



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR**

NOEMIA QUARESMA GONÇALVES

**DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA DE POPULAÇÕES DO GÊNERO
Hypostomus (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) UTILIZANDO SEQUÊNCIAS
REPETITIVAS DE DNA**

**BELÉM
2024**

NOEMIA QUARESMA GONÇALVES

**DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA DE POPULAÇÕES DO GÊNERO *Hypostomus*
(SILURIFORMES, LORICARIIDAE) UTILIZANDO SEQUÊNCIAS REPETITIVAS
DE DNA**

Dissertação de mestrado submetida ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - PPGBM do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr^a. Cleusa Yoshiko Nagamachi.

BELÉM
2024

NOEMIA QUARESMA GONÇALVES

**DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA DE POPULAÇÕES DO GÊNERO
Hypostomus (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) UTILIZANDO SEQUÊNCIAS
REPETITIVAS DE DNA**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - PPGBM do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Data da avaliação: 11 de março de 2024

Conceito: _____

Banca Examinadora:

Dr^a. Cleusa Yoshiko Nagamachi (Presidente)
Laboratório de Citogenética, CEABIO – UFPA

Dr. Julio Cesar Pieczarka (Membro interno)
Laboratório de Citogenética, CEABIO – UFPA

Dr. Marcelo Nazareno Valinotto de Souza (Membro interno)
Laboratório de Evolução, LEVO – UFPA

Dr. Augusto Cesar Paes de Souza (Membro externo)
Laboratório de Ictiologia Amazônica, LABICAM - IFPA

BELÉM
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G635d Gonçalves, Noemia Quaresma.

Diversidade cromossômica de populações do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) utilizando sequências repetitivas de DNA. / Noemia Quaresma Gonçalves. — 2024.

77 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2024.

1. DNA repetitivo;. 2. rearranjos cromossômicos;. 3. citogenômica;. 4. peixes neotropicais;. 5. diversidade cromossômica.. I. Título.

CDD 571.6

Dedico esse trabalho *in memoriam*, aos meu avós, Martinha de Lima e Manoel Quaresma. E a minha família por sempre acreditarem que todo sonho é possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Sr^a. De Nazaré, por todas as bênçãos alcançadas até este momento.

Agradeço a toda minha família por sempre acreditarem nos meus sonhos, em especial aos meus pais, Vadilson Ferreira e Laurineide Pantoja, por me apoiarem em todos os momentos, nas diversas e inúmeras questões que surgiram, desde a mudança de cidade até os grandes acolhimentos/conselhos de vida, por fazerem de tudo para que a filha de feirantes, que veio de uma cidade no interior pudesse mudar sua vida, através da educação, externo meu agradecimento também as minhas irmãs, Valdilene Quaresma e Natanayara Quaresma, por se disporem a fazer até o impossível para que eu pudesse seguir em frente com todos os meus objetivos, quero que saibam que minha gratidão e apreço por vocês é imensa, e pela nossa família eu irei seguir sempre, os amo com todo o meu coração.

Agradeço a minha orientadora Dr^a Cleusa Nagamachi, por ter me dado a oportunidade sem ao menos me conhecer, por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho, serei eternamente grata, agradeço também ao Dr Julio Pieczarka pela receptividade e suporte no laboratório.

Ao Dr Augusto Cesar, por ter dado suporte desde o início da minha trajetória acadêmica e pela amizade construída, sendo um dos fatores que tornaram este momento possível.

Agradeço ao colegas do Laboratório de Citogenética do CEABIO pelo acolhimento desde que adentrei no mestrado, pelas conversas e contribuições científicas, que foram fundamentais em todos os momentos. Agradeço em especial aos integrantes do grupo de peixes, por todo auxílio durante a realização deste trabalho, além dos momentos de distração que contribuíram para que tudo se tornasse mais divertido.

Aos técnicos do Laboratório de Citogenética do CEABIO, Me. Jorge Rissino, Me. Shirley Nascimento e Maria da Conceição, por todo o suporte técnico e conversas.

Agradeço ao meu amigo desde a graduação, Oscar Vinicius, por estar comigo em todos os momentos, apoiar, aconselhar e acolher sempre que necessário, saiba que sua amizade foi fundamental durante todo o percurso.

A CAPES pela concessão de bolsa, que foi essencial para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Pará (UFPA) minha segunda casa, e ao programa de pós graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM).

A todos o meu apreço e agradecimento.

“Você está vivo. Esse é o seu espetáculo. Só quem se mostra se encontra. Por mais que se perca no caminho”

Cazuza

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
	1.1 Aspectos gerais sobre a ordem Siluriformes	13
	1.2 Família Loricariidae.....	13
	1.3 Aspectos gerais sobre o gênero <i>Hypostomus</i>	15
	1.4 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente em peixes	23
	1.5 Aspectos gerais sobre a fração repetitiva do genoma eucarioto.....	24
	1.6 O gênero <i>Hypostomus</i> como modelo para estudos de diversidade genética	26
	1.7 DNA <i>barcoding</i> como ferramenta taxonômica	29
2	OBJETIVOS	32
	2.1 Geral	32
	2.2 Específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
	3.1 Amostras.....	33
	3.2 Protocolos de citogenética	35
	3.2.1 Obtenção de cromossomos metafásicos e tecidos	35
	3.2.2 Técnica de coloração convencional	35
	3.2.3 Bandeamento c	35
	3.2.4 Extração de dna	36
	3.2.5 Isolamento e amplificação dos DNAs repetitivos	36
	3.2.5.1 Protocolos para obtenção da sonda de rDNA 18s	36
	3.2.5.2 Protocolos para obtenção da sonda de rDNA 5s	37
	3.2.5.3 Protocolos para obtenção da sonda telomérica	38
	3.2.6 Marcação das sondas	38
	3.2.7 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sondas de DNAs repetitivos	39
	3.2.8 Obtenção e análise das imagens.....	40
	3.3 Protocolos de análise molecular	40
	3.3.1 Amostras e procedimentos laboratoriais.....	40
	3.3.2 Análises filogenéticas.....	45
	3.3.3 Distância citogenética.....	45
4	RESULTADOS	46
	4.1 Citogenética clássica e molecular	46
	4.2 Resultados moleculares	50
	4.2.1 Resconstruções filogenéticas.....	50
	4.2.2 Distâncias genéticas.....	50
5	DISCUSSÃO	53
	5.1 Dados citogenéticos	19
	5.2 Identificação molecular de espécimes de <i>Hypostomus</i> da bacia do rio Tocantins-Araguaia	57
6	CONCLUSÃO	59
7	REFERÊNCIAS	60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Relações Filogenéticas da família Loricariidae, baseada na análise bayesiana de alinhamento de 4293 pares de bases, constituída por duas sequências mitocondriais (16S, Cyt b) e três *loci* nucleares (RAG1, RAG2, MyH6) (Lujan *et al.*, 2015).15
- Figura 2.** *Hypostomus plecostomus*. Em (A) corpo do espécime revestido por placas ósseas, em (B) boca em formato de ventosa (Fonte: Autor).16
- Figura 3.** Esquema de organização das classes de DNAs repetitivos em genomas de eucariotos. Fonte: adaptado de Martins *et al.*, (2011).25
- Figura 4.** Imagem de uma das amostras do gênero *Hypostomus* analisada neste trabalho. Barra de escala: 1 cm. (Fonte: Autor).34
- Figura 5.** Mapa com distribuição dos espécimes sequenciados utilizados neste trabalho e da literatura. Os ícones que estão em branco, do número 1 ao 5 representam as espécies coletadas neste trabalho, as demais de 6 a 17, representam as sequências da literatura.43
- Figura 6.** Cariótipo de *Hypostomus plecostomus* do rio Maracapucú. Em (A) e (B) cariótipo corado com Giemsa e bandeamento C, respectivamente; em (C) e (D) localização *in situ* de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), respectivamente; em (E) localização *in situ* de sequências teloméricas (vermelho).46
- Figura 7.** Cariótipo de *Hypostomus plecostomus* do rio Quianduba. Em (A) e (B) cariótipo corado com Giemsa e bandeamento C, respectivamente; em (C) e (D) localização *in situ* de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), respectivamente; em (E) localização *in situ* de sequências teloméricas (vermelho).47
- Figura 8.** Cariótipo de *Hypostomus plecostomus* da ilha do Tabatinga. Em (A) e (B) cariótipo corado com Giemsa e bandeamento C, respectivamente; em (C) e (D) localização *in situ* de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), respectivamente; em (E) localização *in situ* de sequências teloméricas (vermelho).48
- Figura 9.** Cariótipo de *Hypostomus plecostomus* do rio Sirituba. Em (A) e (B) cariótipo corado com Giemsa e bandeamento C, respectivamente; em (C) e (D) localização *in situ* de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), respectivamente; em (E) localização *in situ* de sequências teloméricas (vermelho).49
- Figura 10.** Cariótipo de *Hypostomus plecostomus* da ilha do Capim (A) e (B) cariótipo corado

com Giemsa e bandeamento C, respectivamente; em (C) e (D) localização *in situ* de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), respectivamente; em (E) localização *in situ* de sequências teloméricas (vermelho).50

Figura 11. Árvores filogenéticas do gênero *Hypostomus* com base no gene *COI*. **A** – Indica árvore filogenética de inferência bayesiana (IB) e **B** – Indica árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML). Em negrito as amostras coletadas na Bacia do Rio Tocantins- Araguaia. Os (*) indicam amostras com informação citogenética. 2n = número diploide, FC = Fórmula cariotípica. (1) Rio Maracapucú, (2) Rio Quianduba, (3) Ilha do Tabatinga, (4) Rio Sirituba e (5) Ilha do Capim.51

Figura 12. Distribuição de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) nos cariótipos das populações de *Hypostomus plecostomus* deste estudo. Em (A) *Hypostomus plecostomus* do rio Maracapucú. (B) *Hypostomus plecostomus* do rio Quianduba. (C) *Hypostomus plecostomus* ilha do Tabatinga. (D) *Hypostomus plecostomus* do rio Sirituba. (E) *Hypostomus plecostomus* da ilha do Capim.54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diversidade citogenética no gênero <i>Hypostomus</i> , dados de identificação taxonômica, número diplóide (2n), fórmula cariotípica (FC), tipo de sistema sexual, classificação da região organizadora de nucléolo (NORs), dados de sequências de rDNA 5S/18S e <i>COI</i>	18
Tabela 2. Total de espécimes do presente estudo.	34
Tabela 3. Lista dos DNAs repetitivos e os iniciadores que foram utilizados para amplificação e isolamento de sequências repetitivas em <i>Hypostomus</i>	36
Tabela 4. Amostras sequenciadas neste trabalho e sequências do GenBank usadas neste trabalho. (–) Indica dados não informados ou ausentes.	41
Tabela 5. Médias de distâncias genéticas -p (%) com base no gene <i>COI</i> , entre as espécies do gênero <i>Hypostomus</i> e em negrito as médias dentro de cada espécie. – Indica ausência de informação, devido <i>H. paucipunctatus</i> só possuir um espécime para esse gene. <i>Hemiancistrus medians</i> é usado como grupo externo.	52

RESUMO

Sequências repetitivas representam a maior parcela dos genomas eucariotos, tendo envolvimento em diversos aspectos fisiológicos e estruturais nestes genomas, e sua participação em eventos de reorganização cromossômica representa um importante aspecto biológico. O gênero *Hypostomus* possui similaridades no padrão morfológico, e o padrão de coloração dos espécimes pode variar intra-especificamente; assim, a identificação morfológica aliada a identificação molecular, podem ser utilizadas em estudos no grupo de peixes, para questões taxonômicas, e os tornam modelos interessantes para análise do papel de sequências repetitivas na diversificação cromossômica devido à extensa diversidade citogenética apresentada. Neste trabalho analisou-se o papel de diferentes sequências repetitivas de DNA em mecanismos de diversificação cromossômica, e foi feita a identificação molecular através do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (*COI*) em populações de *Hypostomus* coletadas na região Amazônica, Brasil. As análises foram comparativas, utilizando coloração convencional, bandeamento C e Hibridização *In Situ* Fluorescente com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e sequências teloméricas. Além disso, realizou-se sequenciamento parcial da região codificante do gene *COI*. Os resultados mostraram os seguintes cariótipos de *H. plecostomus*: $2n = 68$, FC (18m/sm+50st/a) e NF = 112 no rio Maracapucú; $2n = 68$, FC (18m/sm+50st/a) e NF = 114 no rio Quianduba; $2n = 68$, FC (14m/sm+54st/a) e NF = 112 na ilha do Tabatinga; $2n = 68$, FC (20m/sm+48st/a) e NF = 108 no rio Sirituba; $2n = 68$, FC (22m/sm+46st/a) e NF = 112 na ilha do Capim. A distribuição da heterocromatina constitutiva foi observada na maioria dos cromossomos em regiões centroméricas, e algumas bandas heterocromáticas em alguns cromossomos em regiões intersticiais e distais. O mapeamento do rDNA 18S demonstrou o mesmo padrão de distribuição em 3 pares de cromossomos subtelocêntricos em regiões distais do braço curto para as populações dos rios Maracapucú e Quianduba enquanto que, na população da ilha do Tabatinga, ocorreu em 3 pares de cromossomos, sendo 2 pares subtelocêntricos e 1 par metacêntrico, também nas regiões distais do braço curto. Já na população do rio Sirituba, o 18S ocorre em 5 cromossomos, em 1 par acrocêntrico, 1 par subtelocêntrico e em 1 cromossomo subtelocêntrico na região distal do braço curto. Na população da ilha do Capim, o 18S ocorre em 3 pares de cromossomos, sendo 2 pares subtelocêntricos, e em 2 cromossomos metacêntricos não homólogos, na região distal do braço curto. O padrão de distribuição do rDNA 5S se manteve para todas as populações, em 1 par de cromossomos metacêntricos na região proximal do braço curto, e a distribuição de sequência telomérica se apresentou nas regiões terminais de todos os cromossomos para todas as populações. A análise dos dados de sequenciamento do gene *COI* confirmou a identificação das amostras analisadas neste estudo como *H. plecostomus* e *H. watwatta*. A diversidade cromossômica em *Hypostomus* é observada diante do elevado $2n$, e variação de fórmulas cariotípicas entre as populações com o mesmo $2n$, assim como observamos um padrão variável de dispersão das sequências repetitivas em populações da mesma espécie. Além disso, este trabalho demonstra a primeira ocorrência registrada da espécie *H. watwatta* para a região coletada. O mapeamento de sequências repetitivas no gênero tem se mostrado interessante para a contribuição da elucidação de mecanismos cromossômicos que estão envolvidos na evolução cariotípica deste grupo, assim como o DNA *barcoding* pode contribuir para resoluções taxonômicas envolvendo este complexo grupo.

Palavras-chave: DNA repetitivo; rearranjos cromossômicos; citogenômica; peixes neotropicais; diversidade cromossômica.

ABSTRACT

Repetitive sequences represent the largest portion of eukaryotic genomes, they participate in several physiological and structural aspects in these genomes, and their participation in chromosomal reorganization events represents an important biological aspect. The genus *Hypostomus* has similarities in the morphological pattern, and the color pattern of the specimens can vary intra-specifically, thus, morphological identification combined with molecular identification can be used in studies on the group of fish for taxonomic questions and makes them interesting models for analyzing the role of repetitive sequences in chromosomal diversification due to the extensive cytogenetic diversity found. In this study, it was analyzed the role of different repetitive DNA sequences in mechanisms of chromosomal diversification, and the molecular identification through the Cytochrome Oxidase Subunit I (*COI*) gene in *Hypostomus* populations collected in the Amazon region, Brazil. The analyzes were comparative, using conventional staining, C-banding and Fluorescent *in situ* hybridization with probes for 18S rDNA, 5S rDNA and telomeric sequences. In addition, partial sequencing of the coding region of the *COI* gene was conducted. The results showed the following karyotypes for *H. plecostomus*: $2n = 68$, FC (18m/sm+50st/a) and NF = 112 in the Maracapucú river; $2n = 68$, FC (18m/sm+50st/a) and NF = 114 in the Quianduba river; $2n = 68$, FC (14m/sm+54st/a) and NF = 112 on Tabatinga island ; $2n = 68$, FC (20m/sm+48st/a) and NF = 108 in the Sirituba river; $2n = 68$, FC (22m/sm+46st/a) and NF = 112 on Capim island. The distribution of constitutive heterochromatin was observed in most chromosomes, in centromeric regions, and some heterochromatic bands in some chromosomes in interstitial and distal regions. Mapping of 18S rDNA demonstrated the same pattern of distribution in 3 pairs of subtelocentric chromosomes in distal regions of the short arm for the populations of the Maracapucú and Quianduba rivers, while in the population of Tabatinga island, it occurred in 3 pairs of chromosomes, 2 of which were subtelocentric pairs and 1 in a metacentric pair, also in the distal regions of the short arm. In the Sirituba river population, 18S occurs in 5 chromosomes, in 1 acrocentric pair, 1 subtelocentric pair and in 1 subtelocentric chromosome in the distal region of the short arm. In the Capim island population, 18S occurs in 3 pairs of chromosomes, 2 of which are subtelocentric pairs, and in 2 non-homologous metacentric chromosomes, in the distal region of the short arm. The distribution pattern of 5S rDNA was maintained for all populations, in 1 pair of metacentric chromosomes in the proximal region of the short arm, and the telomeric sequence distribution was present in the terminal regions of all chromosomes for all populations. Analysis of *COI* gene sequencing data confirmed the identification of the samples analyzed in this study as *H. plecostomus* and *H. watwatta*. Chromosomal diversity in *Hypostomus* is observed in the high $2n$, and variation in karyotypic formulas between populations with the same $2n$, as well as a variable pattern of dispersion of repetitive sequences in populations of the same species. Furthermore, this study shows the first recorded occurrence of the species *H. watwatta* for the sampled region. The mapping of repetitive sequences in the genus has proven to be interesting in contributing to the elucidation of chromosomal mechanisms that are involved in the karyotypic evolution of this group. Likewise, *DNA barcoding* can contribute to taxonomic resolutions involving this complex group.

Keywords: Repetitive DNA; chromosomal rearrangements; cytogenomics; neotropical fish; chromosomal diversity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre a ordem Siluriformes

Siluriformes são um grupo de peixes extremamente diversificados, composto atualmente por 41 famílias e aproximadamente 4.210 espécies (Eschmeyer & Fong, 2024). Estudos morfológicos (de Pinna 1998; Britto 2002; Diogo 2003) e moleculares baseados em genes nucleares e mitocondriais (Hardman 2005; Sullivan *et al.*, 2006) consideram a ordem monofilética, subdivida em 3 subordens: Diplomystoidei, Siluroidei e Loricarioidei (Sullivan *et al.*, 2006; Kappas *et al.*, 2016). Siluriformes, depois dos Characiformes, abrigam a maioria das espécies de peixes descritas para regiões neotropicais (Fricke *et al.*, 2021), sendo amplamente distribuída em toda região tropical por todo o planeta (Burgess, 1989), provavelmente devido as elevadas temperaturas destas regiões (Nelson *et al.*, 2006). As espécies de Siluriformes habitam o fundo de rios e riachos, permanecem escondidos na vegetação, troncos e rochas durante o dia e saindo em busca de alimento no período noturno (Paxton & Eschmeyer, 1995). Grande parte das espécies apresenta hábitos sedentários, alguns poucos grupos apresentando hábitos migratórios limitados (Britski, 1999).

Os peixes da ordem Siluriformes apresentam uma anatomia corporal bastante característica, incluindo corpo revestido por placas ósseas ou pele nua, ausência de escamas e presença de barbilhões ao redor da boca (Nakatani *et al.*, 2001). Estes organismos podem variar quanto ao tamanho e forma do corpo, com algumas espécies medindo até 2,5 metros, enquanto outras não chegam a ultrapassar 3 cm de comprimento (Ferreira *et al.*, 1998).

1.2 Família Loricariidae

Dentre as famílias que compõem a ordem Siluriformes, Loricariidae é uma das mais diversas, abrigando atualmente 1.051 espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2024). As espécies que compõem esta família constituem um grupo monofilético, organizado em seis subfamílias: Delturinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeninae, Loricariinae e Rhinelepinae, sendo a sistemática dessas subfamílias constantemente revisada (Figura 1) (Lujan *et al.*, 2015; Eschmeyer & Fong, 2016; Lujan *et al.*, 2017).

A família Loricariidae é constituída por importantes representantes da biodiversidade neotropical (Fricke *et al.*, 2021). Estes representantes estão distribuídos por toda região neotropical desde a Costa Rica, Panamá e toda América do Sul (Armbruster, 2008; Nelson *et al.*, 2016).

Os representantes de Loricariidae são popularmente conhecidos como cascudos, acarís ou bodós, sendo encontrados principalmente em fundos de rios e riachos. Loricariídeos são facilmente distinguíveis de outros peixes por terem corpos cobertos com placas dérmicas ossificadas, abundância de dentes tegumentares conhecidos como odontódeos (Garg *et al.*, 2010), e uma boca ventral que facilita a ligação à superfície do substrato e a alimentação (Geerinckx *et al.*, 2011). Estes organismos apresentam hábitos alimentares detritívoros, geralmente se alimentando de algas e detritos presentes nas superfícies, no fundo dos riachos e rios (Armbruster & Page, 2006; Geerinckx *et al.*, 2011; Villares-Junior *et al.*, 2016). Além disso, estes organismos possuem grande capacidade adaptativa, podendo ser encontrados em diferentes habitats, incluindo grandes rios e riachos, até pequenos lagos hipóxicos (Giuliano-Caetano, 1998).

Segundo Lujan *et al.* (2015), as relações filogenéticas entre os representantes de Loricariidae têm sido amplamente discutidas, em estudos utilizando dados morfológicos e moleculares, recebendo forte apoio para monofilía (Armbruster, 2008; Lujan *et al.*, 2015; 2017). Lujan *et al.* (2015), baseados em uma análise bayesiana de 4293 pares de bases de sequências de genes mitocondriais (16S, Cyt b) e três genes nucleares (RAG1, RAG 2, MyH6), recuperaram uma filogenia na qual a subfamília Hypostominae foi organizada em nove clados-tribos, incluindo: clado *Acanthicus*, tribo *Ancistrini*, clado *Chaetostoma*, clado *Hemiancistrus*, tribo *Hypostomini*, clado *Pseudancistrus*, clado *Lithoxus*, clado *Pseudancistrus* e clado *Peckoltia* (Figura 1).

