932771.1	COI	Gabriel S C Silva et al., 2016.
<i>H. agna</i>	3	Brasil	KU061189.1	COI	Gabriel S C Silva et al., 2016.
<i>H. commersoni</i>	4	Argentina, Buenos Aires, Adela lagoon	FARGB124-11	COI	J. J. Rosso,et al, 2012.
<i>H. commersoni</i>	5	Argentina, Buenos Aires , Tributario rio Rojas (Ascencion)	FARGB299-11	COI	J. J. Rosso,et al, 2012.
<i>H. commersoni</i>	6	Brasil, Upper Parana Basin	FUPR870-09	COI	-----
<i>H. commersoni</i>	7	Brasil, Upper Parana Basin	FUPR871-09	COI	-----
<i>H. commersoni</i>	8	Brasil, Upper Parana Basin	FUPR873-09	COI	-----
<i>H. commersoni</i>	9	Brasil, Upper Parana Basin	FUPR877-09	COI	-----
<i>H. derbyi</i>	10	-----	GU701713.1	COI	Pereira, L.H.G et al.,2013
<i>H. isbrueckeri</i>	11	-----	MK959866.1	COI	Cardoso, Y.P et al., Não publicado
<i>H. luteus</i>	12	-----	MK959876.1	COI	Cardoso, Y.P. et al., Não Publicado
<i>H. myersi</i>	13	-----	GU701696.1	COI	Pereira, L.H.G et al., 2013.
<i>H. spiniger</i>	14	-----	MK959882.1	COI	Cardoso, Y.P. et al., Não Publicado
<i>H. uruguayensis</i>	15	---	GBMNB11272-20	COI	-----
<i>H. uruguayensis</i>	16	---	GBMNB11274-20	COI	-----
<i>H. uruguayensis</i>	17	---	GBMND68801-21	COI	-----