



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KÁTIA FABIANA DOS SANTOS

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE QUATRO ESPÉCIES DE
PEIXES DA FAMÍLIA LORICARIIDAE, COLETADAS EM
DIFERENTES LOCALIDADES DA BACIA DO
PARANAPANEMA**

Londrina
2022



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



IDR-Paraná

Instituto de Desenvolvimento
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



KÁTIA FABIANA DOS SANTOS

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE QUATRO ESPÉCIES DE
PEIXES DA FAMÍLIA LORICARIIDAE, COLETADAS EM
DIFERENTES LOCALIDADES DA BACIA DO
PARANAPANEMA**

Londrina
2022

KÁTIA FABIANA DOS SANTOS

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE QUATRO ESPÉCIES DE
PEIXES DA FAMÍLIA LORICARIIDAE, COLETADAS EM
DIFERENTES LOCALIDADES DA BACIA DO
PARANAPANEMA**

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

Orientador: Profa. Dra. Lucia Giuliano-Caetano

Londrina
2022

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

Fabiana dos Santos, Kátia.

Estudo citogenético de quatro espécies de peixes da família Loricariidae, coletadas em diferentes localidades da Bacia do Paranapanema / Kátia Fabiana dos Santos. - Londrina, 2022.
89 f. : il.

Orientador: Lucia Giuliano-Caetano.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Evolução cariotípica. - Tese. 2. Peixes neotropicais. - Tese. 3. Hypostomus - Tese. 4. Loricariichthys - Tese. I. Giuliano-Caetano, Lucia . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 574

KÁTIA FABIANA DOS SANTOS

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE QUATRO ESPÉCIES DE
PEIXES DA FAMÍLIA LORICARIIDAE, COLETADAS EM
DIFERENTES LOCALIDADES DA BACIA DO
PARANAPANEMA**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Ana Lúcia Dias
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alberto Sergio Fenocchio
Universidade Nacional de Misiones – UnaM
(Argentina)

Londrina, 17 de março de 2022.

AGRADECIMENTOS

À DEUS! Seria ingratidão da minha parte começar os agradecimentos sem dar primeiramente lugar àquele que, em meio a todas as circunstâncias da vida, alimenta a minha alma com fé e esperança de que mesmo que eu ande por vales sombrios, eu não devo temer de modo algum, pois com o seu cajado, me consolará até a sua volta.

À minha mãe Lodicéia e minha irmã Carla, por me ajudarem diariamente a lutar e ser forte. Obrigada por todo investimento, todo esforço e dedicação para que esta etapa fosse vencida.

Aos meus filhos, Maria Eduarda, Ana Júlia e Carlos Eduardo. Eu digo filhos, quando na verdade são sobrinhos, pois mesmo que ainda pequenos, não sabem o real valor que tens na minha vida. Nestes últimos tempos, a tata tem ficado ausente (fisicamente) de suas vidas, mas só Deus sabe em todas as madrugadas de orações, o quanto desejo que tudo isso acabe logo para estar ao lado de vocês.

À minha avó Dalci (*in memoriam*). Obrigada por ser a estrela mais brilhante do céu. Obrigada por ser minha luz e meu guia. Logo logo estaremos juntas novamente. Até breve!

À minha querida orientadora Dra. Lucia Giuliano-Caetano. Obrigada por me estender a mão no momento que precisei. Hoje consigo entender os planos que Deus estava preparando para mim no momento em que a conhecesse. À Ele agradeço todos os dias pela sua vida, pela sua amizade e principalmente pelo seu colo de mãe. Obrigada do fundo do meu coração por ter aberto as portas para mim em um mundo que até então eu desconhecia. Pode ter certeza, onde eu estiver no futuro, levarei seu nome e seu legado no coração.

Agradeço as queridas professoras do Laboratório de Citogenética Animal (LACA), em especial a Renata da Rosa, pela amizade, paciência e todos os ensinamentos.

Não poderia de modo algum deixar de agradecer aqueles na qual compartilhei os dias no laboratório. Muitos dias não foram fáceis, mas a presença de vocês deixou eles mais leves. Obrigada Luisinho (do caderno do postinho); a Jaque (a menina de duas mochilas); a Ana Beatriz (do copinho

nadir e boquinha de burro) e a Mari (a menina que no que falta em um, tem o dobro em outro kkkk). São essas pessoas que desde o primeiro dia que cheguei no laboratório me receberam muito bem e com muita paciência me ajudaram e me ensinaram de tudo um pouco do que sabem. Obrigada gatas por toda amizade construída e tenham certeza que foram fundamentais para minha permanência na pós-graduação.

Ao Fábio Hiroshi Takagui pela amizade e por toda contribuição e ajuda prestada durante a realização deste trabalho.

Ao Robson por toda ajuda nas coletas e a funcionária Suzi pela amizade.

Aos membros da banca examinadora Ana Lúcia Dias e Alberto Sergio Fenocchio, por terem aceito o convite e por contribuírem com o trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida durante os 24 meses de vigência.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular pela estrutura e apoio para a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa, que apesar do pouco contato que tivemos devido a pandemia, são excelentes profissionais e são os grandes responsáveis pela formação dos discentes.

À todos que contribuíram direta e indiretamente, meu muito obrigada!

Os que confiam no Senhor, são como os montes de Sião, que não se abalam, mas permanecem firmes para sempre!

DOS SANTOS, Kátia Fabiana. **Estudo citogenético de quatro espécies de peixes da família Loricariidae, coletadas em diferentes localidades da bacia do Paranapanema.** 2022. 89 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

RESUMO

Siluriformes compreendem a ordem de peixes de água doce mais abundantes na região neotropical. Dentre os Siluriformes, Loricariidae é a família que mais se destaca em número de espécies e subdividida em seis subfamílias, nas quais duas merecem maior destaque: Hypostominae e Loricariinae. A primeira compreende os peixes conhecidos como cascudos, sendo endêmicos da América do Sul. Os dados da literatura mostram que esta subfamília é uma das mais complexas dentro dos Loricariidae, onde o gênero mais estudado é o *Hypostomus* que apresenta uma variação no número diploide de $2n=52$ para *H. emarginatus* a $2n=84$ para *Hypostomus perdido*, além de também apresentar uma grande variação quanto a fórmula cariotípica, padrão de heterocromatina e na quantidade e posição das NORs. As populações mais estudadas deste gênero pertencem às bacias do rio Paraná, rio Paraguai e rio São Francisco. A outra subfamília de destaque é Loricariinae, cujo representantes são conhecidos como cascudos-chinelos, de tamanho pequeno a médio e ocorrem com frequência na região da Costa Rica, Panamá e em toda a América do Sul. Ela também apresenta uma grande variabilidade citogenética quanto ao número diploide ($2n=36$ a $2n=74$), fórmula cariotípica e cístrons ribossômicos. As populações mais estudadas desta subfamília foram coletadas principalmente na bacia do rio Paraná e rio Paraguai. No presente estudo foram analisadas citogeneticamente 4 espécies de peixes de Loricariidae, todas provenientes de diferentes localidades da Bacia do Alto Rio Paraná, por meio da coloração por Giemsa e fluorocromos CMA/DAPI, impregnação por nitrato de prata, bandeamento C e Hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNA ribossomal 18S e 5S. Os resultados encontram-se divididos em dois capítulos. No capítulo 1 foram analisadas três espécies de peixes da subfamília Hypostominae, sendo: *Hypostomus ancistroides*, *H. hermanni* e *H. strigaticeps*. Duas populações de *H. ancistroides*, uma do Ribeirão Cambé e outra do Ribeirão Três Bocas exibiram o mesmo número diploide de $2n=68$ e fórmula cariotípica de $14m+16sm+8st+30a$. Já *H. hermanni* proveniente do Ribeirão Três Bocas e *H. strigaticeps* do Rio Laranjinha apresentaram $2n=72$ com estrutura cariotípica distinta, sendo $10m+20sm+18st+24a$ e $10m+14sm+20st+28a$, respectivamente. A coloração com fluorocromos revelou a presença de sinais positivos em GC para todas as espécies, e regiões ricas em AT apenas para *H. strigaticeps*. Nas três espécies analisadas, as Ag-RONs foram coincidentes com os locais de DNAr 18S. Nas duas populações de *H. ancistroides*, a FISH com DNAr 18S evidenciou três marcações, enquanto que o DNAr 5S foi detectado no par 4 metacêntrico de ambas, podendo este ser considerado um par marcador para a espécie. O DNAr 18S em *H. hermanni* hibridou em apenas um homólogo de um cromossomo acrocêntrico, já em *H. strigaticeps* esta sonda apresentou múltiplos sinais. O DNAr 5S para estas duas espécies esteve localizado em vários pares de cromossomos, condição esta comum quando comparado com outras populações destas mesmas espécies. A heterocromatina esteve presente em diversos pares de

cromossomos, todavia, em *H. ancistroides* pode ser observado um heteromorfismo de tamanho no par 16 de ambas as populações. No capítulo 2 foi analisada uma espécie de peixe pertencente a subfamília Loricariinae, *Loricariichthys platymetopon*, que apresentou similaridade de número diploide com as demais populações já cariotipadas de $2n=54$, com diferenças apenas na estrutura cariotípica de $8m+18sm+4st+24a$. A banda C revelou heterocromatina na região pericentromérica de apenas um par de cromossomo, enquanto que a impregnação com nitato de prata mostrou um sinal de NOR ativa coincidente com a constrição secundária do par 14, observada pela Giemsa. A coloração com fluorocromos base-específicos exibiram sinais de DAPI positivo na região pericentromérica e terminal de quase todos os cromossomos e sinal de CMA positivo em apenas um par. O par marcador da NOR foi confirmado pela FISH com a sonda DNAr 18S; e a sonda de DNAr 5S marcou em dois pares de cromossomos, com sintonia entre as sondas no par subtelocêntrico 14. Em todas as populações de *L. platymetopon* já estudadas, o par 14 subtelocêntrico também apresentou marcações em todas as técnicas, indicando que este seja um par marcador espécie-específico. O presente trabalho reforça que os marcadores citotaxonômicos são eficientes para os estudos e caracterização de populações e corrobora com os dados da literatura de que os rearranjos cromossômicos, particularmente as inversões pericêntricas, estão atuando na diversificação cariotípica de Loricariidae.