Uma classificação foi proposta por Roxo *et al.* (2019), baseada em um conjunto de dados a nível genômico para 140 espécies, 75 gêneros e 5 de 6 subfamílias. As análises por máxima verossimilhança e bayesiana apoiam o monofiletismo de Loricariidae. Constantes alterações têm sido realizadas na taxonomia e filogenia dos membros desta família, sendo apresentados através de dados que contribuem para estudos na citogenética, taxonomia e filogenia envolvendo esta complexa e diversificada família (Schaefer, 1987; Montoya-Burgos *et al.*, 1998; Armbruster, 2004; Roxo *et al.*, 2012; 2014; 2019; Lujan *et al.*, 2015).

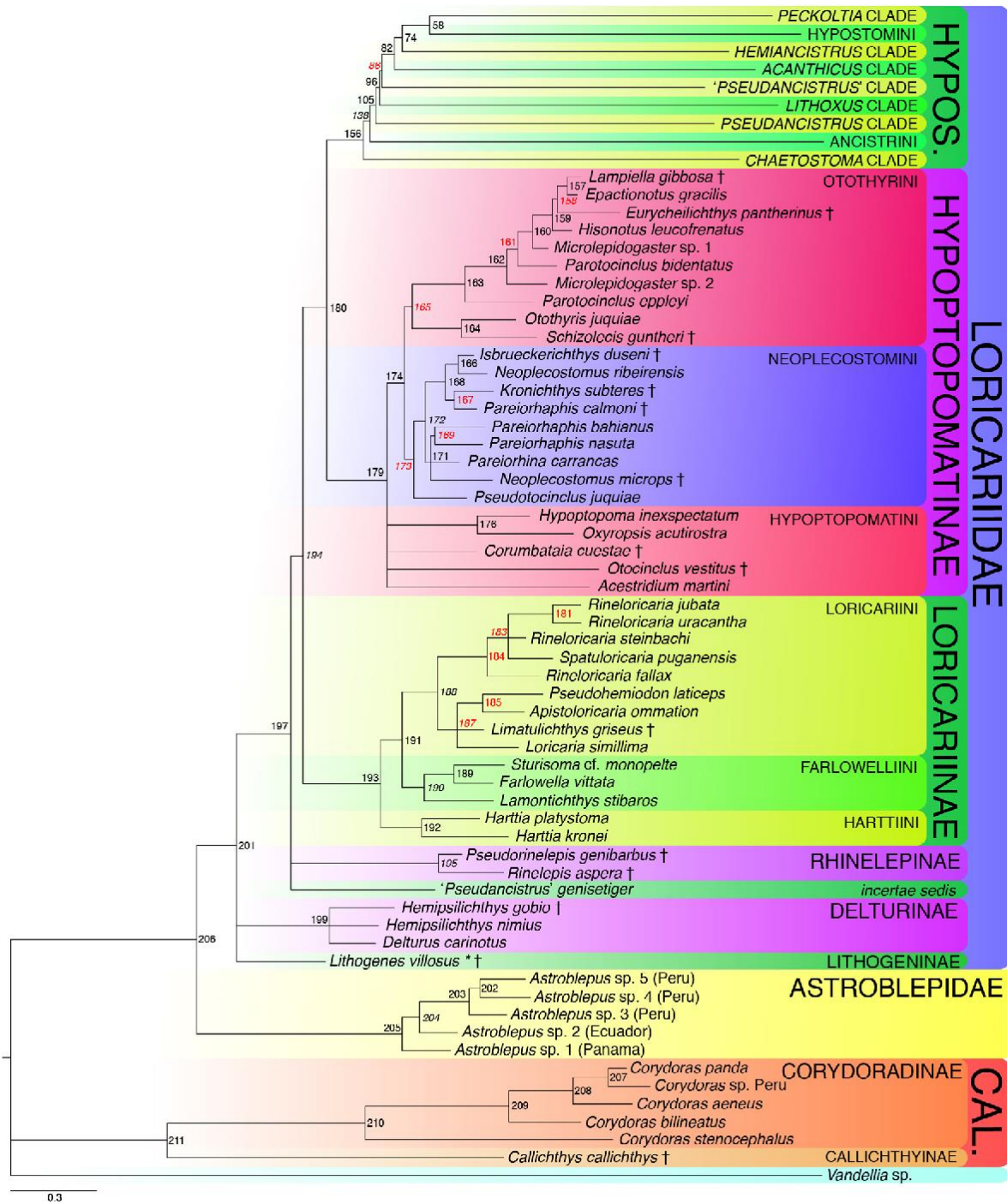


Figura 1. Relações Filogenéticas da família Loricariidae, baseada na análise bayesiana de alinhamento de 4293 pares de bases, constituída por duas sequências mitocondriais (16S, Cyt b) e três *loci* nucleares (RAG1, RAG2, MyH6) (Lujan *et al.*, 2015).

1.3 Aspectos gerais sobre o gênero *Hypostomus*

O gênero *Hypostomus* (Lacépède 1803) possui aproximadamente 221 espécies válidas (Froese & Pauly, 2024). *Hypostomus* representa um dos grupos mais diversos de Loricariidae, sendo amplamente distribuído por toda região neotropical, ocupando uma vasta diversidade de habitats (Fricke *et al.*, 2021).

A distribuição dos peixes deste grupo ocorre por toda a América do Sul e além disso, uma característica desses animais é o sedentarismo, hábito pouco migratório (Alves *et al.*, 2005; Bickford *et al.*, 2007). Estes animais possuem adaptações, como por exemplo boca em forma de ventosa, corpo revertido por placas ósseas, e dentes raspadores (Figura 2) (Delariva & Agostinho, 2001). Segundo Gomes *et al.* (2015), os representantes deste gênero ocupam geralmente ambientes bentônicos, e são, em grande parte, encontrados em regiões tropicais.



Figura 2. *Hypostomus plecostomus*. Em (A) corpo do espécime revestido por placas ósseas, em (B) boca em formato de ventosa (Fonte: Autor).

Hypostomus é um gênero complexo, sendo sua taxonomia considerada bastante problemática e ainda pouco conhecida, se tornando foco de muitos estudos (Cardoso *et al.*, 2012; Zawadzki *et al.*, 2016; Brandão *et al.*, 2018; Anjos *et al.*, 2020; Lustosa-Costa *et al.*, 2022). Um fator que dificulta o estabelecimento das relações taxonômicas é a plasticidade fenotípica, como coloração e padrão de manchas, observada entre os loricarídeos que tem dificultado a confirmação da identificação das espécies deste gênero (Armbruster, 2004; Anjos *et al.*, 2020; Queiroz *et al.*, 2020).

Armbruster (2004) baseado em dados morfológicos e morfométricos considera o gênero *Hypostomus* como parafilético, destacando que a classificação não deve ser feita meramente por características exclusivas. Dessa forma, a descrição de espécies do gênero *Hypostomus* se torna complexa devido a diversidade e variação morfológica (Cardoso *et al.*, 2012). Somado a isso, descrições antigas, breves e incompletas dificultam o reconhecimento das espécies (Mazzoni; Caramaschi; Weber, 1994).

Muitos estudos citogenéticos já foram realizados em *Hypostomus* (Tabela 1). Estes estudos demonstram uma grande diversidade de números diploides ($2n$, que varia de 54 a 84 cromossomos) e fórmulas cariotípicas (FC), além da presença de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW e XX/XY. Estes dados demonstram que o gênero *Hypostomus* é um excelente modelo de estudos voltados para a diversidade e evolução (Endo *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2019).

Tabela 1: Diversidade citogenética no gênero *Hypostomus*, dados de identificação taxonômica, número diploide (2n), fórmula cariotípica (FC), tipo de sistema sexual, classificação da região organizadora de nucléolo (NORs), dados de sequências de rDNA 5S/18S e *COI*.

Espécie	2N	FC	Crom. Sex.	rDNA_	NORs	Análise molecular (<i>COI</i>)	Referências
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	34M/SM + 34ST/A	-	-	Múltiplas	-	Artoni & Bertollo, 1966
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	36M/SM + 32ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	28M/SM + 40ST/A	-	-	Múltiplas	-	Alves <i>et al.</i> , 2006
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	20M/SM + 38ST/A	-	-	Múltiplas	-	Alves <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	26M/SM + 42ST/A	-	-	Múltiplas	-	Endo <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	28M/SM + 40ST/A	-	-	Múltiplas	-	Endo <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	18M/SM + 50ST/A	-	-	Múltiplas	-	Endo <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	28M/SM + 40ST/A	-	-	Múltiplas	-	Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus</i> aff. <i>ancistroides</i>	66	28M/SM + 38ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Maurutto <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus</i> aff. <i>ancistroides</i> (♂)	68	28M/SM + 40ST/A	ZZ/ZW	5S/18S	Múltiplas	-	Kamei <i>et al.</i> , 2017
<i>Hypostomus</i> aff. <i>ancistroides</i> (♀)	68	29M/SM + 39ST/A	ZZ/ZW	5S/18S	Múltiplas	-	Kamei <i>et al.</i> , 2017
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	30M/SM + 38ST/A	-	5S/18S	Múltiplas	<i>COI</i>	Pansonato-Alves <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	28M/SM + 40ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	34M/SM + 34ST/A	-	-	Múltiplas	-	Lorscheider <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	30M/SM + 44ST/A	-	-	Múltiplas	-	Artoni & Bertollo, 1966
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	30M/SM + 44ST/A	-	-	Múltiplas	-	Alves <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	22M/SM + 52ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	30M/SM + 44ST/A	-	-	Múltiplas	-	Lorscheider <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	22M/SM + 52ST/A	-	-	Simples	-	Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	30M/SM + 44ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	28M/SM + 46ST/A	-	-	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2022
<i>Hypostomus</i> aff. <i>auroguttatus</i>	76	38M/SM + 38ST/A	-	-	Múltiplas	-	Artoni & Bertollo, 1966

<i>Hypostomus iheringii</i> [cited with <i>Hypostomus</i> aff. <i>Auroguttatus</i> (Artoni & Bertollo, 1996)	76	38M/SM +38ST/A	-	-	Simples	-	Lorscheider <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus affinis</i>	66	28M/SM + 38ST/A	-	5S	-	-	Kavalco <i>et al.</i> , 2004
<i>Hypostomus affinis</i>	66	24M/SM + 42ST/A	-	5S/18S	Múltiplas	-	Brandão <i>et al.</i> , 2018
<i>Hypostomus affinis</i>	66	24M/SM + 42ST/A	-	5S/18S	Múltiplas	-	Brandão <i>et al.</i> , 2018
<i>Hypostomus</i> aff. <i>agna</i>	74	18M/SM + 56ST/A	-	-	Múltiplas	-	Martinez <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus cochliodon</i>	64	28M/SM + 36ST/A	-	-	Simples	-	Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus cochliodon</i>	64	28M/SM + 24ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus</i> aff. <i>cochliodon</i>	64	38M/SM + 26ST/A	-	-	Múltiplas	-	Becker <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus</i> aff. <i>cochliodon</i>	64	38M/SM + 26ST/A	-	-	Múltiplas	-	Becker <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus cochliodon</i>	64	36M/SM + 28ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus commersoni</i>	68	26M/SM + 42ST/A	-	-	Múltiplas	-	Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus commersonii</i>	68	24M/SM + 44ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Maurutto <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus commersoni</i>	68	26M/SM + 42ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus commersoni</i>	68	26M/SM + 42ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus commersoni</i>	66	26M/SM + 40ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus chrysostiktos</i>	52	42M/SM + 10ST	-	-	Simples	COI	Anjos <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus derbyi</i>	66	16M/SM + 50ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Maurutto <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus faveolus</i>	64	26M/SM + 38ST/A	-	-	Simples	-	Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus faveolus</i>	64	26M/SM + 38ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus goyazensis</i>	72	26M/SM + 46ST/A	-	-	Simples	-	Alves <i>et al.</i> , 2006
<i>Hypostomus</i> cf. <i>heraldoi</i>	72	12M/SM + 60ST/A	-	-	Simples	-	Martinez <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus hermanni</i>	72	18M/SM + 54ST/A	-	-	Múltiplas	-	Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus hermanni</i>	72	18M/SM + 52ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus hermanni</i>	72	26M/SM + 46ST/A	-	-	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus hermanni</i>	72	26M/SM + 46ST/A	-	-	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2022
<i>Hypostomus</i> aff. <i>hermanni</i>	72	34M/SM +38ST/A	-	5S/18S	Múltiplas	-	Kamei <i>et al.</i> , 2017
<i>Hypostomus iheringii</i>	80	24M/SM + 56ST/A	-	5S/18S	Múltiplas	-	Traldi <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus iheringii</i>	80	22M/SM + 58ST/A	-	-	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2022
<i>Hypostomus prope iheringi</i>	74	24M/SM + 50ST/A	-	-	Múltiplas	-	Alves <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus iheringii</i>	80	22M/SM + 58ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus jaguar</i>	76	30M/SM + 46ST/A	-	-	Múltiplas	COI	Anjos <i>et al.</i> , 2020

<i>Hypostomus mutucaae</i>	82	22M/SM + 60ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus mutucaae</i>	82	22M/SM + 60ST/A	-	-	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2022
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	28M/20SM + 48ST/A	-	-	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2008
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	26M/SM + 50ST/A	-	-	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2008
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	26M/SM + 50ST/A	-	5S/18S	Simple	COI	Pansonato-Alves <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	74	30M/SM + 44ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus paulinus</i>	76	22M/SM + 54ST/A	-	18S	Simple	-	Rubert <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus prope paulinus</i>	76	24M/SM + 52ST/A	-	-	Simple	-	Alves <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus prope paulinus</i>	76	24M/SM + 52ST/A	-	-	Simple	-	Alves <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus</i> aff. <i>paulinus</i>	74	22M/SM + 52ST/A	-	-	Simple	-	Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus paulinus</i>	74	22M/SM + 52ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus paulinus</i> (<i>Hypostomus</i> sp. C)	72	28M/SM + 44ST/A	-	-	Múltiplas	-	Lorscheider <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus paulinus</i> (<i>Hypostomus</i> sp. D2)	72	24M/SM + 38ST/A	-	-	Múltiplas	-	Lorscheider <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus paulinus</i>	76	22M/SM + 54ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus</i> aff. <i>paulinus</i>	76	26M/SM + 50ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus paulinus</i>	76	22M/SM + 54ST/A	-	-	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2022
<i>Hypostomus prope plecostomus</i>	68	28M/SM + 40ST/A	-	-	Simple	-	Alves <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus</i> cf. <i>plecostomus</i> (♂)	68	38M/SM + 30ST/A	ZZ/ZW	5S/18S	Múltiplas	-	Oliveira <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus</i> cf. <i>plecostomus</i> (♀)	68	39M/SM + 29ST/A	ZZ/ZW	5S/18S	Múltiplas	-	Oliveira <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus</i> cf. <i>plecostomus</i> – Ilha do Capim	68	22M/SM + 46ST/A	-	5S/18S	-	COI	Presente estudo
<i>Hypostomus</i> cf. <i>plecostomus</i> – Rio Maracapucú	68	18M/SM + 50ST/A	-	5S/18S	-	COI	Presente estudo
<i>Hypostomus</i> cf. <i>plecostomus</i> – Rio Quianduba	68	18M/SM + 50ST/A	-	5S/18S	-	COI	Presente estudo
<i>Hypostomus</i> cf. <i>plecostomus</i> – Rio Sirituba	68	20M/SM + 48ST/A	-	5S/18S	-	COI	Presente estudo
<i>Hypostomus</i> cf. <i>plecostomus</i> – Ilha do Tabatinga	68	14M/SM + 54ST/A	-	5S/18S	-	COI	Presente estudo
<i>Hypostomus regani</i>	72	30M/SM + 42ST/A	-	-	-	-	Artoni & Bertollo, 1966
<i>Hypostomus regani</i>	72	30M/SM + 42ST/A	-	-	Múltiplas	-	Alves <i>et al.</i> , 2006

<i>Hypostomus regani</i>	72	12M/SM + 60ST/A	-	-	Múltiplas	-	Martinez <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus regani</i>	72	24M/SM + 48ST/A	-	5S/18S	Simple	-	Mendes-Neto <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus regani</i>	72	28M/SM + 44ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus regani</i>	72	26M/SM + 46ST/A	-	-	Múltiplas	-	Endo <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus regani</i>	72	20M/SM + 52ST/A	-	-	Múltiplas	-	Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus regani</i>	72	20M/SM + 52ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus regani</i>	72	30M/SM + 42ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus regani</i>	72	34M/SM + 38ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus regani</i>	72	26M/SM + 42ST/A	-	5S/18S	Simple	-	Ferreira <i>et al.</i> , 2019
<i>Hypostomus regani</i>	72	27M/SM + 45ST/A	-	5S/18S	Simple	-	Ferreira <i>et al.</i> , 2019
<i>Hypostomus soniae</i>	64	34M/SM + 30ST/A	XX/XY	18S	Múltiplas	-	Oliveira <i>et al.</i> , 2019
<i>Hypostomus</i> sp.A	70	32M/SM + 38ST/A	-	-	Múltiplas	-	Artoni & Bertollo, 1966
<i>Hypostomus</i> sp.B	72	30M/SM + 42ST/A	-	-	Múltiplas	-	Artoni & Bertollo, 1966
<i>Hypostomus</i> sp. C	72	28M/SM + 44ST/A	-	-	Múltiplas	-	Artoni & Bertollo, 1966
<i>Hypostomus</i> sp. D ₍₁₎	72	36M/SM + 36ST/A	-	-	Múltiplas	-	Artoni & Bertollo, 1966
<i>Hypostomus</i> sp. D ₍₂₎	72	34M/SM + 38ST/A	-	-	Múltiplas	-	Artoni & Bertollo, 1966
<i>Hypostomus</i> sp 3-Córrego Salobrinha	82	18M/SM + 64ST/A	-	-	-	-	Cereali <i>et al.</i> , 2008
<i>Hypostomus</i> sp 3-Córrego Salobrinha	84	18M/SM + 66ST/A	-	-	-	-	Cereali <i>et al.</i> , 2008
<i>Hypostomus</i> sp 3-Córrego Salobrinha	83	18M/SM + 65ST/A	-	-	-	-	Cereali <i>et al.</i> , 2008
<i>Hypostomus</i> sp 2-Rio Perdido	84	22M/SM + 62ST/A	-	-	Simple	-	Cereali <i>et al.</i> , 2008
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-1	64	32M/SM + 32ST/A	-	-	Múltiplas	-	Milhomem <i>et al.</i> , 2010
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-2	66	32M/SM + 34ST/A	-	-	Múltiplas	-	Milhomem <i>et al.</i> , 2010
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-3	65	38M/SM + 26+1ST/A	-	-	Múltiplas	-	Milhomem <i>et al.</i> , 2010
<i>Hypostomus</i> sp.	68	12M/SM + 56ST/A	-	-	Múltiplas	-	Martinez <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus</i> sp.	74	32M/SM + 42ST/A	-	-	Múltiplas	-	Becker <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus</i> sp. (<i>Hypostomus</i> sp. D1)	72	36M/SM + 36ST/A	-	-	Múltiplas	-	Lorscheider <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus spiniger</i>	66	26M/SM + 40ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Takagui <i>et al.</i> , 2023

<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	26M/SM + 46ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	74	24M/SM + 50ST/A	-	-	Múltiplas	-	Alves <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	24M/SM + 48ST/A	-	-	Múltiplas	-	Endo <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	24M/SM + 48ST/A	-	-	Múltiplas	-	Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	28M/SM + 44ST/A	-	5S/18S	Simples	COI	Pansonato-Alves <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	24M/SM + 48ST/A	-	5S/18S	Múltiplas	-	Baumgartner <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	24M/SM + 48ST/A	-	5S/18S	Múltiplas	-	Baumgartner <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	24M/SM + 48ST/A	-	5S/18S	Múltiplas	-	Baumgartner <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	24M/SM + 48ST/A	-	5S/18S	Múltiplas	-	Baumgartner <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	24M/SM + 48ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	26M/SM + 46ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Rubert <i>et al.</i> , 2016
<i>Hypostomus tietensis</i>	72	16M/SM + 56ST/A	-	18S	Simples	-	Paula <i>et al.</i> , 2022
<i>Hypostomus</i> aff. <i>tietensis</i>	76	14M/SM + 62ST/A	-	18S	Simples	-	Paula <i>et al.</i> , 2022
<i>Hypostomus</i> aff. <i>tietensis</i>	76	14M/SM + 62ST/A	-	18S	Múltiplas	-	Paula <i>et al.</i> , 2022
<i>Hypostomus</i> cf. <i>topavae</i>	80	14M/SM + 66ST/A	-	-	Múltiplas	-	Martinez <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus topavae</i>	80	24M/SM + 56ST/A	-	-	Simples	-	Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus topavae</i>	80	24M/SM + 56ST/A	-	5S/18S	-	-	Bueno <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypostomus</i> aff. <i>topavae</i> (<i>Hypostomus</i> sp. A)	70	32M/SM + 38ST/A	-	-	Múltiplas	-	Lorscheider <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus topavae</i> (<i>Hypostomus</i> sp. E)	80	24M/SM + 56ST/A	-	-	Múltiplas	-	Lorscheider <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus topavae</i>	80	44M/SM + 36ST/A	-	5S/18S	Múltiplas	-	Kamei <i>et al.</i> , 2017
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	28M/SM + 48ST/A	-	18S	Simples	-	Bitencourt <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	32M/SM + 44ST/A	-	18S	Simples	-	Bitencourt <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	24M/SM + 52ST/A	-	18S	Simples	-	Bitencourt <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	30M/SM + 46ST/A	-	18S	Simples	-	Bitencourt <i>et al.</i> , 2012

2n = Número diploide; FC = Fórmula cariotípica; M = Metacêntrico; SM = Submetacêntrico; ST = Subtelocêntrico; A = Acrocêntrico; Crom. sex = sistema sexual; rDNA = Sequências de 5S/18S; NORs = Regiões organizadoras de nucléolo; COI = Citocromo oxidase subunidade I.

1.4 Hibridização *in situ* fluorescente em peixes

A citogenética de peixes obteve um novo rumo a partir de 1980, com a introdução do uso do corante fluorescente na técnica de Hibridização *In Situ* fluorescente (FISH), que permitiu maiores conhecimentos a cerca dos genomas através dos cromossomos, de forma mais detalhada, podendo ser aplicada na detecção de sequências únicas ou repetidas, regiões específicas e até cromossomos totais (Martins *et al.*, 2011). Essa técnica consiste no mapeamento físico de genes ou sequências de DNA específicas nos cromossomos (Pinto-Maglio, 2007).

A técnica da FISH, com aprimoramento de análises tem demonstrado o envolvimento de sequências repetitivas em estudos relacionados a evolução em peixes (Costa *et al.*, 2015). Em peixes esta ferramenta vem sendo amplamente utilizada, permitindo uma observação mais detalhada sobre a diversidade cariotípica, envolvendo questões relacionadas a origem dos cromossomos sexuais, bem como os supranumerários, além da organização dos cromossomos no genoma (Galetti jr & Martins, 2004).

Em peixes os estudos envolvendo essa metodologia utilizam em sua maioria sondas de DNA repetitivo (Martins *et al.*, 2004; Guerra, 2012). Através dessa técnica, estudos têm ajudado a elucidar questões taxonômicas, citogenéticas, filogenéticas e biogeográficas (Vicari *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2016).

Mazzuchelli *et al.* (2012) observaram, através do mapeamento cromossômico comparativo, a linearidade conservativa genética entre ciclídeos, além da dinâmica de sequências repetitivas que atuam no cariótipo, relacionados ao processo evolutivo do genoma. Por outro lado, De Moraes *et al.* (2019), notaram certo grau de divergência aparente entre genomas de Characiformes, apoiando-se em divergências de padrões de bandeamentos e das sequências repetitivas.

Muitos trabalhos em diferentes espécies de peixes vêm sendo realizados e revelam a diversidade de sequências já mapeadas e localizadas em regiões específicas e até de cromossomos inteiros, além do envolvimento destas nos processos evolutivos relacionados aos genomas de peixes (Ferreira *et al.*, 2014; Nishiyama *et al.*, 2015; Camargo *et al.*, 2016; Baumgärtner *et al.*, 2018; Ditcharoen *et al.*, 2019; Glugoski *et al.*, 2020; De Paula *et al.*, 2022; Santos da Silva *et al.*, 2023).

1.5 Aspectos gerais sobre a fração repetitiva dos genomas eucariotos

Os genomas eucariotos são constituídos, em sua maioria, por sequências repetitivas de DNA (Charlesworth *et al.*, 1994; Schmid & Heslop-Harrison, 1998). Inicialmente, esta fração do genoma foi considerada não funcional devido a sua natureza repetitiva, assim como a ausência de genes conhecidos (Schmid & Heslop-Harrison, 1998). Entretanto, devido a popularização de análises genômicas, transcriptômicas e citogenômicas, inúmeras funções têm sido relacionadas aos diferentes grupos de sequências repetitivas em eucariotos, dentre elas o controle da expressão gênica, reparo de quebras no DNA, formação de telômeros e centrômeros, formação de sítios cromossômicos frágeis para quebras cromossômicas e rearranjos, evolução da cromatina sexual e evolução de cromossomos supranumerários (Kidwell & Lisch, 2000; Kidwell, 2002; Ferreira & Martins, 2008).

Atualmente conhece-se inúmeros grupos de sequências repetitivas que apresentam extensa atividade transcricional, sendo responsáveis pela expressão de diferentes tipos de transcritos (RNAs), os quais podem ser traduzidos em proteínas ou executar funções como RNA não codificante. Outros grupos, como as sequências teloméricas e centroméricas, são importantes para estabilidade e proteção de regiões cromossômicas (Martins *et al.*, 2011).

Famílias multigênicas são importantes grupos de DNAs repetitivos, sendo constituídos por genes organizados em repetições *in tandem*, com algumas apresentando intensa atividade transcricional (Martins *et al.*, 2011). Dentre elas, os genes ribossomais (rDNA) são as famílias gênicas mais bem conhecidas, sendo organizadas em dois grupos: o rDNA 45S, o qual é formado por repetições dos genes 5,8S, 18S e 28S, cada um separado do outro por um espaço interno não transcrito; e o rDNA 5S, constituído por repetições de apenas um gene também separados por espaços internos não transcritos; estes genes são responsáveis pela expressão dos RNA ribossomais, os quais estão envolvidos na formação dos ribossomos e maturação do RNA mensageiro (mRNA), (Figura 3) (Long & Dawin, 1980).

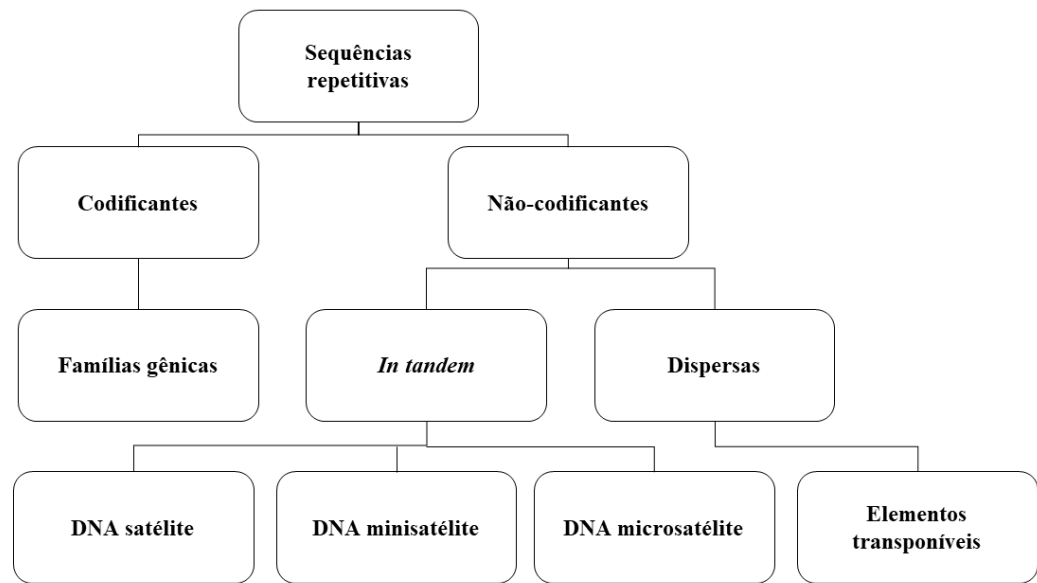


Figura 3. Esquema de organização das classes de DNAs repetitivos em genomas de eucariotos. Fonte: adaptado de Martins *et al.*, (2011).

Além das famílias multigênicas, os elementos de transposição (ETs) representam outro importante grupo de sequências repetitivas presentes nos genomas eucariotos (Volff *et al.*, 1999; Kidwell, 2002). Os ETs são compostos por diferentes classes de DNAs repetitivos capazes de se movimentar entre diferentes regiões do genoma. Estes elementos são classificados em dois grupos principais, baseado nos mecanismos de transposição utilizados: ETs de classe I (ou retrotransposons) e classe II (ou transposons) (Kidwell & Lisch, 2000, Volff *et al.*, 2001; Kidwell, 2002). É digno de nota que os genomas de espécies de peixes apresentam a maior diversidade de ETs conhecidos dentre os vertebrados (Volff *et al.*, 1999; 2000; 2001).

O mapeamento cromossômico de grupos de sequências repetitivas tem revelado diversificados padrões de organização cromossômica, demonstrando padrões compartilhados e/ou particulares para estas sequências nos cromossomos de diferentes espécies, tanto os genes de rDNA quanto os de snRNA, assim como outros grupos de sequências repetitivas incluindo os ETs, têm sido utilizados em análises de citogenética comparativa, evidenciando extensa variação de localização, número de sítios cromossômicos e número de cópias por genoma entre grupos de organismos, sendo muito úteis em análises evolutivas (Cabral-de-Melo *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2017; Pety *et al.*, 2017; Cavalcante *et al.*, 2020).

A grande diversidade cromossômica já observada em peixes sugere a ocorrência de movimentação destas sequências repetitivas nos genomas, promovendo a ocorrência de diversos mecanismos de reorganização cromossômica, incluindo rearranjos dos tipos transposição, deleção, duplicação, translocação, inversão, fusão/fissão (Rosa *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2006; Mariotto *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2010; Pansonato-Alves *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015; Pety *et al.*, 2017).

Considerando a diversidade de ETs, muitos estudos têm evidenciado a participação deste grupo de DNAs repetitivos em mecanismos de reorganização genômica, apresentando papéis importantes na origem de mutações, inativação de genes, origem de sítios regulatórios, evolução da cromatina sexual e rearranjos cromossômicos. A participação dos ETs na origem de rearranjos cromossômicos representa um importante aspecto da biologia deste grupo de sequências repetitivas, apontando para a sua participação direta na reorganização dos genomas eucariotos (Kidwell & Lisch, 2000; Volff *et al.*, 2001; Kidwell, 2002; Schemberger *et al.*, 2019).

Recentemente, análises computacionais de dados de sequenciamento em maior escala têm apontado para a fração repetitiva do genoma como um grande desafio para a montagem de genomas em nível cromossômico, evidenciando que a diversidade desta fração do genoma é maior do que previamente proposto (Crollius & Weissenbach, 2005). Dessa maneira, considerando o aprimoramento na sensibilidade de técnicas moleculares, como a hibridização *in situ* fluorescente, considera-se que a realização de mapeamento *in situ* destas sequências são de grande valor para o conhecimento da diversidade genética, assim como para posteriores estudos que integrem a genômica à citogenética (Schemberger *et al.*, 2019).

1.6 O gênero *Hypostomus* como modelo para estudo de diversidade cromossômica

O gênero *Hypostomus* representa um dos mais diversos da subfamília Hypostominae, apresentando um grande número de espécies não identificadas formalmente, devido às complexidades taxonômicas observadas entre as espécies e populações (Rocha-Reis *et al.*, 2021). Apesar de dados morfológicos e moleculares indicarem que Loricariidae representa um grupo monofilético, as relações filogenéticas das espécies de *Hypostomus* são constantemente revisadas, apresentando apoio fraco a moderado em análises moleculares (Lujan *et al.*, 2015).

Outro importante aspecto da biologia das espécies de *Hypostomus* é a diversidade cromossômica (Artoni & Bertollo, 2001). As espécies deste gênero têm sido amplamente estudadas do ponto de vista cromossômico (Tabela 1). Entretanto, levando em consideração o número de espécies descritas e a plasticidade fenotípica, o uso de ferramentas citogenéticas pode ajudar a elucidar a evolução cromossômica deste grupo de peixes (Kamei *et al.*, 2017; Anjos *et al.*, 2020).

Considerando as variações cromossômicas numéricas, espécies de *Hypostomus* apresentam extensa diversidade, com números diploides ($2n$) variando entre 54 a 84 cromossomos (Mezzomo *et al.*, 2020), com a ocorrência de eventos de fissões e fusões cromossômicas sendo considerados o principal fator para a variação no $2n$ em *Hypostomus* (Bueno *et al.*, 2012). Espécies do gênero *Hypostomus* que apresentam maior número diploide possuem maior proporção de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, em relação as espécies que possuem número diploide menor. Isso pode ser explicado por rearranjos Robertsonianos, eventos que estão relacionados com a evolução cariotípica (Artoni & Bertollo, 1996; 2001). Além disso, a grande diversidade quanto à morfologia dos cromossomos entre espécies/populações de *Hypostomus* tem sido observada, sugerindo a participação de outros rearranjos, como inversões (Bueno *et al.*, 2012; Kamei *et al.*, 2017).

Em relação a distribuição de heterocromatina constitutiva (HC), já foram encontrados padrões de banda em regiões teloméricas e pericentroméricas de cromossomos acrocêntricos, além de blocos heterocromáticos em cromossomos metacêntricos e acrocêntricos (Milhomem *et al.*, 2010; Traldi *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2015; Brandão *et al.*, 2018; De Paula *et al.*, 2022).

Além da HC, vale ressaltar a diversidade cromossômica de genes de rDNA. Essas sequências representam um importante aspecto da evolução de cromossomos em peixes, incluindo espécies da família Loricariidae. Em *Hypostomus* estes genes têm sido mapeados em diferentes espécies/populações, evidenciando grande diversidade quanto a localização e número de sítios cromossômicos, sugerindo o envolvimento destas sequências em mecanismos de diferenciação dos cariótipos (Pansonato-Alves *et al.*, 2013; Baumgaertner *et al.*, 2014; Rubert *et al.*, 2016). Outro aspecto importante da evolução dos genes de rDNA é a associação destes a outros grupos de sequências repetitivas, incluindo outras famílias gênicas e ETs (Pansonato-Alves *et al.*, 2013). Estas associações sugerem diversificados

mecanismos de evolução para estas sequências, como mecanismos de exaptação molecular de ETs e evolução em concerto de genes de diferentes famílias gênicas (Miller *et al.*, 1997; Havecker *et al.*, 2004; Cavalcante *et al.*, 2020).

Outra ferramenta bastante utilizada para o mapeamento físico cromossômico, e faz parte também da classe de DNAs repetitivos, é a sequência telomérica, que são regiões curtas localizadas nas regiões terminais dos cromossomos, compostas por DNA repetitivo *in tandem*, que promove a estabilidade e integridade dos cromossomos (Monaghan 2010; Ocalewicz 2013). Além disso, sua análise pode permitir a identificação de rearranjos cromossômicos que estão relacionados a fusões cêntricas, redução do número diploide e geração de cromossomos sexuais (Cioffi *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2012). Estudos vem sendo realizados no grupo *Hypostomus*, demonstrando a ocorrência das sequências teloméricas tanto em regiões terminais dos cromossomos, quanto em sítios ITS (Sítio Telomérico Intersticial), sugerindo a ocorrência de outros eventos cromossômicos envolvidos na evolução cariotípica desse grupo (Traldi *et al.*, 2012; Pansonato-Alves *et al.*, 2013).

Outra característica marcante da evolução cromossômica em espécies do gênero *Hypostomus* é a ocorrência de cromossomos sexuais, estes representam componentes enigmáticos nos genomas de peixes. Diferente de outros taxa, como mamíferos e aves, nos peixes estes cromossomos tem evoluído de maneiras independentes em diferentes linhagens, não apresentando uma origem comum (Almeida-Toledo, 2001; Alves *et al.*, 2006).

As ferramentas citogenéticas tem sido úteis em identificar cromossomos sexuais diferenciados em espécies de *Hypostomus*, até mesmo entre linhagens morfológicamente consideradas como da mesma espécie, como é o caso de *Hypostomus ancistroides* (Michele *et al.*, 1977; Kamei *et al.*, 2017). Em espécies de *Hypostomus* são identificados sistemas simples de determinação cromossômica do sexo do tipo XX/XY como em *H. paulinus* e *H. ancistroides* (Michele *et al.*, 1977) e do tipo ZZ/ZW observado em *H. cf. plecostomus*, *H. sp. 'G'* e *H. ancistroides* (Artoni *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2015; Kamei *et al.*, 2017). A ocorrência de cromossomos sexuais, assim como outros rearranjos cromossômicos, podem representar marcadores de isolamento reprodutivo e especiação (King, 1995; Rieseberg, 2001; da Silva *et al.*, 2019).

Análises utilizando estes marcadores em diferentes espécies/populações tem

permitido a identificação tanto de diversidade intraespecífica, como interespecífica, sugerindo extensa plasticidade cromossômica entre espécies deste grupo de peixes (Michele *et al.*, 1977; Artoni & Bertollo, 2001; Kamei *et al.*, 2017).

Desta forma, a realização de estudos cromossômicos, principalmente utilizando sequências de DNA repetitivo, podem fornecer dados importantes sobre a real biodiversidade de grupos taxinocamente problemáticos, assim como fornecer informações relevantes para estudos em sistemática e evolução em espécies de peixes neotropicais do gênero *Hypostomus*. Portanto, análises envolvendo o mapeamento cromossômico de sequências repetitivas são de grande importância para estudos de diversidade cromossômica e genômica, especialmente em organismos não modelo, cuja diversidade genética é pouco conhecida, como é o caso das espécies de peixes neotropicais do gênero *Hypostomus*.

1.7 DNA *barcoding* como ferramenta taxonômica

A biodiversidade existente na terra apesar de bastante estudada, ainda não alcança a sua real proporção, a compreensão da diversidade biológica abrange a variação entre organismos, ecossistemas terrestres e aquáticos, além de outros ecossistemas ecológicos, dentro e entre espécies nesses ecossistemas (Feio *et al.*, 2020). Estimar a biodiversidade de organismos requer muitos estudos e, por isso, técnicas moleculares desempenham vantagens na atuação da abordagem baseada no DNA, por serem padronizadas e não necessitarem de conhecimentos taxonômicos (Comtet *et al.*, 2015).

Dessa forma, a técnica de DNA *barcoding* (Código de barras de DNA), que se trata de sequências que podem identificar uma espécie, é realizada por meio do sequenciamento de uma região com um gene bem definido, sendo esta técnica realizada através de um espécime, independente dos caracteres morfológicos ou período de vida, por meio do DNA extraído que posteriormente é amplificado utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) (Purty *et al.*, 2016).

O sistema de identificação molecular de DNA *barcoding*, foi proposto por Hebert *et al.* (2003), apontando quatro limitações estimadas para a identificação taxonômica de espécies: plasticidade fenotípica, variabilidade genética, chaves morfológicas eficazes para determinação de apenas um estágio de vida ou gênero, e identificações equivocadas. Além disso, esta abordagem é sugerida para a análise molecular, pela robustez dos primers

universais utilizados como o gene *COI* (Citocromo oxidase subunidade I), sendo interessante pela vasta quantidade de sinais filogenéticos que este gene apresenta, se comparado aos demais genes mitocondriais, por sua alta taxa de evolução molecular tornando-se eficaz para a discriminação de espécies relacionadas, bem como de grupos filogeográficos dentro de uma mesma espécie (Cox & Heberto 2001; Wares & Cunningham 2001).

O DNA barcoding é amplamente utilizado nos estudos da biodiversidade como uma ferramenta na identificação de espécies (Ospina-Alvarez & Piferrer, 2008). Para realizar a técnica de maneira vantajosa, é utilizado o DNA mitocondrial por ser abundante e de fácil acesso, além disso, o gene *COI* que pode ser utilizado nesse método, já possui iniciadores bem estabelecidos para vários filos animais, podendo ser isolado e estudado através de primers universais (Kosmann, 2009).

O gene *COI* foi proposto como um marcador universal para a identificação biológica de animais, por ser um gene mitocondrial conservado, além de ser mais informativo na diferenciação ou distinção de espécies relacionadas (Hebert *et al.*, 2003). Além do *COI*, outros genes também têm sido sugeridos na realização do *barcoding*, como os genes: RNA ribossômico 12S (rRNA), 16S e Citocromo B (Cyt B) (Miya *et al.*, 2015; Olds *et al.*, 2016; Evans *et al.*, 2017).

Com a criação deste método, foram elaborados bancos de dados, onde as sequências de espécies são depositadas, como o Barcode of life data system (BOLD) e o Genbank, que foram desenvolvidos para armazenar, auxiliar na aquisição e publicação de códigos de barras de DNA, sendo o primeiro considerado maior banco de dados para esses fins (Ratnasingham & Hebert, 2007). O DNA *barcoding* tornou-se amplamente aplicado, uma vez que a utilização de tecnologias de sequenciamento cresceu, dessa forma diminuindo os custos e aumentando a variedade de aplicações desta metodologia em estudos de biodiversidade (Taberlet *et al.*, 2012; Hebert *et al.*, 2018). Com o avanço do uso do código de barras de DNA, houve o desenvolvimento e aprimoramento do sequenciamento, como o metabarcoding de DNA, capaz de realizar análises envolvendo comunidades inteiras e complexas, além da expansão da técnica de *barcoding* e bibliotecas de DNA (Taberlet *et al.*, 2012; Beng & Corlett, 2020)

Assim, a identificação morfológica, aliada a identificação molecular, tem sido

utilizada em diversos estudos no grupo de peixes, em questões taxonômicas envolvendo a família Loricariidae (Cramer *et al.*, 2007; Roxo *et al.*, 2012; Fisch-Muller *et al.*, 2018; Thimotheo *et al.*, 2020; Londõno-Burbano *et al.*, 2023), em específico no gênero *Hypostomus* (Cardoso *et al.*, 2012; Pansonato-Alves *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2019; Anjos *et al.*, 2020; Azevedo *et al.*, 2021).

Diante disso, *Hypostomus* é um gênero que possui similaridades no padrão morfológico, além de apresentar poucos caracteres morfológicos externamente, o padrão de coloração dos espécimes pode variar intra-especificamente, assim como a existência de polimorfismos intrapopulacionais (Zawadzki *et al.*, 2012). Esses fatores, podem dificultar o processo de identificação taxonômica, tanto de espécies, quanto de populações. Por isso, a metodologia de DNA *barcoding* integrada a outras metodologias pode auxiliar na resolução de questões taxonômicas a nível de espécie, para que seja compreendida a diversidade deste grupo, além da variabilidade genética existente entre populações.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar comparativamente os cariótipos de espécies/populações de *Hypostomus* a fim de verificar o envolvimento de sequências repetitivas de DNA na diversificação cromossômica e identificar as espécies utilizando dados moleculares.