Palavras-chave: evolução cariotípica; peixes neotropicais; *hypostomus*. *loricariichthys*; rearranjos cromossômicos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Bacias Hidrográficas da América do Sul	19
Figura 2	– Mapa evidenciando os pontos de coleta dos exemplares analisados no estudo	36
 Capítulo 1		
Figura 1	– Cariótipos de <i>Hypostomus ancistroides</i> do Ribeirão Cambé. Coloração com (a) Giemsa e (b) Banda C	58
Figura 2	– Cariótipos de <i>Hypostomus ancistroides</i> do Ribeirão Cambé coradas com DAPI (azul) e CMA3 (amarelo)	59
Figura 3	– Cariótipo de <i>Hypostomus ancistroides</i> do Ribeirão Cambé após a double FISH com DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). No box, os cromossomos com NORs após Impregnação com Nitrato de Prata.....	59
Figura 4	– Cariótipos de <i>Hypostomus ancistroides</i> do Ribeirão Três Bocas. Coloração com (c) Giemsa e (d) Banda C	60
Figura 5	– Cariótipos de <i>Hypostomus ancistroides</i> do Ribeirão Três Bocas coradas com DAPI (azul) e CMA3 (amarelo)	60
Figura 6	– Cariótipo de <i>Hypostomus ancistroides</i> do Ribeirão Três Bocas após a double FISH com DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). No box, os cromossomos com NORs após Impregnação com Nitrato de Prata	60
Figura 7	– Cariótipos de <i>Hypostomus hermanni</i> . Coloração com (e) Giemsa e (f) Banda C.....	61
Figura 8	– Cariótipos de <i>Hypostomus hermanni</i> coradas com DAPI (azul) e CMA3 (amarelo).....	61
Figura 9	– Cariótipo de <i>Hypostomus hermanni</i> após a double FISH com DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). No box, os cromossomos com NORs após Impregnação com Nitrato de Prata.....	62
Figura 10	– Cariótipos de <i>Hypostomus strigaticeps</i> . Coloração com (g) Giemsa e (h) Banda C.....	63

Figura 11 – Cariótipos de *Hypostomus strigaticeps* coradas com DAPI (azul) e CMA3 (amarelo).....63

Figura 12 – Cariótipo de *Hypostomus strigaticeps* após a double FISH com DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). No box, os cromossomos com NORs após Impregnação com Nitrato de Prata.....63

Capítulo 2

Figura 1 – Cariótipos de *Loricariichthys platymetopon*. Coloração com (a) Giemsa e (b) Banda C.....81

Figura 2 – Cariótipos de *Loricariichthys platymetopon* coradas com DAPI (azul) e CMA3 (amarelo).....82

Figura 3 – Cariótipo de *Loricariichthys platymetopon* após a double FISH com DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). No box, os cromossomos com NORs após Impregnação com Nitrato de Prata.....82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Dados citogenéticos disponíveis para os peixes de água doce do gênero *Hypostomus*25
- Tabela 2** – Dados citogenéticos disponíveis para os peixes neotropicais de água doce da subfamília Loricariinae32
- Tabela 3** – Informações sobre as espécies analisadas, número amostral, locais de coleta e coordenadas geográficas.....37
- Capítulo 1**
- Tabela 1** – Dados citogenéticos disponíveis na literatura para *Hypostomus ancistroides*, *Hypostomus hermanni* e *Hypostomus strigaticeps*.....69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UEL	Universidade Estadual de Londrina
NOR	Região Organizadora de Nucléolo
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
NF	Número Fundamental
M	Metacêntrico
SM	Submetacêntrico
ST	Subtelocêntrico
A	Acrocêntrico
CMA	Cromomicina A ₃
DAPI	4-6-diamidino-2-fenil-indol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO NEOTROPICAL	18
2.2	ICTIOFAUNA DA BACIA DO ALTO RIO PARANÁ.....	20
2.3	ASPECTOS GERAIS E CITOGENÉTICOS DO GÊNERO <i>HYPOSTOMUS</i> (LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE).....	21
2.4	CONSIDERAÇÕES GERAIS E CITOGENÉTICAS NA SUBFAMILIA LORICARIINAE, COM ÊNFASE NO GÊNERO <i>LORICARIICHTHYS</i>	29
3	OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	35
4	METODOLOGIAS	36
5	BIBLIOGRAFIA	41
	CAPÍTULO 1: DIVERSIFICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM <i>HYPOSTOMUS</i> (LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE): UMA ANÁLISE CITOGENÉTICA EM TRÊS ESPÉCIES DA BACIA DO PARANAPANEMA, ALTO RIO PARANÁ.....	52
1	Resumo.....	53
2	Introdução	54
3	Material e Métodos	55
4	Resultados	58
5	Discussão.....	63
6	Referências	72
	CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE UMA POPULAÇÃO DE <i>LORICARIICHTHYS PLATYMETOPON</i> (LORICARIIDAE, LORICARIINAE) DA REGIÃO URBANA DE LONDRINA, PARANÁ.....	76
1	Resumo.....	77

2	Introdução	78
3	Material e Métodos	79
4	Resultados	80
5	Discussão	82
6	Referências	86

1 INTRODUÇÃO

2

3 As espécies de peixes dulcícolas neotropicais da ordem
4 Siluriformes se destacam tanto em riqueza de espécies quanto em abundância,
5 com ampla distribuição em diferentes habitats, podendo ser encontradas
6 exclusivamente em ambientes com águas turvas, entre rochas e em fundo de
7 rios, com hábitos preferencialmente noturnos (PELEGRINI 2018). Dentre as
8 famílias que compõem esta ordem, Loricariidae se destaca por ser uma das
9 famílias mais especiosa e seus representantes, conhecidos como cascudos,
10 possuem corpo dorso/ventralmente achatado recoberto de placas ósseas e
11 boca em forma de ventosa (BRITSKI *et al.*, 1999); e são facilmente
12 encontrados desde o norte da Costa Rica até o sul argentino (REIS *et al.*,
13 2003).

14 Por apresentar uma gama de variações, sejam elas no padrão
15 de coloração e formas corporais especializadas, a família Loricariidae é
16 classificada com um grupo monofilético (COVAIN *et al.*, 2016) e, atualmente,
17 encontra-se dividida em seis subfamílias (LUJAN *et al.*, 2015). Destas, duas
18 ganham maior atenção por serem diversificadas em números de espécies e
19 com ampla distribuição, assim como por apresentarem uma alta diversidade
20 em níveis cromossômicos, sendo: a subfamília *Hypostominae* com número
21 diplóide variando de 34 em *Ancistrus cuiabae* (MARIOTTO *et al.*, 2009) a 84
22 em *Hypostomus perdido* (CEREALI *et al.*, 2008); e a subfamília *Loricariinae*
23 variando de 36 em *Rineloricaria latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998) a 74
24 em *Sturisoma cf. nigrostrum* (ARTONI & BERTOLLO, 2001).

25 O gênero *Hypostomus*, é um dos mais estudados
26 citogeneticamente dentro da subfamília *Hypostominae*, e os dados disponíveis
27 na literatura mostram uma complexa e extensa variação cromossômica, com
28 número diploide variando de $2n=52$ em *Hypostomus emarginatus* (ARTONI e
29 BERTOLLO, 2001) a $2n=84$ em *Hypostomus perdido* (CEREALI *et al.*, 2008),
30 sendo $2n=72$ considerado mais comum; esta variação pode ser explicada por
31 eventos de rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução cariotípica do
32 grupo, o que faz este gênero apresentar uma posição derivada em Loricariidae
33 (ARTONI e BERTOLLO, 2001; ARTONI e BERTOLLO, 1996).

34 Na subfamília Loricariinae, o gênero *Loricariichthys* apesar de
35 possuir apenas 17 espécies descritas, os dados citogenéticos disponíveis
36 mostram uma manutenção do número diploide de $2n=54$ (SCAVONE e JÚLIO
37 Jr. 1995; TAKAGUI *et al.*, 2014; 2020), com variação apenas na estrutura
38 cariotípica.

39 Tanto a subfamília Hypostominae quanto Loricariinae
40 apresentam diversos problemas taxonômicos, assim como uma alta
41 complexidade no número de espécies e elevada variabilidade cariotípica.
42 Embora os estudos citogenéticos nestas duas subfamílias são bastantes,
43 compreender a existência de rearranjos cromossômicos, polimorfismos
44 relacionados a cromossomos estruturais e/ou numéricos e a presença de
45 cromossomos sexuais são fundamentais para entender algumas questões
46 evolutivas envolvidas na família Loricariidae.

47 Assim sendo, o presente trabalho visou estudar por meio de
48 abordagens citogenéticas, espécies de peixes das subfamílias Hypostominae e
49 Loricariinae pertencentes a diferentes localidades da bacia do Rio
50 Paranapanema, com a finalidade de levantar dados que auxiliem no
51 entendimento da evolução cariotípica ocorrida nestas subfamílias.

52 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

53 2.1 CARACTERIZAÇÃO DA ICTIOFAUNA DA REGIÃO NEOTROPICAL

54 A Região Neotropical, além de ser considerada uma das
55 regiões com a maior biodiversidade do planeta Terra (ANTONELLI *et al.*,
56 2018), também abriga a maior diversidade de espécies de peixes de água
57 doce do mundo (ALBERT *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2016; NELSON, 2016).

58 Os peixes formam um grupo de vertebrados extremamente
59 diversificado (LOWE-McCONNELL, 1999; NELSON, 2016) com
60 aproximadamente 36.128 espécies descritas válidas (FRICKE *et al.*, 2022).
61 Apesar de muitas espécies ainda não terem sido descritas, estimativas
62 apontam uma diversidade de 9.100 espécies de peixes dulcícolas e marinhos
63 presentes na América do Sul sendo que, somente em águas doces, foram
64 descritas um total equivalente de 5.160 espécies, distribuídas em 739 gêneros,
65 69 famílias e 20 ordens (REIS *et al.*, 2016).

66 Compreendendo uma fauna taxonomicamente distinta, a
67 Região Neotropical se estende ao longo das Américas Central e do Sul,
68 incluindo drenagens desde o sul mexicano até a região estuária do Rio da
69 Prata ao norte da Argentina (REIS *et al.*, 2003; ALBERT e REIS, 2011). Grande
70 parte da Região Neotropical é composta por territórios da América do Sul, e o
71 motivo principal pelo qual ela concentra a maior diversidade de peixes de água
72 doce do mundo, está no fato de que faz drenagem com as três maiores bacias
73 hidrográficas do mundo, do rio Amazonas, Orinoco e Paraná-Paraguai
74 (ALBERT e REIS, 2011). Juntas, estas três bacias constituem o maior volume
75 de habitat aquático de qualquer região na Terra, com descarga de água médio
76 anual superior a 269.000 m³ por segundo (VARI & MALABARBA, 1998; REIS
77 *et al.*, 2016).

78 Além destas três principais bacias, outras dez fazem parte da
79 Ecorregião de Água Doce da América do Sul: Atlântico Leste, Guianas,
80 Magdalena, Maracaibo-Caribe, Atlântico Nordeste, Noroeste do Pacífico,
81 Atlântico Sudeste, Cone Sul, São Francisco e Titicaca (ABELL *et al.*, 2008)
82 **(Fig. 1).**



83 **Figura 1:** Bacias Hidrográficas da América do Sul. Figura adaptada a partir de ALBERT *et al.*
 84 (2016).

85

86 A existência das bacias hidrográficas contribuíram para o
 87 surgimento de uma extensa fauna de peixes no continente sul-americano, cujas
 88 espécies sofreram uma série de adaptações evolutivas em decorrência dos
 89 eventos geológicos e climáticos ocorridos a mais de 100 milhões de anos atrás
 90 (LUNDBERG *et al.*, 1998; ALBERT *et al.*, 2011) e, em contrapartida, a América
 91 do Sul foi a única região do planeta que não sofreu danos significativos
 92 resultante do resfriamento ocorrido no período Cenozóico e do aumento da
 93 sazonalidade nas latitudes equatoriais, fatos estes que nas demais regiões da
 94 Terra culminaram em uma extinção progressiva (HOORN *et al.*, 2010;
 95 KRISTIANSEN *et al.*, 2011; MORLEY, 2012).

96 De modo geral, a ictiofauna de peixes de água doce presente na região
 97 neotropical é subdividida em três grupos, com o primeiro composto pelos
 98 ostariophysianos, pertencentes à superordem Ostariophysy, que compreendem
 99 os peixes que possuem um aparato de audição, conhecido como aparelho de
 100 weber; grupo este dominante em peixes de água doce do mundo (REIS *et al.*,
 101 2016). O segundo grupo, superordem Acanthopterygi, composto por peixes
 102 dulcícolas que são taxonomicamente mais próximos aos peixes marinhos
 103 (REIS *et al.*, 2016); e o terceiro grupo, superordem Batoidea, composto por

104 teleósteos e elasmobrânquios marinhos (ALBERT e REIS *et al.*, 2011). Dentro
105 da superordem Ostariophysy, três ordens ganham destaque: ordem
106 Siluriformes representada pelos peixes de couro, conhecidos como bagres,
107 mandis; ordem Characiformes representada pelos peixes de escamas,
108 conhecidos como lambaris, piranhas, etraíras; e a ordem Gymnotiformes
109 representada por peixes elétricos, conhecidos como poraquês e tuiuiús.
110 Destas, a ordem Siluriformes é a mais abundante em número de espécies com
111 cerca de 4.090 (REIS *et al.*, 2016; FRICKE *et al.*, 2022).