2.2 Específicos

- I) Descrever e comparar os cariótipos das amostras analisadas, determinando o número diploide ($2n$), a fórmula cariotípica (FC) e o número fundamental (NF);
- II) Descrever e comparar a localização de regiões de heterocromatina constitutiva (HC) a fim de observar possível diversidade intra e interpopulacional envolvendo este marcador;
- III) Determinar e comparar a localização física de sequências de DNA repetitivo nos cariótipos das espécies/populações analisadas, a fim de observar possível diversidade molecular envolvendo esta fração do genoma;
- IV) Fazer a identificação taxonômica dos espécimes utilizados neste trabalho, por meio do sequenciamento molecular, utilizando o gene *COI*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Neste estudo, foram analisadas amostras de cinco populações de *Hypostomus*, coletadas em diferentes pontos hidrográficos, distribuídas ao longo da bacia do rio Tocantins-Araguaia (Figura 5). A identificação prévia foi realizada com base na análise morfológica utilizando parâmetros especificados na literatura (Armbruster, 2003; Carvalho *et al.*, 2004; Zawadzki *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Zawadzki *et al.*, 2013; Sleen & Albert, 2017) sendo duas espécies, *Hypostomus* cf. *plecostomus* e *Hypostomus* cf. *watwata*. Detalhes sobre o número de amostras analisadas, sexo, depósito em coleção zoológica, pontos de coleta e coordenadas geográficas são descritas na Tabela 2.

Os exemplares analisados foram identificados pelo coordenador da seção de Ictiologia do Museu Paraense Emílio Goeldi, professor Dr. Alberto Akama e mantidos no Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade (CEABIO-UFPA), sob número de registro do protocolo de peixes (Tabela 2). A captura dos espécimes que são objeto deste estudo, foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob número de licença 13248. O Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Pará autorizou o presente estudo (autorização 68/2015).

Os exemplares utilizados neste estudo foram coletados durante o início da noite e com maré baixa, por conta do hábito noturno e bentônico. Depois de coletados, os espécimes foram transportados vivos para o Laboratório de Ictiologia Amazônica (LABICAM-IFPA campus Abaetetuba) em sacos plásticos de 30 L contendo água e oxigênio. Em seguida, os exemplares foram colocados em caixas d'água limpas e oxigenadas, sendo separados por localidade de coleta. Ao todo, 27 exemplares pertencentes ao gênero *Hypostomus* compõem a amostra deste estudo (Tabela 2; Figura 4).



Figura 4. Imagem de uma das amostras do gênero *Hypostomus* analisada neste trabalho. Barra de escala: 1 cm. (Fonte: Autor)

Tabela 2. Total de espécimes do presente estudo.

Espécie	Sexo	Protocolo de depósito	Localidade	Cidade/Estado	Coordenadas
<i>Hypostomus cf. plecostomus</i>	2 ♂/2 ♀	P4204 P4205 P4206 P4207	Rio Maracapucú	Abaetetuba/Pará	S01°45'29,2" / W48°56'57"
<i>Hypostomus cf. watwatta</i>	1 ♂	P4210	Rio Maracapucú	Abaetetuba/Pará	S01°45'29,2" / W48°56'57"
<i>Hypostomus cf. plecostomus</i>	6 ♀	P4217 P4218 P4219 P4220 P4225 P4228	Rio Quianduba	Abaetetuba/Pará	S01°45'18,2" / W49°00'38,8"
<i>Hypostomus cf. plecostomus</i>	5 ♂/3 ♀/ 1 imaturo	P4283 P4284 P4285 P4286 P4294 P4295 P4296 P4300 P4301	Ilha do Tabatinga	Abaetetuba/Pará	S01°24'23,5" / W48°53'40,7"
<i>Hypostomus cf. plecostomus</i>	2 ♂/1 imaturo	P4293 P4302 P4315	Rio Sirituba	Abaetetuba/Pará	S01°64'54,2" / W48°93'33,3"
<i>Hypostomus cf. watwatta</i>	1 ♂	P4291	Rio Sirituba	Abaetetuba/Pará	S01°64'54,2" / W48°93'33,3"

<i>Hypostomus cf. plecostomus</i>	1 ♂/2 ♀	P4306 P4307 P4308	Ilha do Capim	Abaetetuba/Pará	S 1°34'29.0" / W 48°52'14,2"
-----------------------------------	---------	-------------------------	---------------	-----------------	---------------------------------

3.2 Protocolos De Citogenética

3.2.1 Obtenção de cromossomos metafásicos e tecidos

Para obtenção de cromossomos metafásicos, os animais foram tratados com solução de Colchicina (0,025%), injetada na região dorso lateral e então mantidos em aquário por 40 minutos. Após eutanásia, foi realizada a extração das células dos rins anterior e posterior, como descrito por Bertollo *et al.* (1978). Os rins foram extraídos com auxílio de pinça, macerados e colocados em placas de Petri contendo 20 ml de solução hipotônica e mantidos em estufa a 37°C por 30 minutos. Após, foi adicionado Fixador Carnoy 3:1 (3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético). A solução foi homogeneizada na placa de Petri e transferida para tubo Falcon. A suspensão celular foi centrifugada a 900 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, o sobrenadante dispensado e novamente foi adicionado fixador. Então, a suspensão celular foi armazenada em freezer (-20°C) até o momento da utilização. Além disso, para cada exemplar submetido a extração de cromossomos metafásicos foram extraídos também amostras de tecido (músculo e/ou fígado) para montagem de um banco de tecidos e extração de DNA genômico para estudos moleculares.

3.2.2 Técnica de coloração convencional

As lâminas já prontas, contendo o material cromossômico, foram coradas com Giemsa (5%) durante 10 minutos, e então observadas e analisadas quanto ao número e morfologia dos cromossomos com auxílio de microscópio óptico.

3.2.3 Bandeamento C

A localização de regiões de heterocromatina constitutiva (bandas C) seguiram o protocolo proposto por Sumner (1972), com modificações.

As lâminas foram imersas em solução de HCl 0,2 N por 10 minutos em temperatura ambiente. Após, colocadas em BaOH₂ 2% durante 30 segundos a 60°C em banho maria. Logo em seguida, para que seja interrompida a ação do BaOH₂ 2%, as lâminas imediatamente foram postas em solução de HCl 0,1 N durante 1 minuto a 60°C. Na sequência, as lâminas foram colocadas em solução salina (2xSSC) por 10 minutos a 60°C. Finalmente, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 5 minutos e então analisadas em microscópio óptico.

3.2.4 Extração de DNA

O DNA genômico, foi extraído do tecido muscular do animal e fixado em etanol 100%, sendo obtidos utilizando PureLink Genomic DNA MiniKit (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante.

3.2.5 Isolamento e amplificação dos DNAs repetitivos

As sequências de DNAs repetitivos de interesse para o mapeamento cromossômico foram isoladas e amplificadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores descritos na literatura (Tabela 3).

Tabela 3. Lista dos DNAs repetitivos e os iniciadores que foram utilizados para amplificação e isolamento de sequências repetitivas em *Hypostomus*.

DNA repetitivo	Iniciadores	Referências
rDNA 18S	F:5' -CCGCTTTGGTGACTCTTGAT-3' R:5' -CCGAGGACCTCACTAAACCA-3'	Gross <i>et al.</i> , 2010
rDNA 5S	F:5' -GCCACACCACCTGAACAC-3' R:5' -GCCTACGACACCTGGTATTC-3'	Suares <i>et al.</i> , 2017
Telomérica	F 5'-TAGGTTAGGTTAGGTTAGG-3' R 5'- AACCTAACCTAACCTAACCC-3'	Ijdo <i>et al.</i> , 1991

3.2.5.1 Protocolo para obtenção da sonda de rDNA 18s

As sondas de rDNA 18S foram obtidas através de PCR, a partir do DNA total de *Hypostomus plecostomus*, utilizando os primers descritos na Tabela 3. Esta sonda foi marcada através de PCR com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science). A detecção do sinal de hibridização foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science).

Os reagentes para a reação de PCR foram os seguintes:

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	17,5 µl
Tampão (10x)	2,5 µl
dNTP mix (8mM)	1,5 µl
Primer F	1,5 µl
Primer R	1,5 µl
DNA (100ng)	1 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µl
Taq polimerase	0,25 µl

Volume final 25 µl

As condições de temperatura para PCR foram as seguintes:

95°C – 5'
30X {

- 95°C – 40"
- 55°C – 40"
- 72°C – 2'
- 72°C – 5'

4°C – manutenção

3.2.5.2 Protocolo para obtenção da sonda de rDNA 5s

As sondas de rDNA 5S foram obtidas através de PCR, a partir do DNA total de *Hypostomus plecostomus*, utilizando os primers descritos na Tabela 3. Esta sonda foi marcada, através de PCR com Biotina-16-dUTP (Invitrogen) por PCR; a detecção do sinal de hibridização foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC).

Os reagentes para a reação de PCR foram os seguintes:

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	15,5 µl
Tampão (10x)	2,5 µl
dNTP mix (8mM)	1,5 µl
Primer F	1,5 µl
Primer R	1,5 µl
DNA (100ng)	1,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,7 µl
Taq polimerase	0,3 µl
Volume final	25 µl

As condições de temperatura para PCR foram as seguintes:

95°C – 5'
30X {

- 95°C – 40"
- 55°C – 40"
- 72°C – 2'
- 72°C – 5'

4°C – manutenção

3.2.5.3 Protocolo para obtenção da sonda telomérica

As sondas Teloméricas foram obtidas através de PCR, utilizando os primers descritos na Tabela 3. Esta sonda foi marcada, através de PCR com Biotina-16-dUTP (Invitrogen) por PCR, a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando FITC.

Os reagentes para a reação de PCR foram os seguintes:

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	16,45 µl
Tampão (10x)	2,5 µl
dNTP mix (8mM)	2,5 µl
Primer F	1,25 µl
Primer R	1,25 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µl
Taq polimerase	0,3 µl
Volume final	25 µl

As condições de temperatura para PCR foram as seguintes:

	95°C – 3'
35X	95°C – 1'
	55°C – 1'
	72°C – 2'
	72°C – 5'

4°C – manutenção

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da amplificação da sequência desejada.

3.2.6 Marcação das sondas

As sondas foram marcadas também através de PCR utilizando a incorporação de dUTP biotilado (Invitrogen) seguindo os protocolos de amplificação por PCR para cada uma das sequências: por nick-translation usando o kit Bionick (Invitrogen) para marcação com

biotina e Dig-nick (Roche) para as marcações com digoxigenina, segundo as instruções do fabricante.

3.2.7 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAs repetitivos

A hibridização das sondas nos cromossomos metafásicos foi realizada segundo a técnica descrita por Pinkel *et al.* (1986), com modificações.

As lâminas da FISH foram tratadas em solução de Pepsina (1%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, lavadas 3 vezes em solução 2xSSC por 10 minutos cada, também a temperatura ambiente. A seguir, as lâminas passaram por uma série alcoólica para desidratar, nesta ordem: álcool 70% por 2 vezes durante 2 minutos cada, álcool 90% por 2 vezes durante 2 minutos cada; e álcool 100% por 1 vez durante 4 minutos. Então, as lâminas foram envelhecidas durante 1 hora em estufa a 60°C.

Em solução de Formamida 70%, os cromossomos foram desnaturados por um tempo de 55 segundos a 65°C, e posteriormente foram transferidos para o álcool 70% gelado durante 4 minutos. Após as lâminas foram levadas em uma série de álcool, na seguinte ordem: álcool 70% por 1 vez durante 2 minutos; álcool 90% por 2 vezes durante 2 minutos cada; e álcool 100% 1 vez durante 15 minutos. Paralelo à desnaturação cromossômica, a sonda (2µl de sonda em 10µl de tampão de hibridização 77%), foi desnaturada em termociclador a 70°C por 15 minutos. Posteriormente, a sonda foi aplicada sobre o material cromossômico. Finalmente, a lâmina foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida em estufa a 37°C por 24 horas.

Mais tarde as lâminas foram submetidas à lavagem de estringência em banho maria a temperatura de 42°C (77% de estringência). No banho maria as lâminas foram imersas em solução de Formamida 50% durante 5 minutos, e logo depois imediatamente colocadas em solução de 2xSSC por 5 minutos e por fim colocadas em solução de 4SSCxTween por 5 minutos.

Os sinais de hibridização foram detectados com anti-digoxigenina-FITC ou avidina-CY₃. Foi adicionado 0,2µl de anti-digoxigenina-FITC ou 0,4µl avidina-CY₃ em 100µl de 4SSCxTween. A solução de detecção foi despejada sobre as lâminas, e então cobertas com parafilme e mantidas em câmara escura por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução de 4SSCxTween 3 vezes por 5 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, foi adicionado 10µl de DAPI com antifade sobre a lâmina, que imediatamente foi

coberta com lamínula, selada com esmalte transparente e armazenada em caixa apropriada.

3.2.8 Obtenção e análise de imagens

As imagens de metáfases submetidas às técnicas de bandeamentos cromossômico foram obtidas através de microscópio Olympus BX41, com câmera digital CCD 1300QDS utilizando software GenAis (Applied Spectral Imaging). As imagens de metáfases submetidas a técnicas fluorescentes foram obtidas utilizando o software Nis-Elements em microscópio de fluorescência Nikon H550S. Os cariótipos foram montados seguindo a classificação da morfologia cromossômica proposta por Levan *et al.* (1964): metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a). A montagem e edição das imagens foi realizada utilizando software Adobe Photoshop 2021. Para a contagem do NF, considerou-se os cromossomos m, sm, e st como de dois braços.

3.3 Protocolos de análise molecular

3.3.1 Amostras e procedimentos laboratoriais

Dos 27 espécimes coletados na Bacia do rio Tocantins-Araguaia, 22 foram inseridos nas análises moleculares; além disso foram incluídas 28 sequências de oito espécies do gênero *Hypostomus* obtidas de estudos prévios (Cramer, Bonatto e Reis, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Frantine-Silva *et al.*, 2015; de Queiroz *et al.*, 2020; Azevedo *et al.*, 2021; Cardoso *et al.*, 2021; Papa *et al.*, 2021). Os 27 exemplares coletados foram identificados previamente como *Hypostomus* sp. e depositados na Coleção Ictiológica do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) (Figura 5 e Tabela 4). Para as análises moleculares utilizamos como grupo externo, a espécie *Hemiancistrus medians* (Kner, 1854), estreitamente relacionada ao gênero *Hypostomus* (Montoya-Burgos *et al.*, 2003; Roxo *et al.*, 2019)

Tabela 4. Amostras sequenciadas neste trabalho e sequências do GenBank usadas neste trabalho. (–) Indica dados não informados ou ausentes.

Espécie	Nº De Campo	Ordem Mapa	Localidade	País	Latitude	Longitude	GenBank	Referências
							COI	
<i>Hypostomus</i> sp.	P4204 P4205 P4206 P4207 P4210	1	Rio Maracapucú	Brasil	01°45'29.2"S	48°56'5.7''W	-	Presente estudo
<i>Hypostomus</i> sp.	P4217 P4218 P4219 P4220 P4225 P4228	2	Rio Quianduba	Brasil	01°45'1.2''S	49°00'38.8''W	-	Presente estudo
<i>Hypostomus</i> sp.	P4283 P4284 P4285 P4300 P4301	3	Ilha do Tabatinga	Brasil	1°24'23.5"S	48°53'40.7''W	-	Presente estudo
<i>Hypostomus</i> sp.	P4291 P4302 P4315	4	Rio Sirituba	Brasil	1°64'54.2"S	48°93'33.3''W	-	Presente estudo
<i>Hypostomus</i> sp.	P4306 P4307 P4308	5	Ilha do Capim	Brasil	1°34'29.0"S	48°52'14.2''W	-	Presente estudo
<i>Hypostomus plecostomus</i>	P24325-H-s	6	Rio Xingu	Brasil	1°73'16.7''S	52°25'44.4''W	MN854602	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus plecostomus</i>	RVGF-062	7	Rio Maroni	Suriname	3°65'7.13''S	53°8'2.5''W	MZ051945	Papa <i>et al.</i> , 2021
<i>Hypostomus plecostomus</i>	GF98_007	8	Rio Kourou	Guiana Francesa	5°05'1.67''S	52°6'89.17''W	MN854630	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus plecostomus</i>	GF10-027	9	Rio Maroni	Suriname	5°33'3.3''S	5°4'1.5''W	MZ051754	Papa <i>et al.</i> , 2021
<i>Hypostomus plecostomus</i>	GFSU12-671	10	Rio Maroni	Guiana Francesa	5°05'1.67''S	52°6'89.17''W	MZ050957	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus plecostomus</i>	GY04_398_H	12	Rio Berbice	Guiana Francesa	5°68'0.47''S	57°8'56.88''W	MN854489	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus plecostomus</i>	SU05_578_H	13	Rio Coppename	Suriname	5°23'1.47''S	55°80'4.31''W	MN854484	Queiroz <i>et al.</i> , 2020

<i>Hypostomus plecostomus</i>	SU05_492_H	16	Rio Courantyne	Suriname	5°0'12.67''S	57°30'6.53''W	MN854486	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus watwata</i>	GF98-146	11	Rio Maroni	Guiana-Francesa	5°67'4.17''S	53°94'6.4''W	MZ051003	Papa <i>et al.</i> , 2021
<i>Hypostomus watwata</i>	SU01_002_H	14	Rio Suriname	Suriname	5°83'4.56''S	55°13'0.06''W	MN854577	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus watwata</i>	GF99_161_H	15	Rio Oiapoque	Guiana-Francesa	4°20'6.39''S	51°66'5.00''W	MN854565	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus watwata</i>	GF10_004_H	17	Rio Kourou	Guiana-Francesa	5°15'1.47''S	52°66'8.66''W	MN854490	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus ancistroides</i>	PDapt33	-	Rio Apertados	Brasil	23°23'27.6''S	50°59'45.6''W	KM897277	Frantine-Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypostomus ancistroides</i>	LBP-32289	-	Bacia do Alto Rio Paraná	Brasil	23°30'3.10''S	52°03'1.70''W	GU701727	Pereira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus ancistroides</i>	LBP-25966	-	Bacia do Alto Rio Paraná	Brasil	21°36'1.29''S	46°55'6.30''W	GU701729	Pereira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus ancistroides</i>	LBP-25964	-	Bacia do Alto Rio Paraná	Brasil	23°30'3.10''S	52°03'1.70''W	GU701726	Pereira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus ericae</i>	P5A_H_eric	-	Rio Tocantins-Araguaia	Brasil	14°42'11.4''S	W - 48°73'5.33''	MN854613	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus ericae</i>	BR1013	-	Bacia do Maranhão	Brasil	14°45'32.3''S	48°43'09.1''W	MK959849	Cardoso <i>et al.</i> , 2021
<i>Hypostomus cochliodon</i>	Z64017	-	Rio Cuiabá	Brasil	14°49'47.6''S	56°24'47.7''W	GQ225397	Cramer <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypostomus cochliodon</i>	LBP-17564	-	Bacia do Alto Rio Paraná	Brasil	21°06'6.69''S	50°1'15''W	HM376401	Pereira <i>et al.</i> , 2021
<i>Hypostomus cochliodon</i>	1154	-	Médio Rio Paraná	Argentina	27°29'32.0''S	56°39'38.0''W	MK959839	Cardoso <i>et al.</i> , 2021
<i>Hypostomus paucipunctatus</i>	MNLM7722_H	-	Rio Xingu	Brasil	7°30'4.17''S	50°44'6.11''W	MN854615	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	LBP-29928	-	Bacia do Alto Rio Paraná	Brasil	17°09'9.39''S	48°76'1.50''W	GU701731	Pereira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	LBP-29929	-	Bacia do Alto Rio Paraná	Brasil	17°09'9.39''S	48°76'1.50''W	GU701730	Pereira <i>et al.</i> , 2013

<i>Hypostomus albopunctatus</i>	LBP-29927	-	Bacia do Alto Rio Paraná	Brasil	17°09'9.39"S	48°76'1.50"W	GU701728	Pereira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	MCP37990	-	Rio Iguaçú	Brasil	25°30'00.0"S	53°25'00.0"W	MK959865	Cardoso <i>et al.</i> , 2021
<i>Hypostomus faveolus</i>	Aqua12_H_f	-	Bacias amazônicas e Rios da Guiana	Brasil e Guiana Francesa	-	-	MN854499	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
<i>Hypostomus faveolus</i>	Aqua11_H_T	-	Bacias amazônicas e Rios da Guiana	Brasil e Guiana Francesa	-	-	MN854497	Queiroz <i>et al.</i> , 2020
Grupo externo <i>Hemiancistrus medians</i>	GF15-447	-	Rio Maroni	Suriname	3°39'21.7"S	53°83'1.1"W	MZ052003	Papa <i>et al.</i> , 2021

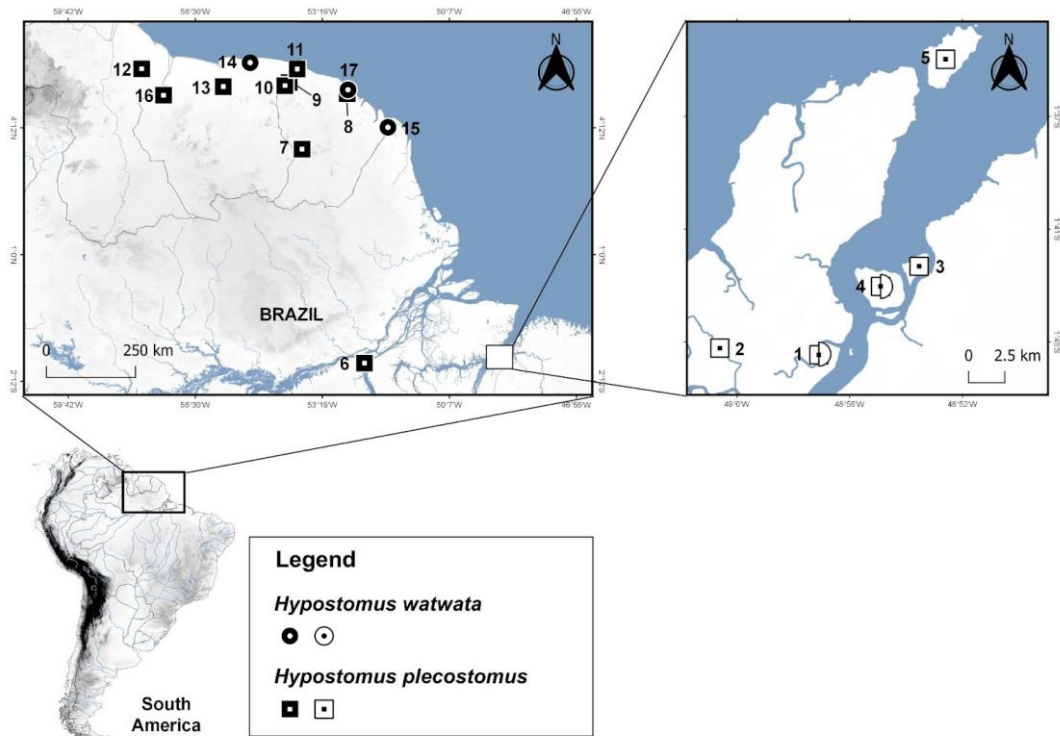


Figura 5. Mapa com distribuição dos espécimes sequenciados utilizados neste trabalho e da literatura. Os ícones que estão em branco, do número 1 ao 5 representam as espécies coletadas neste trabalho, as demais de 6 a 17, representam as sequências da literatura.