112 2.2 ICTIOFAUNA DA BACIA DO ALTO RIO PARANÁ

113 O Rio Paraná, formado pela união dos rios Grande e
114 Paranaíba, é o décimo maior rio do mundo e a segunda maior bacia
115 hidrográfica da América do Sul, que compreende cerca de 4.695 km² de
116 extensão, desde sua nascente até desaguar na bacia do Rio de *La Plata*, na
117 Argentina (AGOSTINHO *et al.*, 1995; AGOSTINHO *et al.*, 2018). O terço
118 superior, também chamado de Alto Rio Paraná, é um dos principais sistemas
119 fluviais da América Latina, e o Rio Paraná ao todo drena uma área de 900.000
120 km² e está em sua maioria inserido no território brasileiro, onde faz fronteira
121 com os estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Goiás e uma pequena
122 parcela do território paraguaio, na divisa com Mato Grosso do Sul
123 (AGOSTINHO, JÚLIO-JR, 1999; CASTRO *et al.*, 2003; AGOSTINHO *et al.*,
124 2018).

125 O sistema de drenagem do Rio Paraná é um dos mais afetados
126 da Região Neotropical possuindo uma série de barramentos hidrelétricos, como
127 os rios Paranaíba, Tietê, Grande e Paranapanema, ambos distribuídos ao
128 longo de sua calha principal e com importantes tributários (AGOSTINHO *et al.*,
129 2002; 2008). Tais barramentos são implantados especialmente para a geração
130 de energia elétrica, mas vem ocasionando sérias ameaças à biodiversidade de
131 água doce neotropical (AGOSTINHO *et al.*, 2005) como, por exemplo,
132 alteração da dinâmica do ambiente, uma vez que um percurso que era lóxico
133 pode se tornar lêntico, além de interferir consideravelmente nos movimentos
134 reprodutivos, principalmente nas espécies de peixes migradoras (AGOSTINHO
135 *et al.*, 1992; AGOSTINHO *et al.*, 2007).

136 O rio Paranapanema é considerado um dos maiores afluentes
137 do Alto Rio Paraná (AGOSTINHO *et al.*, 2003, 2007, 2008). Sua cabeceira
138 encontra-se localizada na Serra de Paranapiacaba, no município de Capão
139 Bonito/SP e sua foz fica na margem esquerda do rio Paraná. Faz divisa com os
140 estados de São Paulo e Paraná e possui uma área de aproximadamente
141 106.500 km² (ANA, 2016). Possui onze usinas hidrelétricas ao longo do seu
142 leito, no qual seus principais tributários são os rios Tibagi, Cinzas, Itararé,
143 Pirapó, Taquari, Itapetininga, Apiaí-Guaçu e Pardo, com a maioria localizado na
144 margem esquerda da calha principal (BRITTO *et al.*, 2003; HOFFMANN *et al.*,
145 2005; VIANNA e NOGUEIRA, 2008).

146 Com base em um compilado de estudos disponíveis na
147 literatura sobre a ictiofauna de peixes existentes na bacia do rio
148 Paranapanema, Jarduli *et al.* (2020) obtiveram como resultados uma lista de
149 225 espécies presentes nesta bacia, na qual as ordens mais especiosas foram
150 Siluriformes (91) seguida de Characiformes (87); e as famílias mais abundantes
151 foram Loricariidae (39) e Characidae (33). Nesta mesma pesquisa, o gênero
152 *Hypostomus* foi o mais rico com 16 espécies encontradas ao longo da bacia,
153 sendo que a maioria destas espécies estavam presentes no rio Tibagi, que é o
154 maior afluente do rio Paranapanema, localizado na sua margem esquerda
155 (BOARETTO *et al.*, 2020).

156 **2.3 ASPECTOS GERAIS E CITOGENÉTICOS DO GÊNERO *Hypostomus***

157 *Hypostomus* (Lacépède, 1803) é o gênero de bagres mais
158 especiosos de Loricariidae e Hypostominae, com cerca de 149 espécies
159 válidas (QUEIROZ *et al.*, 2020). Com ampla distribuição geográfica nas
160 Américas Central e Sul (ZAWADZKI *et al.*, 2016), os peixes deste gênero
161 possuem hábito de forrageio, comportamento pouco migratório e uma alta
162 capacidade adaptativa, o que facilita a formação de pequenas populações
163 isoladas mesmo sem a presença de barreiras físicas (ALVES *et al.*, 2005;
164 BICKFFORD *et al.*, 2007). Além do mais, são bentônicos, herbívoros e
165 detritívoros (HANH *et al.*, 2004) e possuem uma boca em forma de ventosa
166 com dentes raspadores e intestino longo (DELARIVA, AGOSTINHO, 2001),
167 adaptações estas extremamente importantes para a aquisição e

168 processamento de alimentos.

169 Os primeiros estudos citogenéticos em espécies do gênero
170 *Hypostomus* iniciaram-se com o trabalho de Muramoto *et al.* (1968) em que
171 analisaram exemplares de *H. plecostomus* com $2n=54$ cromossomos; seguido
172 dos trabalhos de Michelle *et al.* (1977) com *H. paulinus* ($2n=74$), *H. ancistroides*
173 ($2n=68$), *H. strigaticeps* ($2n=74$) e *H. macrops* ($2n=68$). Estes primeiros estudos
174 trazem apenas dados relacionados a número diploide e fórmula cariotípica no
175 gênero. Com o passar dos anos e a necessidade de investigar mais profundo o
176 comportamento cromossômico dos peixes, novas técnicas citogenéticas foram
177 sendo desenvolvidas.

178 Por apresentar uma ampla distribuição e uma vasta diversidade
179 em números de espécies e considerando que inúmeras espécies ainda não
180 foram cariotipadas, a maioria dos estudos citogenéticos realizados no gênero
181 *Hypostomus* disponíveis na tabela 1 foram de espécies coletadas em
182 importantes drenagens hidrográficas, como a bacia do Rio Mogi-Guaçu
183 (ARTONI e BERTOLLO, 1996), bacia do Rio Araguaia (ARTONI e BERTOLLO,
184 2001), bacia do Rio Xingu (MILHOMEM *et al.*; 2010), bacia do Rio Tibagi
185 (MAURUTTO *et al.*; 2012), bacia do Rio Iguaçu (BUENO *et al.*; 2013) e bacia
186 do Rio Paranapanema (ROCHA-REIS *et al.*; 2018). Assim, os dados
187 citogenéticos apresentados na tabela 1 mostram uma ampla variação no
188 número diploide de $2n = 52$ em *H. emarginatus* (ARTONI e BERTOLLO, 2001)
189 a $2n = 84$ em *H. perdido* (CEREALI *et al.*, 2008), sendo $2n = 72$ considerado
190 comum no grupo.

191 Além da diversidade de número diplóide, há também uma
192 grande variabilidade de fórmula cariotípica nas espécies deste gênero,
193 podendo ser encontrada variação dentro de uma população da mesma
194 espécie, a exemplo de *H. paulinus* do Rio Mogi-Guaçu (ARTONI e BERTOLLO,
195 1996) que apresentou duas fórmulas cariotípicas distintas. Assim como entre
196 populações da mesma espécie, ainda foi possível notar variações na estrutura
197 cariotípica entre os sexos, como observado em *Plecostomus ancistroides*
198 (MICHELLE *et al.*; 1977); *Hypostomus spp* (ARTONI *et al.*; 1998); *H. cf.*
199 *plecostomus* (OLIVEIRA *et al.*, 2015) e *H. aff. ancistroides* (KAMEI *et al.*, 2017;
200 ROCHA-REIS *et al.*, 2018). Assim, a hipótese mais aceita, até o momento, em
201 relação às variações no número diploide e na fórmula cariotípica facilmente

202 encontradas em espécies de *Hypostomus*, é a ocorrência de rearranjos
203 cromossômicos, como fusões/fissões cêntricas e inversões, sendo os principais
204 responsáveis pela evolução cariotípica do grupo (ARTONI e BERTOLLO, 1996,
205 2001).

206 Em Loricariidae, a presença de RONS simples é considerada
207 ancestral para a família (ARTONI e BERTOLLO, 1996). No gênero
208 *Hypostomus*, as regiões organizadoras de nucléolo são múltiplas na grande
209 maioria, mas algumas espécies com RONS simples também podem ser
210 encontradas (tabela 1). Variações numéricas e de posições de RONS entre
211 populações da mesma espécie também pode ser observadas dentro do grupo,
212 como em *H. strigaticeps*, *H. regani*, *H. albopunctatus*, *H. paulinus*, *H. topavae* e
213 *H. cochliodon* (tabela 1).

214 Em relação à heterocromatina, no gênero *Hypostomus* ela
215 pode estar localizada na região terminal de alguns cromossomos como em *H.*
216 *ancistroides*, *H. strigaticeps* e *H. paulinus*, assim como intersticialmente em *H.*
217 *regani*, como observado no trabalho de Rubert *et al.* (2011). Em algumas
218 espécies como *H. affinis* (BRANDÃO *et al.*, 2018), *H. aff. cochliodon* (BECKER
219 *et al.*, 2014); *H. strigaticeps* (BAUMGARTNER *et al.*, 2014) e *H. nigromaculatus*
220 (ALVES *et al.*, 2012) a heterocromatina foi identificada em regiões terminais e
221 pericentroméricas de alguns cromossomos. Em *Hypostomus sp.*, ROCHA-REIS
222 *et al.*, (2013) os blocos de heterocromatina também encontram-se dispersos
223 em regiões intersticiais.

224 Quanto aos dados de coloração com fluorocromos base
225 específicos CMA₃/DAPI, alguns autores identificaram sítios ricos em bases CG
226 em *H. affinis* (KAVALCO *et al.*, 2004; 2005); *H. ancistroides* (RUBERT *et al.*,
227 2011) e *H. strigaticeps* (BAUMGARTNER *et al.*, 2014), assim como sequências
228 ricas em AT para *H. nigromaculatus* (RUBERT *et al.*, 2008); *H. paulinus*
229 (RUBERT *et al.*, 2011); *Hypostomus sp.X1* (MILHOMEM *et al.*, 2010) e *H. aff.*
230 *unae* (BITENCOURT *et al.*, 2012).

231 A maioria dos estudos atuais envolvendo análises citogenéticas
232 tem mapeado a localização dos sítios ribossômicos (DNAr) 18S e 5S, e estes
233 podem estar em diferentes posições e pares de cromossomos (tabela 1). É
234 facilmente observado em *Hypostomus* sítios múltiplos de DNAr 18S e 5S,
235 entretanto, o padrão simples também é recorrente no gênero para ambos os

236 genes, como observado em *H. derbyi* (LORSCHIEDER *et al.*, 2018), *H. aff.*
237 *paulinus* (BUENO *et al.*, 2014), *H. myersi* (LORSCHIEDER *et al.*, 2018), *H.*
238 *nigromaculatus* (TRALDI *et al.*, 2013) e *H. topavae* (BUENO *et al.*, 2014).
239

240 **Tabela 1** - Dados citogenéticos disponíveis para os peixes de água doce neotropicais do gênero *Hypostomus* em ordem de número diploide,
 241 baseados em artigos originais. Legenda: **2n**= número diplóide; **m**= metacêntrico; **sm**= submetacêntrico; **st**= subtelocêntrico; **a**= acrocêntrico;
 242 **NORs**= regiões organizadoras nucleolares; **rDNA**= DNA ribossomal; **Ref.**= Referências; ♀= Feminino; ♂= Masculino.