O isolamento do DNA total foi feito com procedimentos padrões, utilizando o kit de purificação de DNA (Promega; Wizard®). O gene mitocondrial *COI* foi amplificado por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: Primer forward - FISHF1-5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' e Primer reverse - FISHR1-5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3' (Ward *et al.*, 2005). Esse gene é frequentemente utilizado em *barcoding*, devido ao seu conteúdo filogenético altamente informativo e pela disponibilidade dos primers (de Queiroz *et al.*, 2020; Azevedo *et al.*, 2021; Cardoso *et al.*, 2021; Papa *et al.*, 2021).

Para amplificar o *loci*, foi usado o Kit Master Mix (Promega, Inc.) com as seguintes concentrações e volumes:

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	2,25µl
Master Mix	6,25 µl
Primer F	1,5µl [10 pmol]
Primer R	1,5µl [10 pmol]
DNA	1µl [100 ng/µl]
Volume final	12,5 µl

As condições de temperatura para PCR foram as seguintes:

	95°C – 3'	
35X	{ 95°C – 45'' 56°C – 1' 72°C – 1' }	
		72°C – 7'
		4°C – manutenção

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da amplificação da sequência desejada, e os resultados positivos foram purificados utilizando PEG8000 2,5 M (Hawkins *et al.*, 1994). Após reações de sequenciamento de Sanger utilizando o kit Big Dye Terminator v3.01, os produtos do sequenciamento para ambas as cadeias foram eletroforizados num sequenciador automático ABI 3500, seguindo o protocolo do fabricante (Applied Biosystems, CA).

3.3.2 Análises filogenéticas

As sequências nucleotídicas foram editadas, manualmente no programa BioEdit 7.0.0 (Hall, 1999) e alinhadas no programa MAFFT v.7.4.0.8 (Kato & Standley, 2013). Com o auxílio do programa Data Analysis and Molecular Biology and Evolution - DAMBE v.6.3.109, conduzimos uma análise para avaliar os níveis de saturação nos bancos de dados (Xia & Xie, 2001).

O melhor modelo evolutivo e a melhor partição foram obtidas no programa IQTREE v.2.0 (Nguyen *et al.*, 2015) com a implementação do algoritmo ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) ou pelo programa Parttion Finder v.1.1.2 (Lanfear *et al.*, 2012), usando o banco de dados do gene *COI*. Os melhores esquemas de partição foram selecionados utilizando o Critério de Informação Bayesiano (BIC) em ambos os programas.

Duas filogenias foram estimadas com base no gene *COI*, sendo uma árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) que foi reconstruída com auxílio do programa IQTREE v.2.0 (Nguyen *et al.*, 2015), com 1000 replicações de *bootstrap* paramétrico para investigar o nível de suporte em cada nó. A outra árvore filogenética de Inferência Bayesiana (IB) foi estimada usando o software MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Na IB as buscas pelas melhores árvores foram realizadas com duas execuções independentes e quatro cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) ao longo de 2.000.000 gerações, e amostragem de árvores e parâmetros a cada 1000 gerações. O programa TRACER v.1.7.2 (Rambaut *et al.*, 2018) foi utilizado para avaliar se as execuções alcançaram convergência nos parâmetros estimados e para verificar se os valores do tamanho efetivo da amostra (ESS) foram superiores a 200, conforme recomendado por Drummond e Rambault (2007). As árvores amostradas antes da convergência das cadeias de Markov atingirem a estabilidade, foram descartadas como *burn-in* (25% - as primeiras 500 gerações). Por fim, a árvore filogenética foi visualizada e editada parcialmente no programa Figtree v.1.4.4 (Rambaut, 2012).

3.3.3 Distância genética

A distância genética não corrigida (distância-*p*) foi calculada entre e dentro das espécies do gênero *Hypostomus* usadas nesse trabalho. Todas as análises foram conduzidas pelo programa MEGA v. 11.0 (Tamura *et al.*, 2021).

4 RESULTADOS

4.1 Citogenética clássica e molecular

Os espécimes de *Hypostomus plecostomus* do rio Maracapucú apresentam cariótipos com $2n = 68$ cromossomos, $FC = 18m/sm+50st/a$ e $NF = 112$. O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva se manteve nas regiões centroméricas da maioria dos cromossomos. A FISH com sondas teloméricas mostra marcações em regiões terminais de todos os cromossomos, com ausência de ITS.

A FISH com sequência de rDNA 18S mostra marcação em três pares de cromossomos subteloecêntricos (11, 24 e 25) todos na região distal do braço curto (p) e com rDNA 5S mostra marcação simples na região proximal do braço curto do par metacêntrico 9. Não foram identificados cromossomos sexuais heteromórficos (Figura 6).

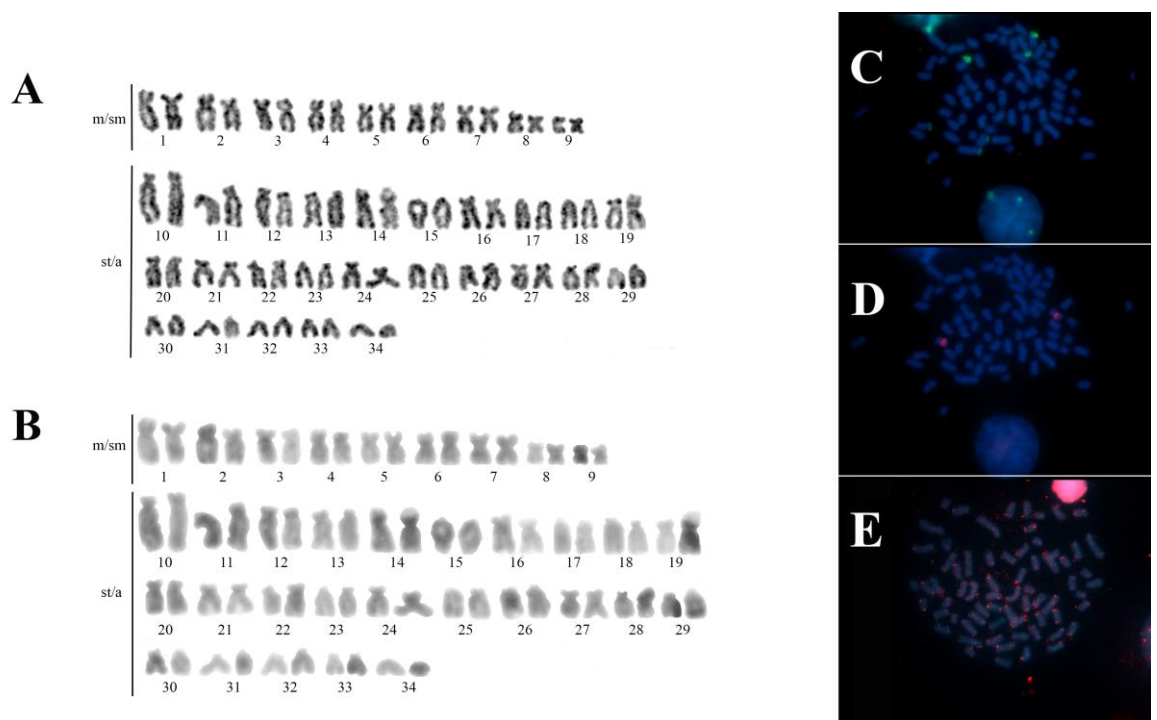


Figura 6. Cariótipo de *Hypostomus plecostomus* do rio Maracapucú. Em (A) e (B) cariótipo corado com Giemsa e bandeamento C, respectivamente; em (C) e (D) localização *in situ* de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), respectivamente; em (E) localização *in situ* de seqüências teloméricas (vermelho).

Os espécimes de *Hypostomus plecostomus* do rio Quianduba apresentam $2n = 68$ cromossomos, $FC = 18m/sm+50st/a$ e $NF = 114$, o par 10 apresentou heteromorfismo de tamanho. O padrão de distribuição da HC se manteve nas regiões centroméricas de alguns

cromossomos e bandas heterocromáticas em regiões intersticiais e distais de alguns pares. As sequências teloméricas foram observadas em regiões terminais de todos os cromossomos, com ausência de ITS demonstradas pela FISH.

A FISH com sequência de rDNA 18S mostra marcação em três pares de cromossomos subteloentrícos (11, 16 e 19) todos na região distal do braço curto (p) e com rDNA 5S apresentou marcação simples na região proximal do braço curto do par metacêntrico 7. Não foram identificados cromossomos sexuais heteromórficos (Figura 7).

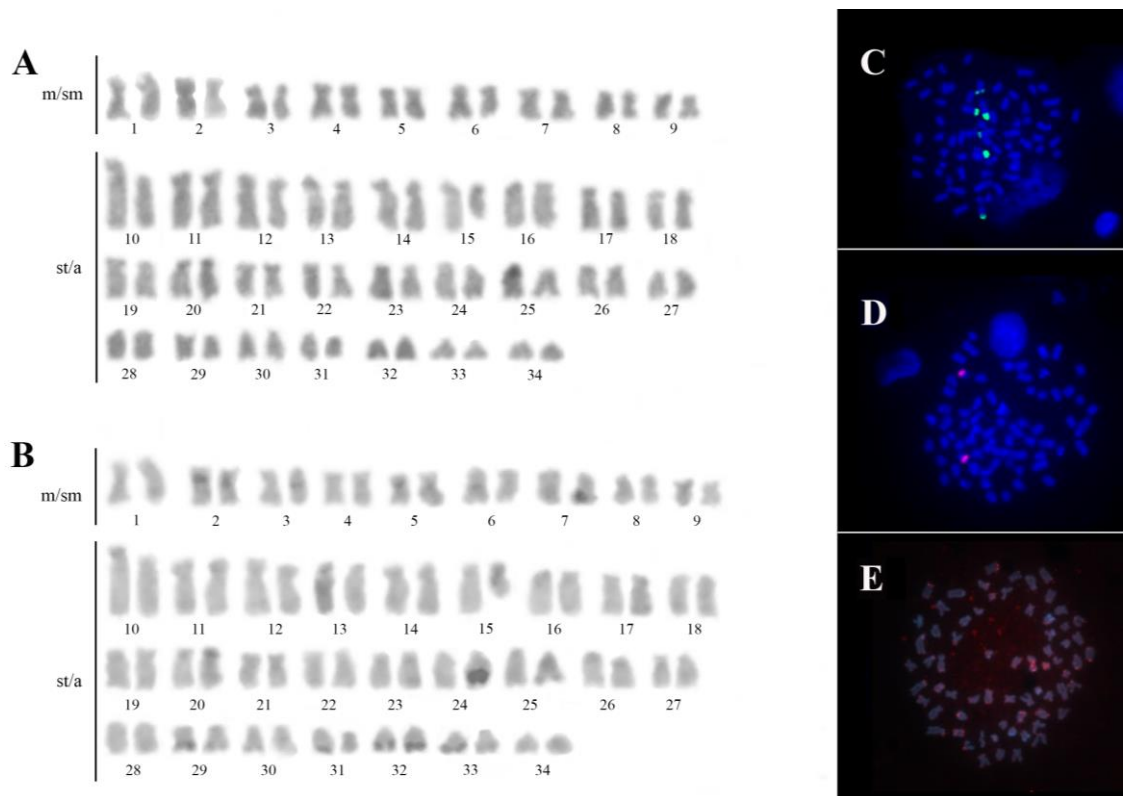


Figura 7. Cariótipo de *Hypostomus plecostomus* do rio Quianduba. Em (A) e (B) cariótipo corado com Giemsa e bandeamento C, respectivamente; em (C) e (D) localização *in situ* de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), respectivamente; em (E) localização *in situ* de sequências teloméricas (vermelho).

Os espécimes de *Hypostomus plecostomus* da ilha do Tabatinga apresentam $2n = 68$ cromossomos, $FC = 14m/sm + 54st/a$ e $NF = 112$. O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva se manteve em regiões intersticiais e distais em alguns pares. As sequências teloméricas ocorrem em regiões terminais de todos os cromossomos, com ausência de ITS demonstradas pela FISH.

A FISH com sonda de rDNA 18S ocorre em três pares, sendo 2 pares de cromossomos subteloentrícos e 1 par de cromossomos metacêntricos (19, 21 e 7) todos na região distal do

braço curto (p) e o rDNA 5S apresentou marcação simples na região proximal do braço curto do par metacêntrico 6. Não foram identificados cromossomos sexuais heteromórficos (Figura 8).

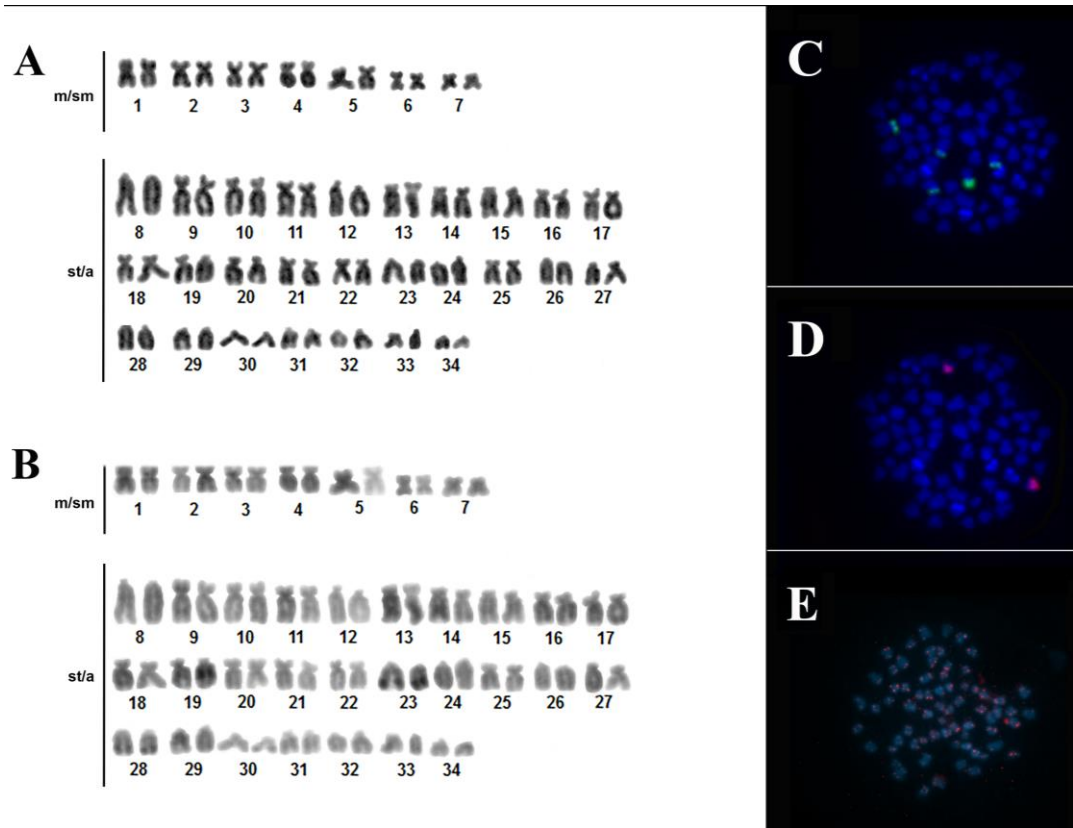


Figura 8. Cariótipo de *Hypostomus plecostomus* da ilha do Tabatinga. Em (A) e (B) cariótipo corado com Giemsa e bandeamento C, respectivamente; em (C) e (D) localização *in situ* de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), respectivamente; em (E) localização *in situ* de sequências teloméricas (vermelho).

Os espécimes de *Hypostomus plecostomus* do rio Sirituba apresentam $2n = 68$ cromossomos, $FC = 20m/sm + 48st/a$ e $NF = 108$. O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva se manteve na região centromérica de alguns pares de cromossomos, em regiões intersticiais e distais de alguns pares. A FISH com sondas teloméricas mostra marcação nas regiões terminais de todos os cromossomos, com ausência ITS.

A FISH com sequência de rDNA 18S mostra marcação em 5 cromossomos, sendo na região distal de um par acrocêntrico (15q) e de um par subtelocêntrico (16p) e na região distal do braço curto de um cromossomo subtelocêntrico (11p). O rDNA 5S apresentou marcação simples na região proximal do braço curto do par metacêntrico 6. Não foram identificados cromossomos sexuais heteromórficos (Figura 9).

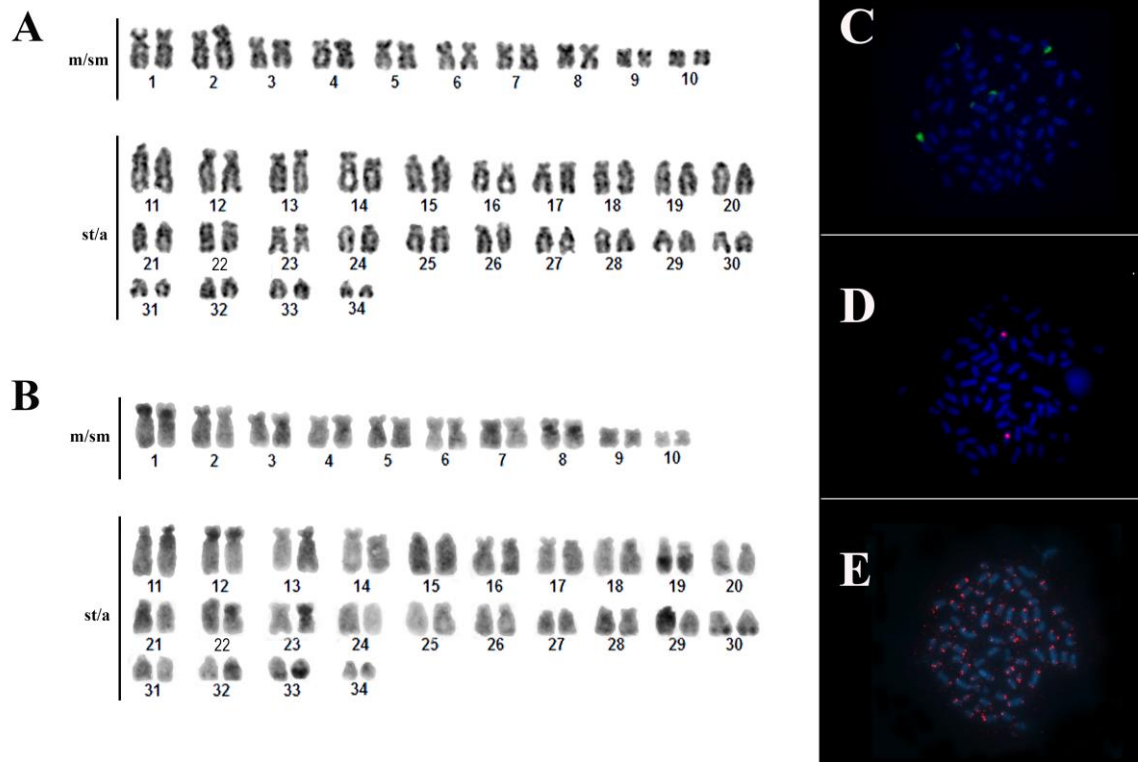


Figura 9. Cariótipo de *Hypostomus plecostomus* do rio Sirituba. Em (A) e (B) cariótipo corado com Giemsa e bandeamento C, respectivamente; em (C) e (D) localização *in situ* de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), respectivamente; em (E) localização *in situ* de seqüências teloméricas (vermelho).

Os espécimes de *Hypostomus plecostomus* da Ilha do Capim apresentam $2n = 68$ cromossomos, $FC = 22m/sm + 46st/a$ e $NF = 112$, com heteromorfismo de tamanho do par 34. A HC se manteve distribuído no braço curto de alguns pares de cromossomos. As seqüências teloméricas ocorrem nas regiões terminais de todos os cromossomos, com ausência de ITS, demonstradas pela FISH.

A FISH com seqüência de rDNA 18S mostra marcação em 3 pares de cromossomos, sendo na região distal de 2 pares subteloicêntricos (20p e 26p), e na região distal do braço curto de dois cromossomos metacêntricos não homólogos (8p e 10p). O rDNA 5S apresentou marcação simples na região proximal do braço curto do par metacêntrico 11. Não foram identificados cromossomos sexuais heteromórficos (Figura 10).