ESPECIES	LOCALIDADE	2n	FÓRMULA CARIOTÍPICA	NORs	rDNA 18S	rDNA 5S	Ref
<i>Hypostomus emarginatus</i>	Rio Araguaia, Mato Grosso	52		simples			5
<i>Hypostomus plecostomus</i>		54	24m/sm + 12st + 18a				35
<i>Hypostomus faveolus</i>	Rio Taquaralzinho, Mato Grosso	64	18m + 8sm + 22st + 16a	31a			1
	Rio Taquaralzinho, Mato Grosso	64	18m + 8sm + 22st + 16a		31a	1m, 15,22,23st, 26a	2
<i>Hypostomus sp.</i> (♀)	Rio Araguaia, Mato Grosso	64	15m + 24sm + 25st/a	30a			3
<i>Hypostomus sp.</i> (♂)	Rio Araguaia, Mato Grosso	64	14m + 24sm + 26st/a	30a			3
<i>Hypostomus sp. X1</i>	Rio Xingu, Pará	64	32m/sm + 32st/a	(25st-a)			4
<i>Hypostomus sp. G</i>	Rio Araguaia, Mato Grosso	64	14m + 24sm + 26st/a	simples			5
<i>Hypostomus cochliodon</i>	Rio Iguaçu, Paraná	64	12m + 16s + 16st + 20a	(28a)			1
	Rio Iguaçu, Paraná	64	12m + 16s + 16st + 20a		(28a)	(13sm, 21st, 29a)	2
	Rio Piraputanga, Mato Grosso	64	16m + 20sm + 28st/a	múltiplos	múltiplos		6
<i>Hypostomus aff. cochliodon</i>	Córrego Esparramo, Mato Grosso	64	18m + 20sm + 26st/a	(22, 26 st-a)			7
	Córrego Pitaluga, Mato Grosso	64	18m + 20sm + 26st/a	(22, 26 st-a)			7
<i>H. aff. ancistroides</i>	Rio Tibagi, Paraná	66	12m + 16sm + 10st + 28a	4 à 6 pares	4 à 6 pares		8
<i>H. aff. ancistroides</i> (♀)	Bacia do Rio arapanema	66	16m + 12sm + 12st + 26a	(5m, 21a)	(5m, 21a)	(4m)	9
<i>H. aff. ancistroides</i> (♂)	Bacia do Rio Paranapanema	66	17m + 12sm + 12st + 25a	(5m, 21a+ Y)	(5m, 21a+ Y)	(4m)	9
<i>Hypostomus sp. X2</i>	Rio Xingu, Pará	66	32m/sm + 34st/a	(29st-a)			4
<i>Hypostomus commersoni</i>	Rio Forquetinha, RS	66	10m + 16sm + 40st/a	(19, 20)	(19, 20)		6
<i>Hypostomus affinis</i>	Rio Jacuí, São Paulo	66	14m + 14sm + 12st + 26a			(2sm, 2st-a, 4a)	10
	Rio Jacuí, São Paulo	66	14m + 14sm + 12st + 26a	(6m, 21a, 28a)	(6m, 21a, 28a)		11
	Riacho Jacuí, Cunha, São Paulo	66	12m + 12sm + 14st + 14a	(21a, 24a)	(8sm, 21a, 24a)	(6m)	12
	Rio Paraíba do Sul, Itacoara, RJ	66	12m + 12sm + 14st + 14a	(21a, 22a, 24a)	(21a, 24a)	(6m)	12
<i>Hypostomus tapijara</i>	Rio Ribeira de Iguape, SP	66	14m + 24sm + 14st + 14a	(4m, 29a)	(4m, 10sm, 29a)	(2m, 4m, 10sm, 31a)	13
<i>Hypostomus derbyi</i>	Rio Iguaçu, Curitiba, Paraná	66	6m + 10sm + 20st + 30a	múltiplos	simples		8
<i>Plecoc. ancistroides</i> (♀)		68	10m + 28sm + 30st/a				14
<i>Plecoc. ancistroides</i> (♂)		68	10m + 27sm + 31st/a				14
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Riacho Monjolinho, São Paulo	68	16m + 18sm + 34st/a	(10sm, 17sm, 18st/a)			15
	Rio Araquá, São Paulo	68	18m + 10sm + 12st + 28a	(6m, 13sm, 14sm)			16
	Rio Piquiri, Paraná	68	14m + 14sm + 8st + 32a				17
	Rio Piquiri, Paraná	68	14m + 14sm + 8st + 32a	(19st, 20st)			1
	Rio Piquiri, Paraná	68	14m + 14sm + 8st + 32a	(19st, 20st)	(19st, 20st)	(5m)	2
	Rio Paranapanema, São Paulo	68	10m + 26sm + 32st/a	(19, 20, 21 e 22st-a)	(19, 20, 21, 22st-a)		18

	Córrego Dourados, Paraná	68	14m + 12sm + 18st + 24a	(9sm, 10sm)				19
	Córrego Maringá, Paraná	68	16m + 12sm + 18st + 22a	(5m, 11sm, 15st)				19
	Córrego Ximbaúva, Paraná	68	8m + 10sm + 18st + 32a	(3m, 5sm, 9sm)				19
	Rio Corumbataí, São Paulo	68	16m + 4sm + 16st + 32a	(1m, 10sm)				20
	Rio Paranapanema,	68	10m + 20sm + 10st + 28a	(12sm, 16st, 20st)	(12sm, 16st, 20st)	(15sm)		21
	Ribeirão da Lapa, Ipeúna, SP	68	14m + 16sm + 22st + 16a	(8sm, 13sm, 15sm)	(8sm, 13sm, 15sm)	(2m, 8sm, 13sm)		13
<i>H. aff. ancistroides</i> (♀)	Rio Keller, Bacia do rio Paraná	68	16m + 13sm + 22st + 17a	(7m, 9sm, 15st)	(7m, 9sm, 15st)	(8m, 21st)		22
<i>H. aff. ancistroides</i> (♂)	Rio Keller, Bacia do rio Paraná	68	16m + 12sm + 22st + 18a	(7m, 9sm, 15st)	(7m, 9sm, 15st)	(8m, 21st)		22
<i>Hypostomus sp.</i>	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	68	6m + 6sm + 32st + 24a	(7sm, 14sm)				23
<i>Hypostomus commersoni</i>	Rio Iguaçu, Paraná	68	12m + 14sm + 14st + 28a	(17sm, 23st, 31a)				1
	Rio Piquiri, Paraná	68	12m + 14sm + 14st + 28a		(21a, 23a, 31a)	(4m, 19sm, 21,23a)		2
	Rio Iguaçu, Paraná	68	12m + 12sm + 8st + 36a	múltiplos	múltiplos			8
	Rio Iguaçu, Paraná	68	12m + 12sm + 14st + 30a	(15sm, 18a)	(13,14,15st,28a)	(5m,9sm,13,15,19st)		24
<i>H. prope plecostomus</i>	Rio Orinoco, Venezuela	68	12m + 16sm + 12st + 28a	(16st)				20
<i>H. cf. plecostomus</i> (♀)	Rio Severo, Mato Grosso	68	15m + 24sm + 14st + 15a	(21st, 27a)	(21st, 27a)	múltiplos		25
<i>H. cf. plecostomus</i> (♂)	Rio Severo, Mato Grosso	68	14m + 24sm + 14st + 16a	(21st, 27a)	(21st, 27a)	múltiplos		25
<i>Hypostomus macrops</i>		68	10m + 14sm + 44st/a					14
<i>Hypostomus derbyi</i>	Rio Iguaçu, Paraná	68	12m + 12sm + 10st + 34a	(14st)	(14st)	(2m)		24
<i>Hypostomus aff. topavae</i>	Rio Rincão, São Paulo	70	18m + 14sm + 38st/a	(7m, 26st-a, 27st-a)				15
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	72	12m + 18sm + 42st/a	(17st/a)				15
	Rio Paranapanema	72	10m + 16sm + 46st/a	(18st/a, 28st/a)	(18st/a, 28st/a)			18
	Rio Ivaí, Floresta, Paraná	72	10m + 14sm + 18st + 30a	(10sm,14st,18st,29a)				19
	Rio Piquiri, Paraná	72	12m + 12sm + 18st + 30a	(25a, 32a)				1
	Córrego Hortelã, SP	72	10m + 18sm + 18st + 26a	(28a)	(28a, 29a)	múltiplos		21
	Rio Piquiri, Paraná	72	12m + 12sm + 18st + 30a		(25a, 32a, 36a)	(4m, 21st, 26a)		2
	Riacho Atlântico, Paraná	72	12m + 12sm + 18st + 30a	(22a, 23a, 24a)	(22a, 23a, 24a)	(4m, 21st, 28a)		26
	Rio Piquiri, Paraná	72	12m + 12sm + 18st + 30a	(22a, 23a, 24a)	(22a, 23a, 24a)	(4m, 21st, 28a)		26
	Rio Paraná, Paraná	72	12m + 12sm + 18st + 30a	(22a, 23a, 24a)	(22a, 23a, 24a)	(4m, 21st, 28a)		26
	Rio Iguaçu, Paraná	72	12m + 12sm + 18st + 30a	(22a, 23a, 24a)	(22a, 23a, 24a)	(4m, 21st, 28a)		26
	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	72	10m + 16sm + 46st/a	(18st/a)	(18st/a)			6
<i>Hypostomus regani</i>	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	72	10m + 20sm + 42st/a					15
	Rio Araquá, Botucatu, SP	72	12m + 18sm + 26st + 16a	(35a, 36a)				16
	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	72	6m + 6sm + 32st + 28a	(15st, 16st)				23
	Rio Piumhi, Minas Gerais	72	8m + 16sm + 20st + 28a	(15st)	(15st)	múltiplos		27
	Rio Paranapanema, São Paulo	72	10m + 18sm + 44st/a	(26st-a, 27st-a)	(26st-a, 27st-a)			18
	Rio Ivaí, Floresta, Paraná	72	12m + 14sm + 26st + 20a	múltiplos				19
	Rio Piquiri, Paraná	72	12m + 8sm + 10st + 42a	(32a, 35a)				1