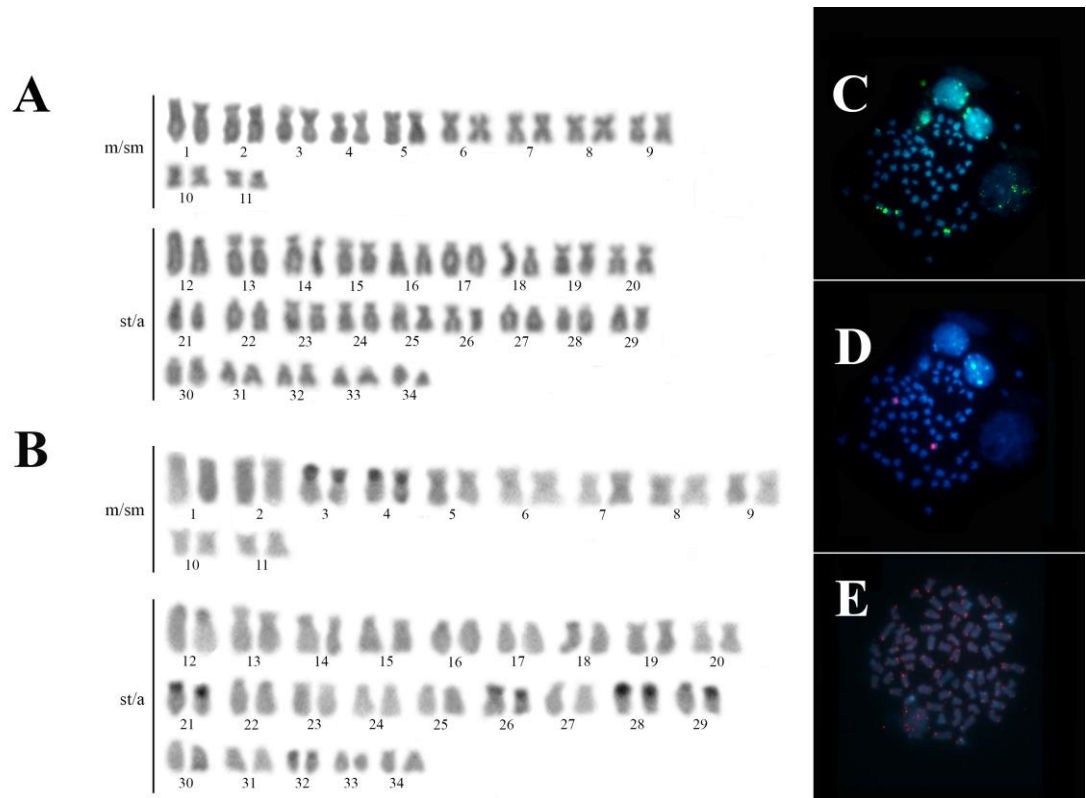


Figura 10. Cariótipo de *Hypostomus plecostomus* da ilha do Capim. Em (A) e (B) cariótipo corado com Giemsa e bandeamento C, respectivamente; em (C) e (D) localização *in situ* de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), respectivamente; em (E) localização *in situ* de sequências teloméricas (vermelho).

4.2 Resultados moleculares

4.2.1 Reconstruções filogenéticas

Foram obtidos um total de 611 pares de bases (pb) para 50 espécimes de *Hypostomus* incluídas na análise molecular do gene *COI*. A melhor partição e o melhor modelo evolutivo usado na análise de ML foi: TNe+I: (1° e 2° códon) e TN+F+G4: (3° códon). Já para análise de IB a melhor partição e o melhor modelo evolutivo foi: K80 (1° códon), F81 (2° códon) e HKY+G (3° códon). Não foi observada saturação de bases no gene estudado. Todas as sequências produzidas neste trabalho serão depositadas no GenBank.

As filogenias estimadas de ML e IB com base no gene *COI*, de maneira independente recuperaram oito filogrupos correspondentes a oito espécies do gênero *Hypostomus*, sendo elas: *H. plecostomus*, *H. watwata*, *H. ancistroides*, *H. ericae*, *H. cochliodon*, *H. paucipunctatus*, *H. albopunctatus* e *H. faveolus*. Das 22 amostras de *Hypostomus* sp. coletadas na região da bacia do Rio Tocantins-Araguaia, 20 espécimes apresentaram relação filogenética com a espécie *Hypostomus plecostomus* com *bootstrap* (ML) de 92% e probabilidade posterior (IB) 1. Os

outros dois espécimes (P4291 e P4210) apresentaram relação filogenética com a espécie *Hypostomus watwata* com bootstrap (ML) de 99% e probabilidade posterior (IB) 1 (Figura 11).

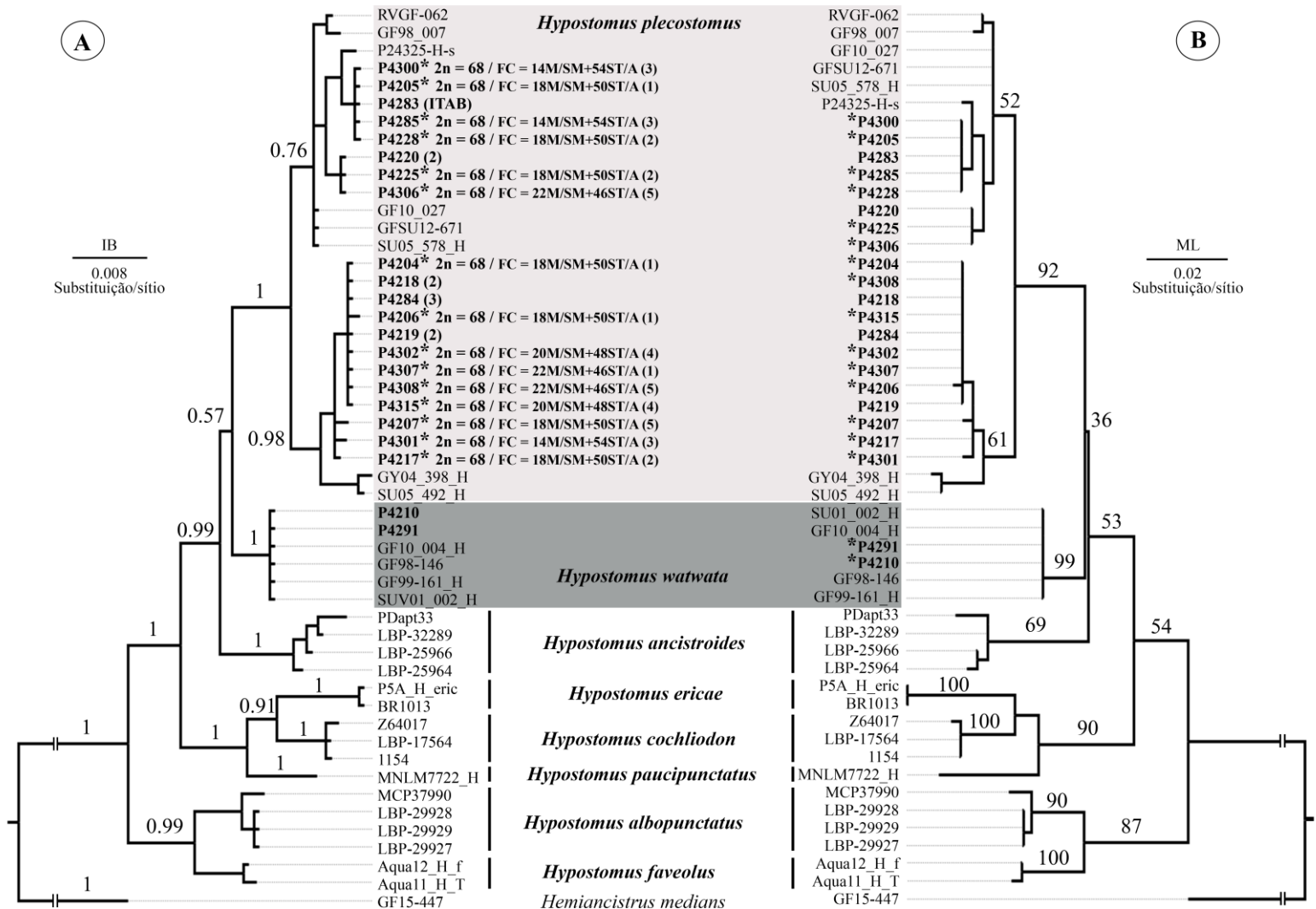


Figura 11. Árvores filogenéticas do gênero *Hypostomus* com base no gene *COI*. **A** – Indica árvore filogenética de inferência bayesiana (IB) e **B** – Indica árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML). Em negrito as amostras coletadas na Bacia do Rio Tocantins- Araguaia. Os (*) indicam amostras com informação citogenética. 2n = número diploide, FC = Fórmula cariotípica. (1) Rio Maracapucú, (2) Rio Quianduba, (3) Ilha do Tabatinga, (4) Rio Sirituba e (5) Ilha do Capim.

4.2.2 Distâncias genéticas

As médias das distâncias genéticas p não corridas dentro e entre as espécies do gênero *Hypostomus* analisados neste trabalho, com base no gene *COI*, são apresentadas na Tabela 4. Os índices baseados no gene *COI* variaram entre as espécies de *Hypostomus* de 1.9% (*H. albopunctatus* e *H. faveolus*) até 6% (*H. albopunctatus* e *H. ericae*). Dentro de cada espécie a

variação foi na ordem de 0% (*H. watwata*, *H. ericae*) até 0.8% (*H. plecostomus*). Destacamos que filogeneticamente as espécies (*H. plecostomus* e *H. watwata*) são compatíveis com nossos espécimes, sendo a variação interespecífica de 2.3%, e a variação intraespecífica de cada espécie foi de 0.8% para (*H. plecostomus*) e 0% para (*H. watwata*). Por fim, o gênero *Hypostomus* possui variação de 10.3% até 11.5% comparado com o grupo externo *Hemiancistrus medians* (Tabela 5).

Tabela 5. Médias de distâncias genéticas -p (%) com base no gene *COI*, entre as espécies do gênero *Hypostomus* e em negrito as médias dentro de cada espécie. – Indica ausência de informação, devido *H. paucipunctatus* só possuir um espécime para esse gene. *Hemiancistrus medians* é usado como grupo externo.

	<i>Hemiancistrus medians</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
1- <i>H. faveolus</i>	10.5	0.1							
2- <i>H. paucipunctatus</i>	11.1	4.1	-						
3- <i>H. cochliodon</i>	11.5	4.5	2.6	0.1					
4- <i>H. ericae</i>	11.4	5.4	3.1	2.3	0.0				
5- <i>H. watwata</i>	11.3	3.8	3.4	3.1	3.9	0.0			
6- <i>H. plecostomus</i>	10.9	5.2	4.0	4.7	5.0	2.3	0.8		
7- <i>H. albopunctatus</i>	10.7	1.9	4.6	4.7	6.0	4.0	5.2	0.2	
8- <i>H. ancistroides</i>	10.3	4.8	3.9	4.4	4.9	2.2	3.1	5.0	0.4

5 DISCUSSÃO

5.1 Dados citogenéticos

O número diploide de representantes do gênero *Hypostomus* varia de 54 a 84 cromossomos, sendo o cariótipo com $2n=84$ e vários cromossomos acrocêntricos considerado derivado para o grupo. Os espécimes estudados neste trabalho apresentam $2n=68$, estando dentro da variação encontrada no gênero (Tabela 1) (Cereali *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2013; Anjos *et al.*, 2020; De Paula *et al.*, 2022; Takagui *et al.*, 2023).

Segundo Artoni & Bertollo (2001), espécies com número cromossômico elevado poderiam ser derivadas, devido aos rearranjos cromossômicos que são importantes para a evolução cariotípica em Hypostominae. Entretanto, Bueno *et al.* (2012) sugerem que não há uma relação entre a quantidade de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos com o número de cromossomos, seguindo o pressuposto, de que mesmo entre espécies com o mesmo $2n$ há uma variação considerável entre esses números, sugerindo que a proporção da morfologia dos cromossomos não necessariamente esta relacionada em todos os casos ao número diploide. De fato, a variação nas fórmulas cariotípicas para espécies com $2n = 68$, tanto para os espécimes deste trabalho quanto para outros deste grupo (Rubert *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012; Maurutto *et al.*, 2013), demonstra a importância dos rearranjos cromossômicos na evolução cariotípica de *Hypostomus* (Kamei *et al.*, 2017). (Figura 12).

Observamos grande variação da distribuição da heterocromatina constitutiva, dispersas nas regiões centroméricas de vários cromossomos, assim como em blocos heterocromáticos em regiões intersticiais e distais. Isto está de acordo com os dados da literatura sobre o grupo *Hypostomus*, que revela padrões diversificados de distribuição de heterocromatina constitutiva, como observado em *H. spiniger*, que apresenta pouca quantidade em regiões pericentroméricas (Takagui *et al.*, 2023), enquanto que *Hypostomus tietensis* apresentou grandes blocos terminais em vários cromossomos (De Paula *et al.*, 2022), demonstrando assim a variabilidade de quantidade e localização de heterocromatina constitutiva dentro do mesmo grupo.

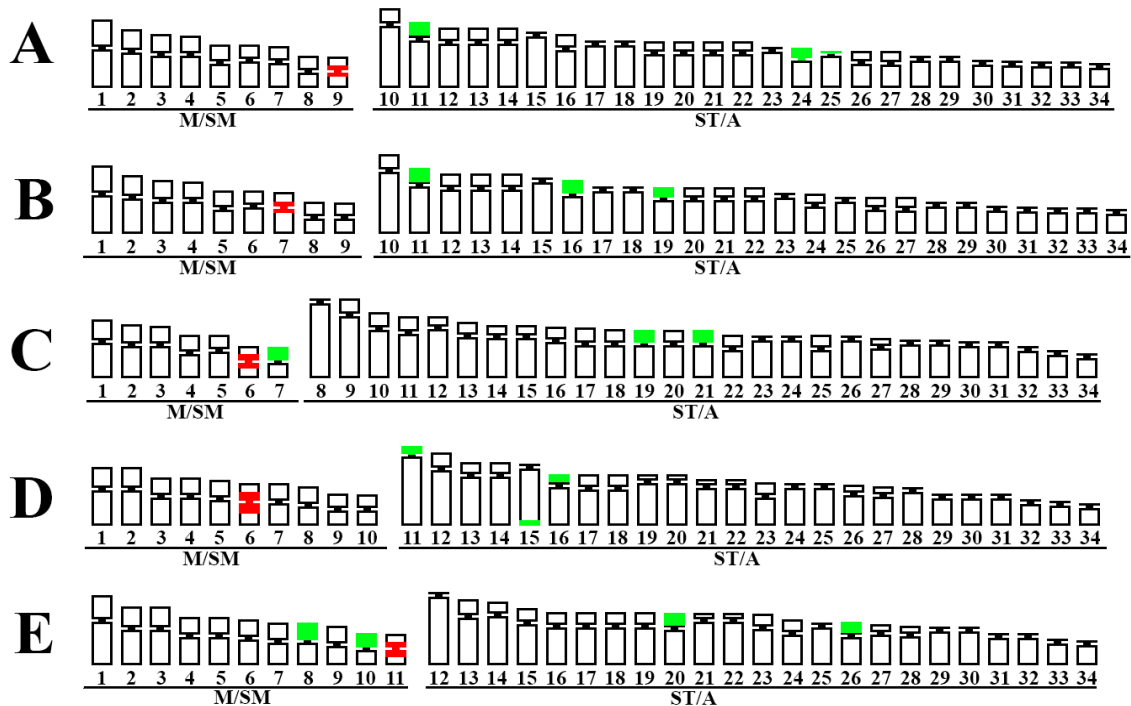


Figura 12. Distribuição de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) nos cariótipos das populações de *Hypostomus plecostomus* deste estudo. Em (A) *Hypostomus plecostomus* do rio Maracapucú. (B) *Hypostomus plecostomus* do rio Quianduba. (C) *Hypostomus plecostomus* ilha do Tabatinga. (D) *Hypostomus plecostomus* do rio Sirituba. (E) *Hypostomus plecostomus* da ilha do Capim.

Com relação a FISH com sondas de rDNA 18S, todos os espécimes analisados apresentaram marcações múltiplas. Bueno *et al.* (2014) em um estudo de mapeamento de rDNA 18S e 5S em espécies de *Hypostomus*, observaram que espécies que possuem número diploide de 68 a 72 cromossomos apresentam marcações múltiplas de rDNA 18S, como observado neste trabalho.

O padrão de distribuição de rDNA 18S observado com frequência para *Hypostomus* são múltiplos sítios em posições terminais como visto nos resultados (Figura 6, 7, 8, 9 e 10), podendo ocorrer variações nos pares de cromossomos que possuem essa repetição de sequências, o que pode ser explicado por rearranjos cromossômicos como inversões e translocações, que podem ter sido ocasionados por eventos de transposição, mecanismos estes que estão relacionados a esse tipo de sequência devido a presença de elementos transponíveis em associação de rDNAs (Dover, 1986; Eickbush & Eickbush, 2007; Rubert *et al.*, 2016). Takagui *et al.* (2023) notaram uma variação numérica intra e interpopulacional do rDNA 18S em *H. spiniger*, sendo representado pela presença desse marcador em 4 *loci*, enquanto alguns indivíduos apresentaram 3 *loci*. Já no presente estudo observamos a presença de 6 sítios em alguns, enquanto em outros apenas 5, este último padrão foi observado na população do rio

Sirituba, podendo evidenciar um polimorfismo; entretanto, a maioria das populações apresentam 6 sítios de rDNA 18S.

Nas análises da FISH, evidenciou-se a presença de sinais de hibridização em cromossomos não homólogos; Traldi *et al.* (2013) relatam que a localização de rDNA em cromossomos que não são homólogos é recorrente. Além disso, translocações que não são recíprocas envolvendo porções terminais podem explicar essa variação numérica, uma vez que as fibras da cromatina estão menos condensadas durante a interfase, podendo ter mais proximidade entre cromossomos não homólogos, promovendo translocações nas porções de segmentos terminais (Cramer *et al.*, 2010). Outra possibilidade seria a dispersão de regiões organizadoras de nucléolo em diferentes cromossomos, o que tem sido relacionado a presença de elementos repetitivos, que podem se inserir em regiões de rDNA18S e dispersar para outros locais cromossômicos (Raskina *et al.*, 2004; Takagui *et al.*, 2021).

Os sítios de rDNA 18S foram observados não somente em cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, mas também em cromossomos metacêntricos, como já observado por Kamei *et al.* (2017), a maioria das espécies apresentam 3 pares de cromossomos com sítios de rDNA 18S. Dessa forma, o gênero *Hypostomus*, vem sendo mapeado em diversos estudos, demonstrando a variação de sítios de rDNA 18S, localizados de forma simples ou múltipla, em cromossomos homólogos e não homólogos, sendo estes dados importantes para os estudos citotaxonômicos de espécies do grupo, demonstrando ser um marcador citogenético significativo a nível de espécie (Rubert *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2016; Kamei *et al.*, 2017; Brandão *et al.*, 2018; Rocha-Reis *et al.*, 2021; De Paula *et al.*, 2022; Takagui *et al.*, 2023).

Em todas as populações de *Hypostomus* deste trabalho foram observadas marcações simples de rDNA 5S na região proximal do braço curto de cromossomos metacêntricos, sendo esta ocorrência uma condição marcante em trabalhos envolvendo este grupo. Traldi *et al.* (2013) sugeriram que este evento possa representar uma característica primitiva para *Hypostomus*.

Assim como no presente estudo, Lorscheider *et al.* (2018) evidenciaram através da técnica da FISH marcações simples de rDNA 5S em *H. derbyi* e *H. myersi*, em cromossomos metacêntricos. No entanto, *H. commersoni* apresentou sítios múltiplos em cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos sugerindo a ocorrência de um *crossing over* desigual na associação de sequências repetitivas, causadas por movimentação dos elementos

transponíveis associados ao rDNA 5S (Symonová *et al.*, 2013).

Brandão *et al.* (2018) corroboramos com os dados dos autores, em nossos resultados apresentando sítios simples de rDNA 5S em *Hypostomus*. Em contrapartida, Kavalco *et al.* (2004) detectaram em *H. affinis* a presença de regiões múltiplas em quatro pares de cromossomos, sugerindo a ocorrência de eventos de duplicação contribuindo na dispersão dessa sequência. Pansonato-Alves *et al.* (2013), observaram variação no número de sítios de rDNA 5S, em espécies do gênero *Hypostomus*, no entanto, não chegaram a sugerir um evento único que ocorra para estabelecer a relação de dispersão das sequências de rDNA 5S, supondo assim que ocorrem eventos independentes de dispersão entre diferentes linhagens de *Hypostomus*.

Segundo da Reis *et al.* (2021), há variações no número de sítios de sequências de rDNA 5S, sendo estes representados por cromossomos metacêntricos/submetacêntricos quando em marcação simples ou múltiplos, sendo posicionados, em sua maioria, em região pericentromérica, como vista neste trabalho, ou região intersticial.

As sequências de rDNA 5S têm sido detectadas no grupo *Hypostomus* apresentando uma distribuição variada na localização entre as espécies (Kavalco *et al.*, 2004; Traldi *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2014; Kamei *et al.*, 2017; Takagui *et al.*, 2022), como observados em um único par contendo rDNA 5S como no presente estudo, e vários sítios observados em *Hypostomus ancistroides* (Kamei *et al.*, 2017). Esses dados envolvendo sequências de rDNA 5S sugerem que a dinâmica evolutiva está relacionada com elementos transponíveis, que podem desempenhar um papel importante na dispersão dessa sequência no genoma de peixes (Pansonato-Alves *et al.*, 2013; Gouveia *et al.*, 2017).

Assim como em nossos resultados, Pansonato-Alves *et al.* (2013) detectaram a presença de sinais de sequência telomérica na região terminal de todos os cromossomos, sem presença de sítios intersticiais em nenhum cromossomo nas espécies *H. ancistroides*, *H. strigaticeps* e *H. nigromaculatus*. Sequências teloméricas intersticiais podem ocorrer, como em *Hypostomus iheringii* (Traldi *et al.*, 2013), podendo estar localizadas também ao longo dos braços dos cromossomos, sendo estas regiões provenientes de rearranjos cromossômicos, que podem ser do tipo: inversão pericêntrica, fusão cromossômica, além de estarem localizadas em regiões heterocromáticas ou inseridas em NORs, além dessas sequências poderem estar inseridas em regiões repetitivas através de elemento móveis (Libertini *et al.*, 2006; Ruiz-Herrera *et al.*, 2009;

Ocalewicz *et al.*, 2013; Scacchetti *et al.*, 2015; Bolzán *et al.*, 2017; Nirchio *et al.*, 2019).

Segundo Traldi *et al.*, (2013) a detecção da sequência telomérica em regiões terminais de todos os cromossomos, em três espécies do gênero, é um indicativo de ausência de eventos de fusão e translocação cromossômica recente no processo evolutivo do cariótipo destes espécimes. Corroborando a hipótese de Artoni e Bertollo (2001), espécies deste gênero apresentam $2n$ elevado, sendo esperada a ausência de ITS em sua composição cariotípica, havendo a possibilidade de que tenha ocorrido perda dessas sequências após rearranjos. Portanto, nota-se a grande diversidade de eventos cromossômicos ocorrendo no grupo *Hypostomus*, tornando a discussão deste gênero interessante na investigação da evolução cromossômica extensa relacionada a biodiversidade que o grupo apresenta.

5.2 Identificação molecular de espécimes de *Hypostomus* da bacia do rio Tocantins-Araguaia

A inclusão de amostras representativas de indivíduos do gênero *Hypostomus* de áreas de sua distribuição anteriormente pouco amostradas parece ser importante para compreender os padrões de diversidade e distribuição do gênero e das espécies atualmente conhecidas. O DNA *barcoding*, com foco no gene *COI*, é uma ferramenta útil e confiável para ajudar na identificação de vários grupos biológicos como aves (Hebert *et al.*, 2004; Lijtmaer *et al.*, 2012), anfíbios e répteis (Vences *et al.*, 2005; Hawlitschek *et al.*, 2015) e peixes (Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Bingpeng *et al.*, 2018; Ghouri *et al.*, 2020) e, dessa forma, torna-se uma ferramenta aplicável na identificação molecular de espécies do gênero *Hypostomus*.

Nossas estimativas filogenéticas mostram que os espécimes da Bacia hidrográfica do Escudo das Guianas (RVGF-062, GF98_007, GF10-027, GFSU12-671, GY04_398_H, SU05_578_H e SU05_492_H) e do rio Xingu (P24325-H-s), que são identificados geneticamente e morfológicamente como *H. plecostomus* (Queiroz *et al.*, 2020; Papa *et al.*, 2021) agruparam-se com os nossos espécimes coletados na Bacia do Rio Tocantins-Araguaia, das seguintes localidades: rio Maracapucú (P4204, P4205, P4206 e P4207), rio Quianduba (P4217, P4218, P4219, P4220, P4225 e P4228), ilha do Tabatinga (P4283, P4284, P4285, P4300 e P4301), rio Sirituba (P4302 e P4315) e ilha do Capim (P4306, P4307 e P4308), formando um clado monofilético com apoio $> 90\%$ (ML) e > 0.95 (IB) (Figura 11) e divergência genética dentro das populações de 0.8% (Tabela 5). Outro clado monofilético com apoio elevado $> 95\%$ (ML) e > 0.95 (IB) foi recuperado entre os espécimes da Bacia do Escudo

das Guianas (GF98-146, SU01_002_H, GF99_161_H e GF10_004_H), que são geneticamente e morfológicamente identificados como *H. watwata* (Queiroz *et al.*, 2020; Papa *et al.*, 2021) que agruparam-se com nossos espécimes coletados na Bacia do rio Tocantins-Araguaia (rio Maracapucú: P4210; rio Sirituba: P4291), com distância genética intraespecífica de 0% (Tabela 5).

Comparando com outras espécies do gênero *Hypostomus*, as espécies *H. plecostomus* e *H. watwata* apresentam variação média de distância genética de 2.3% até 5.2%, estando entre os valores padrões de distâncias genéticas que separam espécies válidas para peixes (Díaz *et al.*, 2016), considerando também um valor mínimo de distância genética média de 2%, recomendados em outros estudos (Pereira *et al.*, 2013; Geiger *et al.*, 2014; Tsoupas *et al.*, 2022).

Quanto à distribuição geográfica, *Hypostomus watwata* ocorre pelas drenagens costeiras da Guiana, desde o rio Oiapoque até o rio Demerara, sendo nativo dessa região (Weber em Reis *et al.*, 2003). Já *H. plecostomus* é nativo da Guiana, Suriname e Guiana Francesa, entre as bacias dos rios Essequibo e Oiapoque (Weber *et al.*, 2012).

No Brasil há registro de *H. plecostomus* no baixo rio Piracicaba, no sudeste do Brasil (Silvano e Begossi, 2001), sendo possivelmente considerado como espécimes introduzidos devido à sua distribuição natural (Maddern, 2022). Entretanto, outros registros confirmam a ocorrência de *H. plecostomus* no rio Xingu a leste da Amazônia Ocidental (de Queiroz *et al.*, 2020). Também existem registros de *H. watwata* para o Brasil, no rio Caeté, nordeste do Pará (Marceniuk *et al.*, 2017) e no Delta do rio Parnaíba (Guimarães-Costa *et al.*, 2019). Nossos resultados moleculares confirmam as duas espécies (*H. plecostomus* e *H. watwata*) ocorrendo na bacia do Tocantins-Araguaia, corroborando os registros prévios para o Brasil.

6 CONCLUSÃO

As análises citogenéticas de *Hypostomus plecostomus*, demonstram diversidade cariotípica intra e interespecífica no gênero *Hypostomus*, como já relatado em outros estudos que envolvem espécies deste gênero, demonstrando a diversidade cariotípica do grupo envolvendo rearranjos cromossômicos. Ademais, a maioria das populações apresentaram a mesma quantidade de sítios de rDNA 18S, entretanto observamos variação no número e localização de sítios de rDNA 18S na população do rio Sirituba e o 5S se manteve conservado em todas as populações, sugerindo que essa condição seja uma característica primitiva para *Hypostomus*. Além disso, de acordo com os nossos resultados moleculares, registramos a primeira ocorrência da espécie *Hypostomus watwata* para a região onde os espécimes foram coletados na bacia do Rio Tocantins-Araguaia.

7 BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. D; FORESTI, F; DANIEL, M. D. F. Z; TOLEDO-FILHO, S. D. A. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). **Chromosoma**, v. 109, p. 197-200, 2000.
- ALVES, A. L; DE BORBA, R. S; OLIVEIRA, C; NIRCHIO, M; GRANADO, A; FORESTI, F. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 6, n. 4, p. 443, 2012.
- ALVES, A. L; 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**, v. 128, p. 1-9, 2006.
- ANJOS, M. S; BITENCOURT, J. A; NUNES, L. A; SARMENTO-SOARES, L. M; CARVALHO, D. C; ARMBRUSTER, J. W; AFFONSO, P. R. Species delimitation based on integrative approach suggests reallocation of genus in Hypostomini catfish (Siluriformes, Loricariidae). **Hydrobiologia**, v. 847, p. 563-578, 2020.
- ANJOS, M. S; BITENCOURT, J. A; NUNES, L. A; SARMENTO-SOARES, L. M; CARVALHO, D. C; ARMBRUSTER, J. W; AFFONSO, P. R. Species delimitation based on integrative approach suggests reallocation of genus in Hypostomini catfish (Siluriformes, Loricariidae). **Hydrobiologia**, v. 847, p. 563-578, 2020.
- ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 1, p. 1-80, 2004.
- ARMBRUSTER, J. W. The genus *Peckoltia* with the description of two new species and a reanalysis of the phylogeny of the genera of the Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Zootaxa**, v. 1822, n. 1, p. 1-76, 2008.
- ARMBRUSTER, J. W. **The species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae)**. Magnolia Press, 2003.
- ARMBRUSTER, J. W; PAGE, Lawrence M. Redescription of *Pterygoplichthys punctatus* and description of a new species of *Pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 401-410, 2006.
- ARTONI, R. F; BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**, v. 49, n. 1, p. 81-90, 1996.
- ARTONI, R. F; BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, n. 3, p. 201-210, 2001.
- ARTONI, R. F; VENERE, P. C; BERTOLLO, L. A. C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**, v. 63, n. 4, p. 421-425, 1998.

- AZEVEDO FM; ZAWADZKI CH; SORIA TV; FABRIN TMC; OLIVEIRA AV; PRIOLI SMAP; PRIOLI AJ. Integrative taxonomy reveals the historically poorly defined armoured catfish *Hypostomus variipictus* (Ihering 1911), from the upper rio Paraná basin, Brazil (Siluriformes, Loricariidae). **Journal of Fish Biology**, v. 99, n. 1, p. 143–152, 12 mar. 2021.
- BARROS AV; WOLSKI MAV; NOGAROTO V; ALMEIDA MC; MOREIRA-FILHO O; VICARI MR. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role?. **Gene**, v. 608, p. 20-27, 2017.
- BAUMGAERTNER, L; PAIZ, L. M; ZAWADZKI, C. H; MARGARIDO, V. P; PORTELA CASTRO, A. L. D. B. Heterochromatin polymorphism and physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in four populations of *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1907) from the Paraná River Basin, Brazil: evolutionary and environmental correlation. **Zebrafish**, v. 11, n. 5, p. 479-487, 2014.
- BAUMGAERTNER, L; PAIZ, L. M; ZAWADZKI, C. H; MARGARIDO, V. P; PORTELA CASTRO, A. L. D. B. Heterochromatin polymorphism and physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in four populations of *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1907) from the Paraná River Basin, Brazil: evolutionary and environmental correlation. **Zebrafish**, v. 11, n. 5, p. 479-487, 2014.
- BAUMGÄRTNER, L; PAIZ, L. M; TAKAGUI, F. H; LUI, R. L; MOREIRA-FILHO, O; GIULIANO-CAETANO, L; MARGARIDO, V. P. Comparative cytogenetics analysis on five genera of thorny catfish (Siluriformes, Doradidae): Chromosome review in the family and inferences about chromosomal evolution integrated with phylogenetic proposals. **Zebrafish**, v. 15, n. 3, p. 270-278, 2018.
- BECKER, Q. M. C; CASTRO, R. J; SILVA, A. M; VIZZOTTO, P. C. Cytogenetic characterization of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) from tributaries of the Vermelho river, Upper Paraguayan river basin. **Biodiversidade**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2014.
- BENG, K. C., & CORLETT, R. T. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, p. 2089-2121, 2020.
- BERTOLLO, L. A. C. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz. J. Genet.**, v. 1, p. 103-120, 1978.
- BICKFORD, D; LOHMAN, D. J; SODHI, N. S; NG, P. K; MEIER, R; WINKER, K; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.
- BITENCOURT, J. A; AFFONSO, P. R; GIULIANO-CAETANO, L; CARNEIRO, P. L; DIAS, A. L. Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. 2012.
- BOLZÁN, A. D; Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 773, p. 51-65, 2017.

BRITSKI, H. A. Peixes do Pantanal. Manual de identificação. **Brasília: Embrapa-SPI; Corumbá: Embrapa-CPAP.**, v. 184, 1999.

BUENO, V; CÉSAR VENERE, P; THUMS KONERAT, J; HENRIQUE ZAWADZKI, C; RICARDO VICARI, M; MARGARIDO, V. P. Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary tendencies in the genus. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

BUENO, V; VENERE, P. C; ZAWADZKI, C. H; MARGARIDO, V. P. Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p. 103-112, 2013.

BUENO, V; ZAWADZKI, C. H; MARGARIDO, V. P. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 241-250, 2012.

BURGESS, W. E. An atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of the Siluriformes. **TFH Publication, Neptune City, Canada**, v. 28, p. 305-325, 1989.

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

CARDOSO, Y. P; ALMIRON, A; CASCIOTTA, J; AICHINO, D; LIZARRALDE, M. S; MONTOYA-BURGOS, J. I. Origin of species diversity in the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) inhabiting the Paraná river basin, with the description of a new species. **Zootaxa**, v. 3453, n. 1, p. 69–83-69–83, 2012.

CARDOSO, Y. P; JARDIM DE QUEIROZ, L; BAHECHAR, I. A; POSADAS, P. E; MONTOYA-BURGOS, J. I. Multilocus phylogeny and historical biogeography of *Hypostomus* shed light on the processes of fish diversification in La Plata Basin. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 5073, 2021.

CARVALHO, P. H; LIMA, F. C; ZAWADZKI, C. H. Two new species of the *Hypostomus* cochliodon group (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Negro basin in Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, p. 39-48, 2010.

CARVALHO, P. H; WEBER, C. Five new species of the *Hypostomus* cochliodon group (Siluriformes: Loricariidae) from the middle and lower Amazon System. **Revue suisse de Zoologie**, v. 111, n. 4, p. 953-978, 2004.

CAVALCANTE, M. G; SOUZA, L. F; VICARI, M. R; DE BASTOS, C. E. M; DE SOUSA, J. V; NAGAMACHI, C. Y; ... NORONHA, R. C. R. Molecular cytogenetics characterization of *Rhinoclemmys punctularia* (Testudines, Geoemydidae) and description of a Gypsy-H3 association in its genome. **Gene**, v. 738, p. 144477, 2020.

CEREALI, S. S; POMINI, E; ROSA, R; ZAWADZKI, C. H; FROEHLICH, O; GIULIANO-CAETANO, L. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes,

Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 583-591, 2008.

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

CIOFFI, M. B; MARTINS, C; BERTOLLO, L. A. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. **BMC evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2010.

COLGAN, D. J; MCLAUCHLAN, A; WILSON, G. D; LIVINGSTON, S. P; EDGECOMBE, G. D; MACARANAS, J; ... GRAY, M. R. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of Zoology**, v. 46, n. 5, p. 419-437, 1998.

COMTET, T; SANDIONIGI, A; VIARD, F; CASIRAGHI, M. DNA (meta) barcoding of biological invasions: a powerful tool to elucidate invasion processes and help managing aliens. **Biological Invasions**, v. 17, p. 905-922, 2015.

COSTA, G. W; CIOFFI, M. D. B; BERTOLLO, L. A; MOLINA, W. F. Structurally complex organization of repetitive DNAs in the genome of cobia (*Rachycentron canadum*). **Zebrafish**, v. 12, n. 3, p. 215-220, 2015.

COX, A. J; HEBERT, P. D. N. Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. **Molecular ecology**, v. 10, n. 2, p. 371-386, 2001.

CRAMER, C. A; BONATTO, S. L; REIS, R. E. Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. **Molecular phylogenetics and Evolution**, v. 59, n. 1, p. 43-52, 2011.

CRAMER, C. A; LIEDKE, A. M; BONATTO, S. L; REIS, R. E. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. **Bulletin of fish Biology**, v. 9, p. 51-59, 2007.

CREMER, T; CREMER, M. Chromosome territories. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 3, p. a003889, 2010.

CROLLIUS, H. R; WEISSENBACH, J. Fish genomics and biology. **Genome research**, v. 15, n. 12, p. 1675-1682, 2005.

DA SILVA, W. O; DA COSTA, M. J. R; PIECZARKA, J. C; RISSINO, J; PEREIRA, J. C; FERGUSON-SMITH, M. A; NAGAMACHI, C. Y. Identification of two independent X-autosome translocations in closely related mammalian (*Proechimys*) species. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

DE BRITO FERREIRA, G. E; BARBOSA, L. M; PRIZON-NAKAJIMA, A. C; DE PAIVA, S; DE ROSSI VIEIRA, M. M; GALLO, R. B; ... DE BRITO PORTELA-CASTRO, A. L. 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 Cytogenetics**, v. 13, n. 1, p. 27, 2019.

DE BRITTO, M. R. **Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi)**. 2002. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

DE MORAES, R. L. R.; SEMBER, A.; BERTOLLO, L. A. C.; DE OLIVEIRA, E. A.; RÁB, P.; HATANAKA, T; ... CIOFFI, M. D. B. Comparative cytogenetics and neo-Y formation in small-sized fish species of the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 678, 2019.

DE OLIVEIRA BRANDÃO, K; ROCHA-REIS, D. A; GARCIA, C; PAZZA, R; DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F; KAVALCO, K. F. Studies in two allopatric populations of *Hypostomus affinis* (Steindachner, 1877): the role of mapping the ribosomal genes to understand the chromosome evolution of the group. **Comparative Cytogenetics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2018.

DE OLIVEIRA, L. C; RIBEIRO, M. O; DE MEDEIROS COSTA, G; ZAWADZKI, C. H; PRIZON-NAKAJIMA, A. C; BORIN-CARVALHO, L. A; ... DE BRITO PORTELA-CASTRO, A. L. 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. **Comparative Cytogenetics**, v. 13, n. 4, p. 411, 2019.

DE PAULA, G. B; GAVAZZONI, M; ZAWADZKI, C. H; FERNANDES, C. A; PORTELA-CASTRO, A. L; LUI, R. L; MARGARIDO, V. P. Identification of cryptic species in allopatric populations of *Hypostomus tietensis* (Siluriformes: Loricariidae) through cytogenetics analyses. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, p. e210158, 2022.

DE PAULA, G. B; GAVAZZONI, M; ZAWADZKI, C. H; FERNANDES, C. A; PORTELA-CASTRO, A. L; LUI, R. L; MARGARIDO, V. P. Identification of cryptic species in allopatric populations of *Hypostomus tietensis* (Siluriformes: Loricariidae) through cytogenetics analyses. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, p. e210158, 2022.

DE PINNA, M. D. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**, 1998.

DE QUEIROZ, L. J; CARDOSO, Y; JACOT-DES-COMBES, C; BAHECHAR, I. A; LUCENA, C. A; PY-DANIEL, L. R., ... MONTOYA-BURGOS, J. I. Evolutionary units delimitation and continental multilocus phylogeny of the hyperdiverse catfish genus *Hypostomus*. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 145, p. 106711, 2020.

DELARIVA, R. L; AGOSTINHO, A. A. Relationship between morphology and diets of six neotropical loricariids. **Journal of Fish Biology**, v. 58, n. 3, p. 832-847, 2001.

DIOGO, R. Higher-level phylogeny of Siluriformes: an overview. **Catfishes**, v. 1, p. 353-384, 2003.

DITCHAROEN, S; ANTONIO CARLOS BERTOLLO, L; RÁB, P; HNÁTKOVÁ, E; FRANCO MOLINA, W; LIEHR, T; ... DE BELLO CIOFFI, M. Genomic organization of

repetitive DNA elements and extensive karyotype diversity of silurid catfishes (Teleostei: Siluriformes): A comparative cytogenetic approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3545, 2019.

ENDO, K. S; MARTINEZ, E. R. M; ZAWADZKI, C. H; DE SOUZA PAIVA, L. R; JÚNIOR, H. F. J. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 2, p. 181-189, 2012.

ESCHMEYER W & FONG JD. (eds) (2024). Catalog of fishes electronic version. California Academy of Sciences.<<http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. Versão eletrônica acessada 03/01/2024.

EVANS, N. T; LI, Y; RENSHAW, M. A; OLDS, B. P; DEINER, K; TURNER, C. R; ... PFRENDER, M. E. Fish community assessment with eDNA metabarcoding: effects of sampling design and bioinformatic filtering. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 74, n. 9, p. 1362-1374, 2017.

FERRARIS, CJ. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, n. 1, p. 1-628, 2007.

FERREIRA, E. J. G; ZUANON, J. A. S; SANTOS, G. M. D. Peixes comerciais do médio Amazonas-Região de Santarém, PA. 1998.

FERREIRA, I. A; BERTOLLO, L. A. C; MARTINS, C. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHin dIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 118, n. 1, p. 78-83, 2007.

FERREIRA, I. A; MARTINS, C. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. **Micron**, v. 39, n. 4, p. 411-418, 2008.

FERREIRA, M; GARCIA, C; MATOSO, D. A; DE JESUS, I. S; FELDBERG, E. A new multiple sex chromosome system X1X1X2X2/X1Y1X2Y2 in Siluriformes: cytogenetic characterization of *Bunocephalus coracoideus* (Aspredinidae). **Genetica**, v. 144, n. 5, p. 591, 2016.

FERREIRA, M; KAVALCO, K. F; DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F; GARCIA, C. Cryptic diversity between two *Imparfinis* species (Siluriformes, Heptapteridae) by cytogenetic analysis and DNA barcoding. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 306-317, 2014.

FISCH-MULLER, S; MOL, J. H. A; COVAIN, R. An integrative framework to reevaluate the Neotropical catfish genus *Guyanancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) with particular emphasis on the *Guyanancistrus brevispinis* complex. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0189789, 2018.

FRANTINE-SILVA, W; SOFIA, S. H; ORSI, M. L; ALMEIDA, F. S. DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. **Molecular**

Ecology Resources, v. 15, n. 5, p. 1226-1237, 2015.

FRICKE, R; ESCHMEYER, W. N; VAN DER LAAN, R. Catalog of fishes: genera, species, references. **California Academy of Sciences, San Francisco, CA, USA**
<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>, 2018.

FROESE, R. World wide web electronic publication. <http://www.fishbase.org>, 2009.

GALETTI JR, P. M; MARTINS, C. Contribuição da hibridização in situ para o conhecimento dos cromossomos de peixes. **FISH: conceitos e aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**, p. 61-88, 2004.

GARCIA, C; OLIVEIRA, C; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. **Genetics and Molecular Research**, p. 365-384, 2010.

GARCÍA-DÁVILA, C; CASTRO-RUIZ, D; RENNO, J. F; CHOTA-MACUYAMA, W; CARVAJAL-VALLEJOS, F. M; SANCHEZ, H; ... DUPONCHELLE, F. Using barcoding of larvae for investigating the breeding seasons of Pimelodid catfishes from the Marañon, Napo and Ucayali rivers in the Peruvian Amazon. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, p. 40-51, 2015.

GEERINCKX, T; HERREL, A; ADRIAENS, D. Suckermouth armored catfish resolve the paradox of simultaneous respiration and suction attachment: a kinematic study of *Pterygoplichthys disjunctivus*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 315, n. 3, p. 121-131, 2011.

GIULIANO-CAETANO, L. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae). **Ph. D Thesis, Universidade Federal de Sao Carlos**, 1998.

GLUGOSKI, L; DEON, G; SCHOTT, S; VICARI, M. R; NOGAROTO, V; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetic analyses in *Ancistrus* species (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 18, 2020.