	Rio Piquiri, Paraná	72	12m + 8sm + 10st + 42a		(20a, 32a)	(4m)	2
	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	72	10m + 20sm + 42st/a	(27st-a, 28st-a)	(27st-a, 28st-a)		6
	Rio Pirapitinga, Goiás	72	12m + 22sm + 38st/a	(21st-a, 22st-a)	(21st-a, 22st-a)		6
<i>Hypostomus paulinus</i>	Rio Mogi-Guaçu	72	10m + 18sm + 44st/a				15
	Rio Mogi-Guaçu	72	14m + 20sm + 38st/a				15
<i>Hypostomus sp.</i>	Rio Mogi-Guaçu	72	10m + 26sm + 36 st/a				15
<i>Hypostomus hermanni</i>	Rio Piquiri, Paraná	72	10m + 8sm + 32st + 22a	(27a, 29a, 33a)			1
	Rio Piquiri, Paraná	72	10m + 8sm + 32st + 22a		(27a, 29a, 33a)	múltiplos	2
	Rio Piracicaba, São Paulo	72	8m + 18sm + 46st/a	(16, 20, 22)	(20, 22)		6
<i>Hypostomus aff. hermanni</i>	Rio Keller, Paraná	72	12m + 22sm + 18st + 20a	(16sm, 22sm, 31a)	(16-22sm, 31a)	(4m)	22
<i>Hypostomus goyazensis</i>	Rio Vermelho, Goiás	72	10m + 16sm + 10st + 36a	(18st)			16
<i>Hypostomus heraldoi</i>	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	72	6m + 6sm + 26st + 34a	(20a)			23
<i>Hypostomus strigaticeps</i>		74	8m + 4sm + 62st/a				14
	Rio Corumbataí, São Paulo	74	10m + 14sm + 14st + 36a	(14st, 21a, 22a, 24a)			20
<i>Hypostomus aff. paulinus</i>	Rio Piquiri, Paraná	74	10m + 12sm + 20st + 32a	(35a)			1
<i>Hypostomus aff. paulinus</i>	Rio Piquiri, PR	74	10m + 12sm + 20st + 32a		(35a)	(2m)	2
<i>Hypostomus paulinus</i>		74	10m + 20sm + 44st/a				14
<i>Hypostomus margaritifera</i>	Rios Tijuco e Araguari	74	10m + 24sm + 40st/a	(8sm, 9sm, 29a)			28
<i>Hypostomus sp.</i>	Córrego Esparramo, MG	74	12m + 20sm + 42st/a	(8sm, 24st-a)			7
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	74	10m + 20sm + 44st/a	múltiplos			15
	Rio Corumbataí, São Paulo	74	10m + 20sm + 16st + 28a	(15sm)			20
	Rio Piquiri, Paraná	74	8m + 14sm + 16st + 36a	(35a)			1
	Rio Piquiri, Paraná	74	8m + 14sm + 16st + 36a		(35a)	(1m)	2
	Rio Piracicaba, São Paulo	74	10m + 20sm + 44st/a	(34a, 36a)	(34a, 36a)		6
<i>H. prope iheringii</i>	Rio Corumbataí, São Paulo	74	10m + 14sm + 20st + 30a	(23a, 24a, 25a, 30a)			20
<i>H. nigromaculatus</i>	Rio Pirapitinga, Goiás	74	8m + 22sm + 44st/a	(27a)	(27a)		6
<i>Hypostomus aff. agna</i>	Ribeirão Cavallo, Santa Catarina	74	8m + 10sm + 32st + 24a	(5sm, 13st)			23
<i>Hypostomus myersi</i>	Rio Iguaçu, Paraná	74	12m + 16sm + 12st + 34a	(32a)	(32a)	(2m)	24
<i>Hypostomus paulinus</i>	Rio Paranapanema	76	6m + 16sm + 54st/a	simples	simples		18
	Rio Piracicaba, São Paulo	76	6m + 16sm + 54st/a	múltiplos	múltiplos		6
<i>H. prope paulinus</i>	Rio Corumbataí, São Paulo	76	6m + 18sm + 12st + 40a	simples			20
<i>Hypostomus aff. paulinus</i>	Rio Piracicaba, São Paulo	76	8m + 18sm + 50st/a	(24, 25)	(24)		6
<i>Hypostomus sp. F</i>	Rio São Francisco, MG	76	10m + 16sm + 50st/a				29
<i>Hypostomus iheringii</i>	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	76	8m + 30sm + 38st/a	simples			15
<i>H. nigromaculatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	76	8m + 20sm + 48st/a	múltiplos			30
	Ribeirão Três Bocas, Paraná	76	6m + 20sm + 50st/a	múltiplos			30
	Ribeirão dos Apertados, Paraná	76	6m + 20sm + 50st/a	múltiplos			30
	Ribeirão Hortelã, São Paulo	76	8m + 18sm + 20st + 30a	(28a)	(28a)	(2m, 30a)	21

<i>Hypostomus aff. unae</i>	Ribeirão da Lapa, São Paulo		12m + 22sm + 30st + 12a	(33a)	(33a)	(2m)	13
	Rio Contas, Bahia	76	12m + 16sm + 48st/a	(2m)			31
	Rio Preto do Costa, Bahia	76	12m + 20sm + 44st/a	(2m)			31
	Rio Oricó, Bahia	76	10m + 14sm + 52st/a	(2m)			31
<i>Hypostomus cf. wuchereri</i>	Rio Preto do Criciúma, Bahia	76	10m + 20sm + 46st/a	(2m)			31
	Rio Mutum, Bahia	76	10m + 18sm + 48st/a	(2m)			32
	Rio Uma, Bahia	76	10m + 18sm + 48st/a	(2m)			32
<i>Hypostomus iheringii</i>	Córrego da Lapa, São Paulo	80	8m + 16sm + 28st + 28a	(13st, 20s, 34a)	(13st, 20s, 34a)	(2m)	33
	Rio Piracicaba, São Paulo	80	8m + 14sm + 58st/a	(18, 22, 27)	(18, 22, 27)		6
<i>Hypostomus topavae</i>	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	80	8m + 16sm + 56st/a	múltiplos			15
	Córrego Carrapato, Penápolis	80	6m + 8sm + 42st + 24a	(11st, 30a)			23
	Rio Piquiri, Paraná	80	14m + 10sm + 26st + 30a				17
	Rio Piquiri, Paraná	80	14m + 10sm + 26st + 30a	(26)			1
	Rio Piquiri, Paraná	80	14m + 10sm + 26st + 30a		(26)	(2m)	2
	Rio Keller, Ivaí, Paraná	80	14m + 30sm + 18st + 18a	(13m, 18m, 35a)	(13m, 18m, 35a)	(5m, 17sm)	22
<i>Hypostomus sp. 3</i>	Córrego Salobrinha, MS	82	6m + 12sm + 64st/a				34
<i>Hypostomus mutucaae</i>	Rio Claro Mutuca, Mato Grosso	82	4m + 18sm + 60st/a	(13st-a, 20st-a)	(13st-a, 20st-a)		6
<i>Hypostomus sp. 2</i>	Rio Perdido, Mato Grosso	84	6m + 16sm + 62st/a				34

Referências: 1- Bueno *et al.* (2013); 2- Bueno *et al.* (2014); 3- Artoni *et al.* (1998); 4- Milhomem *et al.* (2010); 5- Artoni e Bertollo (2001); 6- Rubert *et al.* (2016); 7- Becker *et al.* (2014); 8- Maurutto *et al.* (2012); 9- Rocha-Reis *et al.* (2018); 10- Kavalco *et al.* (2004); 11- Kavalco *et al.* (2005); 12- Brandão *et al.* (2018); 13- Traldi *et al.* (2013); 14- Michele *et al.* (1977); 15- Artoni e Bertollo (1996); 16- Alves *et al.* (2006); 17- Bueno *et al.* (2012); 18- Rubert *et al.* (2011); 19- Endo *et al.* (2012); 20- Alves *et al.* (2012); 21- Pansonato-Alves *et al.* (2013); 22- Kamei *et al.* (2017); 23- Martinez *et al.* (2011); 24- Lorscheider *et al.* (2018); 25- Oliveira *et al.* (2015); 26- Baumgartner *et al.* (2014); 27- Mendes-Neto *et al.* (2011); 28- Correia, 2010; 29- Artoni e Bertollo (1999); 30- Rubert *et al.* (2008); 31- Bitencourt *et al.* (2012); 32- Bitencourt *et al.* (2011); 33- Traldi *et al.* (2012); 34- Cereali *et al.* (2008).

243 2.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS E CITOGENÉTICAS NA SUBFAMÍLIA LORICARIINAE, COM 244 ÊNFASE NO GÊNERO *Loricariichthys*

245 A subfamília Loricariinae é a segunda maior subfamília dos
246 loricarídeos com cerca de 257 espécies válidas e aproximadamente 30 gêneros
247 (FRICKE *et al.*, 2022). Esta subfamília é altamente diversificada e seus
248 representantes são conhecidos como cascudos-chinelos, onde as espécies são de
249 tamanho pequeno a médio porte, apresentando um pedúnculo caudal longo e
250 deprimido e ausência de nadadeira adiposa (FERRARIS, 2003). Ocorrem com
251 frequência na região da Costa Rica, Panamá e em toda a América do Sul. Seus
252 representantes vivem em ambientes variados, não são migradores, são bentônicos e
253 sedentários e possuem diferenciações morfológicas corporais de acordo com o
254 habitat em que vivem: por exemplo, alguns indivíduos possuem corpo longo e
255 delgado que melhor se adaptam a madeira e folhas submersas, já outros são
256 grandes e achatados que facilitam a se enterrarem em substratos (COVAIN *et al.*,
257 2016).

258 Dentro da subtribo Loricariina, o gênero *Loricariichthys* (Bleeker,
259 1862), distribui-se na maioria das drenagens cisandinas da América do Sul ao norte
260 de Buenos Aires (Reis & Pereira, 2000). Suas espécies são detritívoras de pequeno
261 a médio porte e possuem características exclusivas dos lábios quando comparado
262 com os demais loricarídeos: o lábio superior apresenta uma protuberância à região
263 mediana do premaxilar, e nos machos adultos os lábios tornam-se mais largos e
264 compridos. (TEIXEIRA de MELLO *et al.*, 2009). Com 17 espécies válidas, este
265 gênero é considerado o maior dentro de Loricariinae e passou por uma revisão
266 taxonômica na qual a sua posição filogenética está mais relacionada com *Limatu*
267 *lichthys*, *Pseudoloricaria*, *Furcodontichthys* e *Hemiodontichthys* (PAIXÃO, 2012).

268 Os estudos citogenéticos disponíveis na literatura mostram que o
269 número diplóide dos Loricariinae variam de $2n=36$ a $2n=74$, em *Rineloricaria*
270 *latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998) e *Sturissoma* cf. *nigrirostrum* (ARTONI e
271 BERTOLLO, 2001) respectivamente (tabela 2); e, até o momento, *Loricariichthys* é o
272 único gênero que apresenta manutenção do número diploide de $2n=54$
273 cromossomos, mas com variações na estrutura cariotípica. O primeiro estudo
274 citogenético realizado no gênero iniciou-se com Fenocchio *et al.* (1990) que

275 determinaram o número diploide de $2n=54$ em *Loricariichthys sp.* da bacia do Rio
276 Paraná. Posteriormente, Scavone e Júlio Jr (1995) analisaram exemplares de
277 *Loricariichthys platymetopon* e observaram, além do mesmo número diploide, fórmula
278 cariotípica distinta entre macho e fêmea confirmando um heteromorfismo sexual do
279 tipo ZZ/ZW. Além do mais, neste mesmo trabalho, Scavone e Júlio Jr. (1995) trazem
280 os primeiros dados relacionados à distribuição de heterocromatina e localização de
281 regiões organizadoras de nucléolo para a espécie, estando a heterocromatina
282 presente na região centromérica dos pares sexuais e a RON presente no par 14,
283 subtelocêntrico.

284 Polimorfismos cromossômicos estruturais e numéricos são
285 frequentes em Loricariinae. Giuliano-Caetano (1998) evidenciou polimorfismos
286 numéricos em *Rineloricaria latirostris*, sugerindo uma marcante participação de
287 eventos de fusão e fissão cêntrica na evolução do grupo. Maia (2008), encontrou
288 em *Loricariichthys anus* um polimorfismo estrutural de tamanho, com um
289 cromossomo acrocêntrico maior e seu homólogo menor, sugerindo que uma deleção
290 teria ocasionado esta variação.

291 Quanto ao mapeamento de genes ribossomais em Loricariinae,
292 Kavalco *et al.* (2004, 2005) realizaram a primeira localização de genes de DNAr 18S
293 e 5S em *Harttia loricariformes*, em condição sintênica do no par 25 da espécie; e,
294 posteriormente, Centofante *et al.* (2006) também encontraram sintenia dos genes
295 ribossomais no par 23 em *Harttia carvalhoi* (tabela 2). A distribuição dos sítios de
296 DNAr 18S na subfamília Loricariinae é simples na maioria das espécies analisadas,
297 podendo ser localizado preferencialmente na região terminal ou intersticial, enquanto
298 que o gene de DNAr 5S pode ser evidenciado em diversos pares de cromossomos
299 de algumas espécies como em *Sturisoma barbatum* (TAKAGUI *et al.*, 2020),
300 *Rineloricaria capitonía*, *R. stellata*, *R. pentamaculta* (PRIMO *et al.*, 2017, 2018) e *R.*
301 *latirostris* (PRIMO *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018).

302 Recentemente, os trabalhos de Takagui *et al.* (2014, 2020)
303 trouxeram novos dados que contribuem para o entendimento da diversificação
304 cromossômica no gênero *Loricariichthys*. Nestes dois trabalhos, os autores citados
305 acima analisaram exemplares de *Loricariichthys anus* e *Loricariichthys platymetopon*
306 de diferentes bacias hidrográficas e as duas espécies mantiveram um $2n=54$ e
307 fórmulas cariotípicas distintas, com a heterocromatina presente em regiões
308 pericentroméricas associadas com as RONs. Além disso, Takagui *et al.* (2014, 2020)

309 ainda trazem os primeiros dados relacionados a mapeamento de genes ribossomais
310 em *L. anus* e *L. platymetopon* (tabela 2). Nas duas populações de *Loricariichthys*
311 *platymetopon* da bacia do rio Paraná, Takagui *et al.* (2014) evidenciou o DNAr 18S
312 em apenas um par de cromossomo, estando na região terminal do braço curto do
313 par 14 subtelocêntrico. Este mesmo par de cromossomo foi encontrado na
314 população de *L. platymetopon* proveniente da bacia do rio Paraguai. Nesta espécie,
315 Takagui *et al.* (2020) evidencia o primeiro relato de DNAr 5S para os espécimes já
316 analisados, onde os genes de DNAr 18S e 5S exibiram uma condição de sintenia no
317 mesmo par 14, mostrando que este possa ser um par marcador para esta espécie.