GOMES, I. D; ARAÚJO, F. G; DO NASCIMENTO, A. A; SALES, A. Equilibrium reproductive strategy of the armored catfish *Hypostomus auroguttatus* (Siluriformes, Loricariidae) in a tropical river in Southeastern Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, p. 249-260, 2015.

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

GROSS, M. C; SCHNEIDER, C. H; VALENTE, G. T; MARTINS, C; FELDBERG, E. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1117-1127, 2010.

GUERRA, M. Citogenética molecular: Protocolos comentados. **Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto**, 2012.

HARDMAN, M. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 37, n. 3, p. 700-720, 2005.

HAVECKER, E. R; GAO, X; VOYTAS, D. F. The diversity of LTR retrotransposons. **Genome biology**, v. 5, n. 6, p. 1-6, 2004.

HAWKINS, T. L; O'CONNOR-MORIN, T; ROY, A; SANTILLAN, C. DNA purification and isolation using a solid-phase. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 21, p. 4543, 1994.

HEBERT, P. D; BRAUKMANN, T. W; PROSSER, S. W; RATNASINGHAM, S; DEWAARD, J. R; IVANOVA, N. V; ... ZAKHAROV, E. V. A Sequel to Sanger: amplicon sequencing that scales. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2018.

HEBERT, P. D; CYWINSKA, A; BALL, S. L; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HOWELL, WM; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **experientia**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.

HUELSENBECK, J. P; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.

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

ISBRÜCKER, I. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Verslagen en technische Gegevens**, v. 22, n. 1, p. 1-181, 1980.

KALYAANAMOORTHY, S; MINH, B. Q; WONG, T. K; VON HAESELER, A; JERMIIN, L. S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature methods**, v. 14, n. 6, p. 587-589, 2017.

KAPPAS, I; VITTAS, S; PANTZARTZI, C. N; DROSOPOULOU, E; SCOURAS, Z. G. A time-calibrated mitogenome phylogeny of catfish (Teleostei: Siluriformes). **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0166988, 2016.

KATO, K. ; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KAVALCO, K. F; PAZZA, R; BERTOLLO, L. A. C; MOREIRA-FILHO, O. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin,

Brazil. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, n. 1, p. 107-110, 2004.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, p. 49-63, 2002.

KIDWELL, M. G; LISCH, D. R. Transposable elements and host genome evolution. **Trends in ecology & evolution**, v. 15, n. 3, p. 95-99, 2000.

KING, M. **Species evolution: the role of chromosome change**. Cambridge University Press, 1995.

KOSMANN, C. Código de Barras (DNA Barcode) de dípteros de interesse forense. **pp. ix-60, June**, 2009.

LARA KAMEI, M. C. D. S; BAUMGÄRTNER, L., PAIVA, S; ZAWADZKI, C. H; MARTINS-SANTOS, I. C; PORTELA-CASTRO, A. L. D. B. Chromosomal diversity of three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from the Paraná River Basin, Brazil: A species complex in *Hypostomus ancistroides* reinforced by a ZZ/ZW sex chromosome system. **Zebrafish**, v. 14, n. 4, p. 357-363, 2017.

LEVAN, A; NICHOLS, W. W. Human chromosome lengths for use in distribution studies. **Hereditas**, v. 51, n. 2-3, p. 378-380, 1964.

LIBERTINI, A; VITTURI, R; LANNINO, A; MAONE, M. C; FRANZOI, P; RICCATO, F; COLOMBA, S. FISH mapping of 18S rDNA and (TTAGGG) n sequences in two pipefish species (Gasteroisteiformes: Syngnathidae). **Journal of Genetics**, v. 85, p. 153-156, 2006.

LONDOÑO-BURBANO, A; URBANO-BONILLA, A; THOMAS, M. R; BRITTO, M. R. A new species of *Loricaria* (Loricariidae: Loricariinae) from the upper Amazon River basin, Colombia. **Neotropical Ichthyology**, v. 21, p. e230008, 2023.

LONG, E. O; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual review of biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 727-764, 1980.

LORSCHIEDER, C. A; ZAWADZKI, C. H; VICARI, M. R; MARTINS-SANTOS, I. C; ARTONI, R. F. Karyotypic diversity of the armoured catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) in the context of its occurrence and distribution. **Journal of Fish Biology**, v. 87, n. 4, p. 1099-1110, 2015.

LOWE-MCCONNELL, R. H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. In: **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. 1999. p. 534-534.

LUÍS ALVES, A; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, v. 124, p. 127-136, 2005.

LUJAN, N. K; ARMBRUSTER, J. W; LOVEJOY, N. R; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 82, p. 269-288, 2015.

- LUJAN, N. K; CRAMER, C. A; COVAIN, R; FISCH-MULLER, S; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. Multilocus molecular phylogeny of the ornamental wood-eating catfishes (Siluriformes, Loricariidae, Panaqolus and Panaque) reveals undescribed diversity and parapatric clades. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 109, p. 321-336, 2017.
- LUSTOSA-COSTA, S. Y; RAMOS, T. P. A; ZAWADZKI, C. H; LIMA, S. M. Q. Review of the armoured catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Parnaíba River basin, Northeastern Brazil, with description of a new species. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, p. e210126, 2022.
- MARIA, J. F; ANA, F. F; AINA, G. R; ALBA, A; ANA, R. C; ANA, M. P; ... SALOMÉ, F. A. Advances in the use of molecular tools in ecological and biodiversity assessment of aquatic ecosystems. 2020.
- MARIOTTO, S; CENTOFANTE, L; MIYAZAWA, C. S; BERTOLLO, L. A. C; MOREIRA FILHO, O. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**, v. 7, p. 595-600, 2009.
- MARTINEZ, E. R. M; ZAWADZKI, C. H; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 562-568, 2011.
- MARTINS, C; CABRAL-DE-MELLO, D. C; VALENTE, G. T; MAZZUCHELLI, J; DE OLIVEIRA, S. G; PINHAL, D. Animal genomes under the focus of cytogenetics. **Animal Genomes Under the Focus of Cytogenetics**, p. 1-160, 2011.
- MARTINS, C; GALETTI, P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, p. 363-367, 1999.
- MARTINS, C; OLIVEIRA, C; WASKO, A. P; WRIGHT, J. M. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes—a review. **Aquaculture**, v. 231, n. 1-4, p. 37-49, 2004.
- MARTINS, F; CALEGARI, B. B; LANGEANI, F. *Microlepidogaster arachas*, a new species of hypoptopomatine catfish (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Brazil. **Zootaxa**, v. 3608, n. 5, p. 379–388-379–388, 2013.
- MAURUTTO, F. A. M; MANVAILER, L. F. S; SCZEPANSKI, T. S; CESTARI, M. M; ARTONI, R. F. Cytogenetic characterization of three allopatric species of *Hypostomus Lacépède* (1803) (Teleostei, Loricariidae). **Caryologia**, v. 65, n. 4, p. 340-346, 2012.
- MAZZONI, R; ULISSES, CARAMASCHI; WEBER, C. Taxonomical revision of the species of *Hypostomus Lacépède*, 1803. **Revue suisse de Zoologie**, v. 101, n. 1, p. 3-18, 1994.
- MAZZUCHELLI, J; KOCHER, T. D; YANG, F; MARTINS, C. Integrating cytogenetics and genomics in comparative evolutionary studies of cichlid fish. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2012.
- MENDES-NETO, E. O; VICARI, M. R; ARTONI, R. F; MOREIRA-FILHO, O. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, oricariidae) from the Piumhi

river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comparative cytogenetics**, v. 5, n. 2, p. 133, 2011.

MEZZOMO, P; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A; SAUSEN, T. L; REPPOLD MARINHO, J; CANSIAN, R. L. Molecular inferences about the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae): a review. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 8, p. 6179-6192, 2020.

MICHELE, J. L; TAKAHASHI, C. S; FERRARI, I. Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). **Cytologia**, v. 42, n. 3-4, p. 539-546, 1977.

MILHOMEM, S; CASTRO, R; NAGAMACHI, C; DE SOUZA, A; FELDBERG, E; PIECZARKA, J. Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lcépède, 1803,(Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). **Comparative cytogenetics**, v. 4, n. 1, p. 45-54, 2010.

MILLER, W. J; MCDONALD, J. F; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. **Evolution and impact of transposable elements**, p. 261-270, 1997.

MIYA, M; SATO, Y; FUKUNAGA, T; SADO, T; POULSEN, J. Y; SATO, K; ... IWASAKI, W. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. **Royal Society open science**, v. 2, n. 7, p. 150088, 2015.

MONAGHAN, P. Telomeres and life histories: the long and the short of it. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1206, n. 1, p. 130-142, 2010.

MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 7, p. 1855-1867, 2003.

MONTOYA-BURGOS, J. I; MULLER, S; WEBER, C; & PAWLOWSKI, J. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**, v. 27, p. 363-374, 1998.

MURAMOTO, J. I; OHNO, S., & ATKIN, N. B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**, v. 24, n. 1, p. 59-66, 1968.

NAKATANI, K. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. **(No Title)**, 2001.

NELSON, J. S; GRANDE, T. C; WILSON, M. VH. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016.

NGUYEN, L. T; SCHMIDT, H. A; VON HAESLER, A; MINH, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 1, p. 268-274, 2015.

NIRCHIO, M; GAVIRIA, J. I; SICCHA-RAMIREZ, Z. R; OLIVEIRA, C; FORESTI, F; MILANA, V; ROSSI, A. R. Chromosomal polymorphism and molecular variability in the

pearly razorfish *Xyrichtys novacula* (Labriformes, Labridae): Taxonomic and biogeographic implications. **Genetica**, v. 147, p. 47-56, 2019.

NISHIYAMA, P. B; ROSSI, M. M; PORTO, F. E; BORIN, L. A; CASTRO, A. L. D. B. P; DOS SANTOS, I. C. M. Estudos citogenéticos em espécies de peixes de riachos: *Hyphessobrycon vinaceus*, *Bryconamericus aff. iheringii* e *Odontostilbe pequirá* (PISCES: CHARACIDAE). **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 6, n. 1, p. 13-22, 2015.

OCALEWICZ, K; FURGALA-SELEZNIOW, G; SZMYT, M; LISBOA, R; KUCINSKI, M; LEJK, A. M; JANKUN, M. Pericentromeric location of the telomeric DNA sequences on the European grayling chromosomes. **Genetica**, v. 141, p. 409-416, 2013.

OLDS, B. P; JERDE, C. L; RENSHAW, M. A; LI, Y; EVANS, N. T; TURNER, C. R; ... LAMBERTI, G. A. Estimating species richness using environmental DNA. **Ecology and evolution**, v. 6, n. 12, p. 4214-4226, 2016.

Oliveira, L. C; Ribeiro, M. O; Dutra, E. S; Zawadzki, C. H; Portela-Castro, A. L. B; Martins-Santos, I. C. 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, n. 2, p. 6625-6634, 2015.

OSPINA-ALVAREZ, N; & PIFERRER, F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. **PloS one**, v. 3, n. 7, p. e2837, 2008.

PANSONATO-ALVES, J. C; SERRANO, É. A; UTSUNOMIA, R; SCACCHETTI, P. C; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p. 477-489, 2013.

PAPA, Y; LE BAIL, P. Y; COVAIN, R. Genetic landscape clustering of a large DNA barcoding data set reveals shared patterns of genetic divergence among freshwater fishes of the Maroni Basin. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n. 6, p. 2109-2124, 2021.

PAXTON JR; & ESCHMEYER WN. Encyclopedia of fishes. San Diego: **Academic Press**. 240p. 1995.

PEREIRA, A. H; FACCHIN, S; OLIVEIRA DO CARMO, A; NÚÑEZ RODRIGUEZ, D; CARDOSO RESENDE, L; KALAPOTHAKIS, Y; ... KALAPOTHAKIS, E. Complete mitochondrial genome sequence of *Hypostomus francisci* (Siluriformes: Loricariidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 1, p. 155-157, 2019.

PEREIRA, L. H; HANNER, R; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. **BMC genetics**, v. 14, p. 1-14, 2013.

PETY, A. M; CARDOSO, A. L; NAGAMACHI, C. Y; PIECZARKA, J. C; DE SOUSA, L. M; NORONHA, R. C. R. In situ localization of ribosomal sites in *Peckoltia* and *Ancistomus* (Loricariidae: Hypostominae) from the Amazon Basin. **Zebrafish**, v. 15, n. 3, p. 263-269,

2018.

PINTO-MAGLIO, C.A.F. Mapeamento cromossômico em espécies de café através da técnica de hibridação in situ fluorescente (FISH). **O agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 66-67, 2007.

PURTY, R. S; CHATTERJEE, S. DNA barcoding: an effective technique in molecular taxonomy. **Austin J Biotechnol Bioeng**, v. 3, n. 1, p. 1059, 2016.

QUEIROZ, L. J; CARDOSO, Y; JACOT-DES-COMBES, C; BAHECHAR, I. A; LUCENA, C. A; PY-DANIEL, L. R; ... MONTOYA-BURGOS, J. I. Evolutionary units delimitation and continental multilocus phylogeny of the hyperdiverse catfish genus *Hypostomus*. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 145, p. 106711, 2020.

RAMBAUT, A. FigTree, version 1.4.4: Tree figure drawing tool Computer program and documentation distributed by the author <http://treebioedacuk/software/figtree/>, 2012.

RAMBAUT, A; DRUMMOND, A. J; XIE, D; BAELE, G; SUCHARD, M. A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic biology**, v. 67, n. 5, p. 901-904, 2018.

RASKINA, O; BELYAYEV, A; NEVO, E. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. **Chromosome Research**, v. 12, p. 153-161, 2004.

RATNASINGHAM, S; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular ecology notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

RIESEBERG, L. H. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in ecology & evolution**, v. 16, n. 7, p. 351-358, 2001.

ROCHA-REIS, D. A; PASA, R; KAVALCO, K. F. High congruence of karyotypic and molecular data on *Hypostomus* species from Brazilian southeast. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 21, n. 1, p. 135-143, 2021.

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

ROXO, F. F; ALBERT, J. S; SILVA, G. S; ZAWADZKI, C. H; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. Molecular phylogeny and biogeographic history of the armored Neotropical catfish subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyriinae (Siluriformes: Loricariidae). **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105564, 2014.

ROXO, F. F; OCHOA, L. E; SABAJ, M. H; LUJAN, N. K; COVAIN, R; SILVA, G. S; ... OLIVEIRA, C. Phylogenomic reappraisal of the Neotropical catfish family Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) using ultraconserved elements. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 135, p. 148-165, 2019.

- ROXO, F. F; ZAWADZKI, C. H; COSTA SILVA, G. D; CHIACHIO, M. C; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. Molecular systematics of the armored neotropical catfish subfamily Neoplecostominae (Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**, v. 3390, n. 1, p. 33–42–33–42, 2012.
- RUBERT, M; DA ROSA, R; JEREP, F. C; BERTOLLO, L. A. C; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 5, p. 397, 2011.
- RUBERT, M; DA ROSA, R; ZAWADZKI, C. H; MARIOTTO, S; MOREIRA-FILHO, O; GIULIANO-CAETANO, L. Chromosome mapping of 18S ribosomal RNA genes in eleven *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae): diversity analysis of the sites. **Zebrafish**, v. 13, n. 4, p. 360-368, 2016.
- RUBERT, M; TAKAGUI, F. H; DOS SANTOS, K. F; POMPEO, L. R. S; DA ROSA, R; ZAWADZKI, C. H; ... GIULIANO-CAETANO, L. Topotype-Based Chromosomal Diversity among Five Species of Freshwater Armored Catfishes in the *Hypostomus auroguttatus* Supergroup (Actinopterygii: Siluriformes). **Zoological science**, v. 39, n. 5, 2022.
- RUBERT, M; ZAWADZKI, C. H.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 6, p. 93-100, 2008.
- RUIZ-HERRERA, A; NERGADZE, S. G; SANTAGOSTINO, M; GIULOTTO, E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. **Cytogenetic and genome research**, v. 122, n. 3-4, p. 219-228, 2009.
- SAMBROOK, J & RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning**, 3rd edn., vol. 2. 2001.
- SANTOS DA SILVA, K; GLUGOSKI, L; VICARI, M. R; DE SOUZA, A. C. P; AKAMA, A; PIECZARKA, J. C; NAGAMACHI, C. Y. Mechanisms of Karyotypic Diversification in *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae): Inferences from Repetitive Sequence Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14159, 2023.
- SCACCHETTI, P. C; UTSUNOMIA, R; PANSONATO-ALVES, J. C; VICARI, M. R; ARTONI, R. F; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei, Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 2, p. 136-143, 2015.
- SCHAEFER, S. A. **Osteology of *Hypostomus Plecostomus* (linnaeus): With a Phylogenetic Analysis of the Loricariid Subfamilies (Pisces, Siluroidei)**. Natural History Museum of Los Angeles County, 1987.
- SCHEMBERGER, M. O; NASCIMENTO, V. D; COAN, R., RAMOS, É; NOGAROTO, V; ZIEMNICZAK, K., ... VICARI, M. R. DNA transposon invasion and microsatellite accumulation guide W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. **Chromosoma**, v. 128, p. 547-560, 2019.
- SCHMIDT, T; HESLOP-HARRISON, J. S. Genomes, genes and junk: the large-scale

organization of plant chromosomes. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 5, p. 195-199, 1998.

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

SUAREZ, P; PINTO BARROSO, I. C. G; SILVA, D. D. S., MILHOMEM, S. S; CABRAL-DE-MELLO, D. C; MARTINS, C; ... NAGAMACHI, C. Y. Highest diploid number among Gymnotiformes: first cytogenetic insights into Rhabdolichops (Sternopygidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 3, p. 272-279, 2017.

SULLIVAN, J. P; LUNDBERG, J. G; HARDMAN, M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 41, n. 3, p. 636-662, 2006.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental cell research**, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.

SYMONOVÁ, R; MAJTÁNOVÁ, Z; SEMBER, A; STAAKS, G. B; BOHLEN, J; FREYHOF, J; RÁB, P. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, p. 1-11, 2013.

TABERLET, P; COISSAC, E; POMPANON, F; BROCHMANN, C; WILLERSLEV, E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. **Molecular ecology**, v. 21, n. 8, p. 2045-2050, 2012.

TAKAGUI, F. H; RUBERT, M; DIONISIO, J. F; BAUMGÄRTNER, L; CARDOSO, Y. P; JEREP, F. C; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic Markers Reinforce the Redescription of the Armored Pleco *Hypostomus spiniger* (Loricariidae-Hypostominae), an Endemic Species in the Uruguay River Basin and Patos Lagoon System. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 66, p. e23220154, 2023.

TAKAGUI, F. H; VIANA, P; BAUMGÄRTNER, L; BITENCOURT, J. A; MARGARIDO, V. P; LUI, R. L; ... GIULIANO-CAETANO, L. Reconstruction of the Doradinae (Siluriformes-Doradidae) ancestral diploid number and NOR pattern reveals new insights about the karyotypic diversification of the Neotropical thorny catfishes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, p. e20200068, 2021.

TAMURA, K; STECHER, G; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

THIMOTHEO, M. G. R; BENINE, R. C; OLIVEIRA, C; SILVA, G. D. S. D. C. New species of the *Corumbataia cuestae* group (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Tocantins basin, with comments on its phylogenetic relationships. **Neotropical Ichthyology**, v. 18, 2020.

TRALDI, J. B; VICARI, M. R; BLANCO, D. R; DE FÁTIMA MARTINEZ, J; ARTONI, R. F; MOREIRA-FILHO, O. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908):

a case of heterochromatic polymorphism. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, n. 2, p. 115, 2012.

VAN DER SLEEN, P; ALBERT, J. S. (Ed.). **Field guide to the fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas**. Princeton University Press, 2017.

VENCES, M; THOMAS, M; BONETT, R. M; VIEITES, D. R. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1859-1868, 2005.

VICARI, M. R; FERREIRA ARTONI, R; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, L. A. C. Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. **Caryologia**, v. 59, n. 3, p. 260-266, 2006.

VICARI, M. R; NOGAROTO, V; NOLETO, R. B; CESTARI, M. M; CIOFFI, M. B; ALMEIDA, M. C; ... ARTONI, R. F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1094-1116, 2010.

VILLARES-JUNIOR, G. A; CARDONE, I. B; GOITEIN, R. Comparative feeding ecology of four syntopic *Hypostomus* species in a Brazilian southeastern river. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 692-699, 2016.

VOLFF, J. N; KÖRTING, C; MEYER, A; SCHARTL, M. Evolution and discontinuous distribution of Rex3 retrotransposons in fish. **Molecular biology and evolution**, v. 18, n. 3, p. 427-431, 2001.

VOLFF, J. N; KÖRTING, C; SCHARTL, M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 11, p. 1673-1684, 2000.

VOLFF, J. N; KÖRTING, C; SWEENEY, K; SCHARTL, M. The non-LTR retrotransposon Rex3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 11, p. 1427-1438, 1999.

WARD, R. D; ZEMLAK, T. S; INNES, B. H; LAST, P. R; HEBERT, P. D. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

WARES, J. P; CUNNINGHAM, C. W. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. **Evolution**, v. 55, n. 12, p. 2455-2469, 2001.

XIA, X; XIE, Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of heredity**, v. 92, n. 4, p. 371-373, 2001.

ZAWADZKI, C. H; CARVALHO, P. H; BIRINDELLI, J. L; AZEVEDO, F. M. *Hypostomus nigrolineatus*, a new dark-striped species from the rio Jequitinhonha and rio Pardo basins, Brazil (Siluriformes, Loricariidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 27, n. 3, p. 263-274, 2016.

ZAWADZKI, C. H; OLIVEIRA, R. R; DEBONA, T. A new species of *Hypostomus Lacépède, 1803* (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Tocantins-Araguaia basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, p. 73-80, 2013.

ZAWADZKI, C; WEBER, C; PAVANELLI, C. S. Two new species of *Hypostomus Lacépède* (Teleostei: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Central Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, p. 403-412, 2008.