318 **Tabela 2** – Dados citogenéticos disponíveis para os peixes neotropicais de água doce da subfamília Loricariinae. Legenda: **2n**= número diplóide;
 319 **m**= metacêntrico; **sm**= submetacêntrico; **st**= subtlocêntrico; **a**= acrocêntrico; **NORs**= regiões organizadoras nucleolares; **rDNA**= DNA
 320 ribossomal; **Ref.**= Referências; ♀= Feminino; ♂= Masculino; **T**= Posição terminal; **IN**= posição intersticial.

<i>ESPÉCIES</i>	<i>LOCALIDADE</i>	<i>2n</i>	<i>FÓRMULA CARIOTÍPICA</i>	<i>NORs/DNAr 18S</i>	<i>DNAr 5S</i>	<i>Ref.</i>
Tribo Harttiini						
<i>Harttia loricariformes</i>	Córrego Grande (bacia do rio Paraná)	56	16m+22sm+10st+8a	par 25(IN)	par 25 (T)	1;2
<i>Harttia carvalhoi</i>	Rio Paraíba do Sul (bacia Atlântico Sul)	52♀ 53♂	18m+18sm+8st+8a 17m+18sm+8st+10a	par 23 (IN)	par 23 (T)	3;2;4
<i>Harttia longipinna</i>	Rio São Francisco (bacia São Francisco)	58	16m + 12sm + 16st + 14a	par 23 (IN)	par 11 (T)	2;5
<i>Harttia torrenticola</i>	Córrego Araras (bacia do rio Paraná)	56	16m + 10sm + 16s t+ 14a	par 22 (IN)	par 3 (T)	2;4
<i>Harttia punctata</i>	Rio Itiquira (bacia do rio Amazonas)	58♀ 57♂	16m + 20sm + 12st + 10a 16m + 21sm + 12st + 8a	par 26 (IN)	Cromossomo Y (T)1 cromossomo 25 (T)	2;6
<i>Harttia gracillis</i>	Córrego Machadinho (bacia do rio Paraná)	58	20m + 22sm + 8st + 8a	par 26 (IN)	par 2 (T)	2;5
<i>Harttia kronei</i>	Rio Açungui (bacia Atlântico Sul)	58	14m + 20sm + 14st + 10a	par 2 (IN)	par 9 (IN)	2;4
Tribo Loricariini						
Farlowellina subtribe						
<i>Farlowella amazonum</i>	Rio Iguatemi (bacia do rio Paraná)	58	6m + 38sm + 8st + 6a	par 27 (T)		7
<i>Farlowella cf. amazonum</i>	Rio Negro (bacia do rio Amazonas)	58	14m + 30sm + 14st	par 1 (T)	par 20 (T)	8
<i>Farlowella schreitmuelleri</i>	Córrego Jundiá (bacia do rio Amazonas)	58	10m + 30sm + 14st + 4a	par 28 (T)	pares 16, 26 (T)	8
<i>Sturisoma nigrirostrum</i>	Rio Araguaia (bacia do rio Amazonas)	74	10m + 18sm + 36st-a	par 24 (T)		9
<i>Sturisoma barbatum</i>	Rio Miranda (bacia do rio Paraguai)	66	20m + 18sm + 16st + 12a	par 28 (T)	pares 20 (T), 23 (IN)	26
Loricariina subtribe						
<i>Loricariichthys anus</i>	Lago Itapeva (bacia Atlântico Sul)	54	10m+16sm+28a	Par 21 (IN)		10
	Rio Capivara (bacia Atlântico Sul)	54	10m+18sm+26a	Par 20 (IN)		10
	Córrego Chimiray (Bacia do rio Uruguai)	54	10m+18sm+26a	Par 20 (IN)		10
	Rio Iguaçu (Bacia do rio Paraná)	54	14m + 14sm + 26a	Par 19 (IN)	Par 15 (IN)	26
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	Bacia baixa do rio Paraná	54♂	6m + 20sm + 4st + 24a			11
	ZZ/ZW	54♀	7m + 20sm + 4st + 23a			11
	Rio Jacutinga (Bacia do rio Paraná)	54	10m+16sm+28a	Par 14 (T)		10
	Rio Paranapanema (Bacia do rio Paraná)	54	10m+16sm+28a	Par 14 (T)		10
	Rio Miranda (Bacia do rio Paraguai)	54	10m + 16sm + 28a	Par 14 (T)	Pares 9 e 14 (In)	26

<i>Loricariichthys maculata</i>	Bacia baixa do rio Paraná	56	22m-sm + 34 st-a			12
<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i>	Córrego São Francisco (Bacia do rio Amazonas)	46	42m/sm + 4st/a			12
	Córrego Iquiri (Bacia do rio Amazonas)	58	28m/sm + 30st/a			12
<i>Spatuloricaria</i> sp.	Rio Xingu (Bacia do rio Amazonas)	66	8m+14sm+12st+32a	Par 8 (T)		13
<i>Loricaria cataphracta</i>	Córrego da Onça (Bacia do rio Paraguai)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Par 12 (IN)		14
	Córrego da Onça (Bacia do rio Paraguai)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Par 8 (IN)		14
	Córrego da Onça (Bacia do rio Paraguai)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Pares 8, 12 (IN)		14
	Córrego da Onça (Bacia do rio Paraguai)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Pares 9, 12 (IN)		14
	Córrego da Onça (Bacia do rio Paraguai)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Pares 12, 13 (IN)		14
<i>Loricaria</i> cf. <i>cataphracta</i>	Iguaçu rio (Bacia do rio Paraná)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Par 8 (T)	Par 25 (T)	26
<i>Loricaria carinata</i>	Bacia baixa do rio Paraná	64	12m-sm + 52 st-a			12
<i>Loricaria simillima</i>	Bacia baixa do rio Paraná	64	12m + 12sm + 40st-a	Par 8 (IN)		15
	Rio Miranda (Bacia do rio Paraguai)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Par 8 (T)		26
<i>Loricaria</i> sp.	Bacia alta do rio Paraná	64	10m + 6sm + 4st + 44a (0 – 5 cromossomos B)			16
<i>Proloricaria prolixa</i> (citado como <i>Loricaria prolixa</i>)	Bacia alta do rio Paraná	62	20m + 4sm + 38a			16
	Córrego Três bocas (Bacia do rio Paraná)	62	20m + 6sm + 36a	Par 20 (T)	Par 24 (IN)	26
<i>Pyxiloricaria menezesi</i>	Rio Miranda (Bacia do rio Paraguai)	68	8m + 6sm + 2st + 52a	Par 30 (T)	Par 20 (IN)	26
<i>Rineloricaria parva</i>	Rio Miranda (Bacia do rio Paraguai)	60	6m-sm + 54 st-a	Par 1 (T)	Par 5 (T)	26
<i>Rineloricaria reisi</i>	Córrego Chimiray (Bacia do rio Uruguai)	60	60 st-a	Par 1 (T)	Pares 6 and 18 (T)	26
<i>Rineloricaria capitionia</i>	Rio Uruguai (Bacia do rio Uruguai)	64	4m+ 2sm + 58 st-a	Par 3 (T)	Pares:16,17,18,19 (T)	17;18
<i>Rineloricaria stellata</i>	Rio Uruguai (Bacia do rio Uruguai)	54	6m + 14sm + 34st-a	Pares4,6,9,10(T)	Pares:3,11(IN); 8,13,15 (T)	17;18
<i>Rineloricaria strigilata</i>	Forquetinha rio (bacia Atlântico Sul)	68	6m-sm + 62 st-a	Par 9 (T)		19
<i>Rineloricaria cadeae</i>	Lago Guaíba (bacia Atlântico Sul)	64	2m-sm + 62 st-a	Par 9 (T)		19
<i>Rineloricaria</i> aff. <i>cadeae</i>	Lago Guaíba (bacia Atlântico Sul)	66	2m-sm + 64st-a	Par 2		20
<i>Rineloricaria kronei</i>	Rio Itapocu (bacia Atlântico Sul)	64	6m-sm + 58st-a	Par 5		20
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	Rios Barra Grande e Juruba (Bacia do rio Paraná)	56	4m + 10sm + 42st-a	Par 3 (T)	Pares:8,9,10,15,16(T)	17;18
	Rio Barra Grande (Bacia do rio Paraná)	54	6m + 4sm + 44st-a	Par 4 (T)	Pares:7,8,10,21 (T)	17;18
	Rios Keller e Tauá (Bacia do rio Paraná)	56	8m-sm+48st-a	Par 5 (T)		21
	Rio Tatupeba (Bacia do rio Paraná)	56	8m-sm+48st-a	Par 5, 8 (T)		21
	Rio Jacucaca (Bacia do rio Paraná)	56	8m-sm + 48 st-a	Par 5 (T)		19
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Laranjinha (Bacia do rio Paraná)	46	10m + 4sm + 32st-a	Par 2 (IN)	Pares: 3 (IN); 10,11,21,22,23 (T)	17
	Rio Barra Grande (Bacia do rio Paraná)	46	10m + 4sm + 32st-a	Par 2 (IN)	Pares:3(IN),10,11, 21	17

				(T)			
	Rio Pedras (Bacia do rio Paraná)	46	10m + 4sm + 32st-a	Par 2 (IN)	Par: 3 (IN); 10,11,22,23 (T)	22	
	Rio Piumhi (Bacia do rio Paraná)	48	6m + 6sm + 36st-a	Par 7 (T)	Pares 9 e 16 (T)	22	
	Córrego Três bocas (Bacia do rio Paraná)	43	17m-sm + 26st-a			23	
	Córrego Três bocas (Bacia do rio Paraná)	44	16m-sm + 28st-a			23	
	Córrego Três bocas (Bacia do rio Paraná)	46	14m-sm + 32st-a			23	
	Córrego Três bocas (Bacia do rio Paraná)	47	13m-sm + 34st-a			23	
	Córrego Três bocas (Bacia do rio Paraná)	48	12m-sm + 36st-a			23	
	Rio Passa Cinco (Bacia do rio Paraná)	44	16m-sm + 28st-a			23	
	Rio Passa Cinco (Bacia do rio Paraná)	45	15m-sm + 30st-a			23	
	Rio Passa Cinco (Bacia do rio Paraná)	46	14m-sm + 32st-a			23	
	Rio Passa Cinco (Bacia do rio Paraná)	47	13m-sm + 34st-a			23	
	Rio Mogi-Guaçu (Bacia do rio Paraná)	36	24m-sm + 12st-a			23	
	Rio Mogi-Guaçu (Bacia do rio Paraná)	37	23m-sm + 14st-a			23	
	Rio Mogi-Guaçu (Bacia do rio Paraná)	38	22m-sm + 16st-a			23	
	Rio Mogi-Guaçu (Bacia do rio Paraná)	39	21m-sm + 18st-a			23	
	Rio Mogi-Guaçu (Bacia do rio Paraná)	40	20m-sm + 20st-a			23	
<i>Rineloricaria lima</i>	Rio Açungui (Bacia Atlântico Sul)	66	$1m^{1-3-5} + 1st^1 + 2st + 60a$	1 Par/st (T)	$1m^3 + 1st^1 + 6a$ (P)	24	
	Areia/Açungui rios (Bacia Atlântico Sul)	66	$2m^1 + 1m^3 + 1m^5 + 2st + 60a$	1 Par/st (T)	$1m^3 + 8a$ (P)	24	
	Rios Areia / Açungui (Bacia Atlântico Sul)	68	$1m^{3-5} + 2sm^1 + 2st + 62a$	1 Par/st (T)	$1m^3 + 2sm^1 + 4a$ (P)	24	
	Rios Areia / Açungui (Bacia Atlântico Sul)	68	$2m^2 + 2st + 64a$	1 Par/st (T)	10a (P)	24	
	Rios Areia / Açungui (Bacia Atlântico Sul)	69	$1m^5 + 1sm^1 + 2st + 65a$	1 Par/st (T)	$1sm^1 + 8a$ (P)	24	
	Rios Areia / Açungui (Bacia Atlântico Sul)	69	$1m^1 + 2st + 66a$	1 Par/st (T)	10a (P)	24	
	Rios Areia / Açungui (Bacia Atlântico Sul)	70	$2m^4 + 2st + 66a$	1 Par/st (T)	$2m^4 + 6a$ (P)	24	
	Rios Areia / Açungui (Bacia Atlântico Sul)	70	$2st + 68a$	1 Par/st (T)	10a (P)	24	
	<i>Rineloricaria lanceolata</i>	Córrego da Onça (Bacia do rio Paraguai)	45	$4m + 2sm + 2st + 37a$	Par 13 (IN)		26
		Córrego da Onça (Bacia do rio Paraguai)	46	$4m + 2sm + 2st + 38a$	Pares 4 (T), 13 (IN)		25
Córrego da Onça (Bacia do rio Paraguai)		47	$4m + 1sm + 2st + 40a$	Pares 4, 13 (IN)		25	
Córrego da Onça (Bacia do rio Paraguai)		47	$3m + 1sm + 2st + 41a$	Pares 4 (T), 13 (IN)		25	
Córrego da Onça (Bacia do rio Paraguai)		48	$3m + 2st + 43a$	Par 13 (IN)		25	

Referências: 1- Kavalco *et al.* (2005); 2- Blanco *et al.* (2017); 3 Centofante *et al.* (2006); 4- Blanco *et al.* (2013); 5- Blanco *et al.* (2012); 6- Blanco *et al.* (2014); 7- Fernandes *et al.* (2012); 8- Marajó *et al.* (2018); 9- Artoni e Bertollo (2001); 10- Takagui *et al.* (2014); 11- Scavone e Júlio Jr (1995); 12- Fenocchio *et al.* (2003); 13- Ferreira *et al.* (2014); 14- Porto *et al.* (2014); 15- Benitez *et al.* (2016); 16- Scavone e Júlio Jr (1994); 17- Primo *et al.* (2017); 18- Primo *et al.* (2018); 19- Maia *et al.* (2010); 20- Alves *et al.* (2005); 21- Porto *et al.* (2011); 22- Glugoski *et al.* (2018); 23- Giuliano-Cactano (1998); 24- Rosa *et al.* (2011); 25- Porto *et al.* (2014); 26- Takagui *et al.* (2020).

321 **3. OBJETIVOS**

322 **GERAL**

323 O presente trabalho teve como objetivo analisar
324 citogeneticamente três espécies do gênero *Hypostomus* e uma espécie do
325 gênero *Loricariichthys* coletadas em diferentes localidades da Bacia do Alto Rio
326 Paraná; afim de investigar os mecanismos envolvidos na diversificação
327 cariotípica da família Loricariidae.

328

329 **ESPECÍFICOS**

330

- 331 • Determinar o cariótipo das diferentes espécies utilizadas no estudo;
- 332 • Analisar a distribuição da heterocromatina, das regiões organizadoras de
- 333 nucléolo e dos sítios cromossômicos ricos em bases GC e AT;
- 334 • Identificar os sítios de DNAr 18S e 5S por meio da Hibridização *in situ*
- 335 por Fluorescência;
- 336 • Inferir possíveis eventos relacionados à evolução cariopítica da família
- 337 Loricariidae.

338 **4. METODOLOGIAS**339 **Espécies estudadas e locais de coleta**

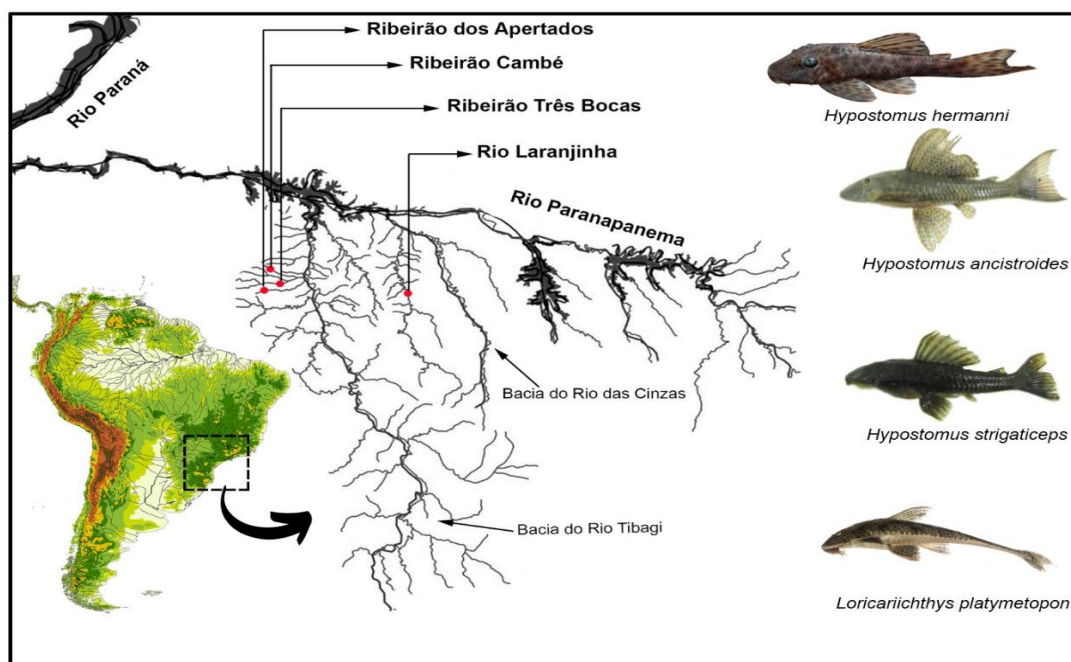
340

341

342 No presente estudo foram analisadas três espécies de
 343 *Hypostomus*: *H. ancistroides* provenientes do Ribeirão Cambé e do Ribeirão
 344 dos Apertados; *H. hermanni* coletados no Ribeirão Três Bocas; e *H.*
 345 *strigaticeps* no rio Laranjinha; e uma espécie de *Loricariichthys platymetopon*,
 346 coletada no Ribeirão Cambé, Lago Igapó 3, Londrina-PR. As informações
 347 sobre pontos de coletas, coordenadas geográficas e número amostral
 348 encontram-se na tabela 3. Os exemplares estudados foram identificados
 349 através de critérios morfológicos pelos Profs.: Dr. José Luis Olivan Birindelli e
 Dr. Fernando Camargo Jerep.

350

351 Os exemplares foram coletados com autorização do Instituto
 352 Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) número 11399-1.
 353 Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética
 354 com pesquisas com uso de animais da Universidade Estadual de Londrina
 355 (Protocolo: 60/2017). Posteriormente, os peixes foram levados para a
 356 Universidade Estadual de Londrina e mantidos em aquários aerados. Seguindo
 357 todos os protocolos, os peixes foram eutanasiados, processados, fixados em
 formol 24hs, lavados em água corrente e mantidos em álcool 70%.



358

359

Figura 2 – Mapa evidenciando os pontos de coleta dos exemplares analisados no estudo.

360 **Tabela 3** - Informações sobre as espécies analisadas, número amostral, locais
 361 de coletas e coordenadas.

Espécies	Número amostral	Locais de coletas	Coordenadas geográficas
<i>Hypostomus ancistroides</i>	43 (9M, 22F, 12 NI)	Ribeirão Cambé (Bacia do rio Paraná)	23°19'09.38''S 51°11'44.72''W
<i>Hypostomus ancistroides</i>	10 (1 M, 2 F, 7 NI)	Ribeirão Três Bocas (Bacia do rio Paraná)	23°24'37''S 51°06'3''W
<i>Hypostomus hermanni</i>	12 (7 M, 5 F)	Ribeirão Três Bocas (Bacia do rio Paraná)	23°23'06.6''S 51°04'35.8''W
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	28 (18 M, 10 F)	Rio Laranjinha (Bacia do rio Paraná)	23°24'52''S 50°27'09''W
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	34 (15M, 19 F)	Ribeirão Cambé (Bacia do rio Tibagi)	23°19'04''S 51°11'11''W

Legenda: M - machos; F - fêmeas; NI - não identificados.

362 **Obtenção de cromossomos mitóticos**

363 Para se obter um maior número de células em divisão, em
 364 todos os exemplares foi injetada uma solução de Lisado bacteriano (Bronko-
 365 Vaxon diluído em água estilada) de acordo com o protocolo de Molina *et. al.*
 366 (2010). Este procedimento de estimulação ocorreu por um período de 48 horas.
 367 Decorrido este tempo, para a obtenção dos cromossomos mitóticos, foi
 368 utilizado o protocolo descrito por Bertollo *et al.* (1978) que consiste na injeção
 369 na região intra-muscular de uma solução de colchicina (0,0125%) na proporção
 370 de 1mL para cada 100g de peso do animal *in vivo*; em seguida os peixes foram
 371 mantidos em aquários bem aerados por um período de 30 minutos. Após esse
 372 período, os exemplares foram anestesiados no meio aquático com óleo de
 373 cravo (GRIFFITHS, 2000) e eutanasiados.

374 Os seguintes procedimentos consistiram na retirada dos
 375 tecidos renais, hipotonização das células com KCl (0,075M); dissociação
 376 desses tecidos, seguida de sucessivas lavagens com fixador Carnoy (álcool
 377 metílico 3: ácido acético 1), até a obtenção de uma solução celular homogênea
 378 que foi transferida para microtubos de 1,5 mL e armazenados em freezer a -
 379 20°C.

380 **Preparo das lâminas e classificação cromossômica**

381 Para a análise cromossômica foram colocadas de duas a três
382 gotas da suspensão celular sobre uma lâmina de vidro, previamente
383 mergulhada em água a 42°C, deixadas secando ao ar e em seguida coradas
384 com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato (pH=6,8) por 8 minutos.

385 Posteriormente, os cromossomos foram analisados em
386 microscópio óptico de campo claro (MOTIC BA300), no qual foi realizada a
387 contagem de 30 metáfases por lâminas para determinar o número diploide. As
388 imagens foram capturadas por meio do software Motic Images Plus 2.0 e, para
389 a montagem dos cariótipos, a classificação dos cromossomos teve por base a
390 relação entre os braços (RB) maior/menor proposta por Levan *et al.* (1964). A
391 medição dos cromossomos foi realizada pelo software Easyldio e os cariótipos
392 foram montados pelo programa Adobe Photoshop CS6.

393

394 **Detecção da Heterocromatina Constitutiva – Bandamento C**

395 Para evidenciar o padrão de distribuição de heterocromatina
396 constitutiva foi utilizada a metodologia descrita por Sumner (1972), que
397 consiste em três tratamentos: tratamento ácido (com HCL 0,2N durante 15
398 minutos em temperatura ambiente); tratamento básico (com solução de
399 Hidróxido de Bário (Ba(OH)₂25%, recém preparada, a 60°C, durante 1 minuto);
400 e um tratamento salino (com citrato de sódio 2xSSC de 30 minutos a 1 hora em
401 60°C). Por fim, as lâminas foram coradas com fluorocromo Iodeto de Propidium
402 de acordo com Lui *et al.* (2012).

403

404 **Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo – Ag-RONs**

405 Esta técnica permite identificar as RONs. Para isto, foi utilizado
406 o protocolo de Howell e Black (1980), que consiste em pingar 2 gotas de
407 solução de gelatina a 2% (1g gelatina em 50ml de H₂O destilada acrescida de
408 ácido fórmico na proporção de 1mL para cada 100mL de solução) e 4 gotas de
409 solução aquosa de nitrato de prata a 50% (0,5g AgNO₃ em 1ml de H₂O
410 destilada) sobre uma lâmina contendo preparação cromossômica e cobrindo-a
411 com uma lamínula limpa. Após, a lâmina foi incubada em banho-maria a 60°C

412 por cerca de 1 a 5 minutos, sobre um suporte, até os cromossomos assumirem
413 uma tonalidade amarelada e as RONS e os nucléolos uma coloração preta ou
414 marrom.

415

416 **Coloração com fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4',6-diamidino-2-** 417 **phenylindole (DAPI)**

418 Para analisar a composição da heterocromatina constitutiva,
419 foram utilizados os fluorocromos CMA₃ e DAPI, de acordo com o protocolo
420 descrito por Schweizer (1980), com modificações, que consiste em acrescentar
421 40 µl de solução CMA₃ 0,5mg/ml sobre a lâmina previamente preparada,
422 cobrindo-a com uma lamínula e deixando agir de 60 a 90 minutos no escuro.
423 Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente de modo que as
424 lamínulas fossem removidas e deixadas secar ao ar. Após a secagem, foram
425 acrescentados 40 µl de solução DAPI (2 µg/ml) sobre cada lâmina, cobertas
426 com uma lamínula, deixando por 15-30 minutos no escuro. Em sequência, após
427 a lavagem e secagem foi acrescentado um meio de montagem
428 (Glicerol/McIlvaine) nas lâminas, às quais foram cobertas com lamínulas
429 e guardadas em um período de 3 à 15 dias para análises posteriores, em
430 microscópio com epifluorescência.

431

432 **Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)**

433 Para as análises de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi
434 utilizado o protocolo de Pinkel *et al.* (1986). As sondas de DNAr 18S e DNAr 5S
435 de *Hypostomus ancistroides* foram obtidas e marcadas por PCR, sendo DNAr
436 18S marcada com Digoxigenin-11-dUTP e DNAr 5S por Biotin-16-dUTP. Já as
437 sondas de *Loricariichythus platymetopon* foram obtidas por PCR, sendo o DNAr
438 18S marcado com DIG-Nick Translation Mix e o DNAr 5S marcado por Biotin-
439 16-dUTP.

440 Inicialmente, as lâminas foram desidratadas em etanol 70% e
441 100%, 5 minutos cada e deixadas para secar ao ar. Em seguida, foram tratadas
442 com 90µL de RNase (0,4% RNase/2xSSC) por uma hora em câmara úmida a
443 37°C; após esse período foram lavadas em 2xSSC por 10 minutos à

444 temperatura ambiente no agitador. Depois foram fixadas em paraformaldeído
445 4% e lavadas em 2xSSC e, posteriormente, desidratadas em série alcoólica
446 70% e 100%; e deixadas em temperatura ambiente para secagem. Após a
447 secagem, as lâminas foram desnaturadas em formamida 70% a 70°C por 4
448 minutos; desidratadas novamente em série de etanol 70% e 100% gelado por 5
449 minutos e deixadas ao ar para secar. O mix de hibridização consistiu em 20µl
450 formamida; 7µl sulfato dextrano (PEG); 4µl 20xSSC; 1µl SDS; 4µl sonda DNAr
451 18S e 4µl sonda DNAr 5S; por lâmina. A hibridização foi feita em câmara úmida
452 a 37 °C, overnight. No outro dia, as lâminas passaram por duas lavagens em
453 2xSSC a 45°C por 5 minutos cada e uma vez em 4xSSC à 45°C por 5 minutos.
454 Os sinais fluorescentes foram detectados por anti-digoxigenin-rhodamina
455 (Roche) e biotinylated anti-avidin (Sigma-Aldrich). Por fim, após a secagem das
456 lâminas, os cromossomos foram contra corados com o fluorocromo 4',6-
457 diamino-2-phenylindole (DAPI, 2µg/ml). Finalmente, as lâminas foram
458 analisadas em um microscópio de epifluorescência (Leica DM2000), equipado
459 com uma câmera digital. As imagens das metáfases foram capturadas usando
460 o Leica Application Suite versão 3.1.0. (Leica Microsystems).
461

462 **5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

- 463 ABELL, R.; THIEME, M. L.; REVENGA, C.; BRYER, M.; KOTTELAT, M.;
464 BOGUTSKAYA, N.; COAD B.; MANDRAK, N.; BALDERAS, S. C.; BUSSING,
465 W.; STIASSNY, M. L. J.; SKELTON, P.; ALLEN, G. R.; UNMACK, P.; NASEKA,
466 A.; Ng, R.; SINDORF, N.; ROBERTSON, J.; ARMIJO, E.; HIGGINS, J. V.;
467 HEIBEL, T. J.; WIKRAMANAYAKE, E.; OLSON, D.; LOPEZ, H. L.; REIS, R. E.;
468 LUNDBERG, J. G.; PEREZ, M. H. S. & PETRY, P. 2008. Freshwater
469 ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater
470 biodiversity conservation. **Bioscience**, 58(5): 403-414.
- 471 AGENCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA), 2016. **Plano Integrado de**
472 **Recursos Hídricos da Unidade de Gestão de Recursos Hídricos**
473 **Parapanema**. Agencia Nacional das Águas – Brasília.
- 474 AGOSTINHO, A. A *et al.* **Peixes migratórios da bacia do alto rio Paraná,**
475 **Brasil**. 2018.
- 476 AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C. Dams and the fish fauna
477 of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and
478 fisheries. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.1119–1132. 2008.
- 479 AGOSTINHO, A. A.; MARQUES, E. E.; AGOSTINHO, C. S.; ALMEIDA, D. A.;
480 OLIVEIRA, R. J.; RODRIGUES, J. B. M. Fish ladder: migration on one way
481 routes? **Neotropical Ichthyology**, v.5, p.121-130. 2007b.
- 482 AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; PETRY, A. C.; GOMES, L. C.; JÚLIO-
483 JR, H. F. Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries,
484 management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health & Management**,
485 v.10, n.2, p.174–186. 2007a.
- 486 AGOSTINHO, Ângelo A.; THOMAZ, SIDINEI M.; GOMES, LUIZ C.
487 Conservação da biodiversidade em águas continentais do
488 Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 70-78, 2005.
- 489 AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SUZUKI, H. I.; JÚLIO-JR, H. F. Migratory
490 fishes of the Upper Rio Paraná Basin, Brazil, p. 19-98. In: CAROLSFELD, J.;
491 HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds.). **Migratory fishes of South**
492 **America: biology, fisheries and conservation status**. World Fisheries Trust,
493 British Columbia, 2003.
- 494 AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; FERNANDES, D. R.; SUZUKI, H. I.
495 Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. **River Research and**
496 **Applications**, v.18, p.299-306. 2002.
- 497 AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO-JR, H. F. Peixes da bacia do alto rio Paraná, p.
498 374-400. In: LOWE-MCCONNELL, R. H. (Ed.) **Estudos ecológicos de**
499 **comunidades de peixes tropicais**. Edusp, São Paulo. 1999.

- 500 AGOSTINHO, A. A.; VAZZOLER, A. E. A. M.; THOMAZ, S. M. The high River
501 Paraná Basin: limnological and ichthyological aspects, p.59-103.In: TUNDISI, J.
502 G.; BICUDO, C. E. M.; MATSUMURA-TUNDISI, T. (Eds.). **Limnology in**
503 **Brazil**. ABC/SBL, Rio de Janeiro, 1995.
- 504 AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO-JR, H. F.; BORGHEITI, J. R. Considerações sobre
505 os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação.
506 Um estudo de caso: Reservatório de Itaipu. **Revista Unimar**, v.14, p.89-107.
507 1992.
- 508 ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical Biogeography of Neotropical**
509 **Freshwater Fishes**. University of California Press: Berkeley. CA, USA, p. 388,
510 2011.
- 511 ALVES, A. L.; BORBA, R. S.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.;
512 FORESTI, F. (2012). Karyotypic diversity and evolutionary trends in the
513 Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes,
514 Loricariidae). **Comparative Cytogenetics** 6(4): 443–452. doi:
515 10.3897/CompCytogen.v6i4.4028.
- 516 ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F.
517 Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes:
518 Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical
519 fish species. **Genetica**, 128: 1-9. 2006.
- 520 ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of
521 eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae
522 (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, 124:127-136. 2005.
- 523 ANTONELLI, A.; ZIZKA, A.; CARVALHO, F. A.; SCHARN, R.; BACON, C. D.;
524 SILVESTRO, D.; CONDAMINE, F. L. A Amazônia é a principal fonte de
525 biodiversidade Neotropical. **Proceedings of the National Academy of**
526 **Sciences**, 115 (23), 6034-6039, 2018.
- 527 ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of
528 Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**. 134: 201-210. 2001.
- 529 ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C (1999). Nature and distribution of
530 constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae).
531 **Genetica** 106:209–214
- 532 ARTONI, R. F.; VENERE, P. C.; BERTOLLO, L. A. C. A heteromorphic ZZ/ZW
533 sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**,
534 63: 421–425. 1998.
- 535 ARTONI, R. F. & BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies on Hypostominae
536 (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the
537 genus *Hypostomus*. **Caryologia**, 49: 81-90. 1996

- 538 BAUMGAERTNER, L.; PAIZ, L. M.; ZAWADZKI, C. H.; MARGARIDO, V. P.;
539 PORTELA CASTRO, A. L. D. B. (2014). Heterochromatin polymorphism and
540 physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in four populations of
541 *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1907) from the Paraná River Basin, Brazil:
542 evolutionary and environmental correlation. **Zebrafish**, 11(5), 479-487.
- 543 BECKER, Q. M. C.; CASTRO, R. J.; SILVA, A. M, VIZZOTTO, P. C.
544 Cytogenetic characterization of two species of *Hypostomus* (Siluriformes,
545 Loricariidae) from tributaries of the Vermelho river, Upper Paraguay river basin.
546 **Biodiversidade**. 2014; 13: 2-13.
- 547 BENITEZ, M. F.; PASTORI, M. C.; GARRIDO, G. G.; TAKAGUI, F. H.;
548 GIULIANO, L.; FENOCCHIO, A. S. First cytogenetic characterization of
549 *Loricaria simillima* (Loricariidae, Siluriformes) from Parana River (Argentina)
550 with emphasis in cytotaxonomy of *Loricaria*. **Caryologia** 2016;70:29–33.
- 551 BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. 1978.
552 Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev.**
553 **Brasil. Genet.**, 1: 103-120.
- 554 BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K.; MEIER, R.;
555 WINKER, K.; DAS, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and
556 conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, 22: 148-155.
- 557 BITENCOURT, J. A.; AFFONSO, P. R. A. M.; GIULIANO-CAETANO, L.;
558 CARNEIRO, P. L. S.; Dias, A. L. (2012). Population divergence and peculiar
559 karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus aff. unae* from
560 northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 11(2), 933-943.
- 561 BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; TRALDI, J. B.; BUENO, V.;
562 MARTINEZ, J. F. *et al.* Karyotype diversity and evolutionary trends in armored
563 catfish species of the genus *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae). **Zebrafish**
564 2017;14:169–176.
- 565 BLANCO, D.R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; ARTONI, R. F.; ALMEIDA, M. C.;
566 TRALDI, J. B. Origin of the X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system of
567 *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting
568 and FISH with ribosomal DNA markers. **Genetica** 2014;142:119–126.
- 569 BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; TRALDI, J. B.; BERTOLLO, L. A. C.;
570 MOREIRA-FILHO, O. The role of the Robertsonian rearrangements in the origin
571 of the XX/XY1Y2 sex chromosome system and in the chromosomal
572 differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). **Rev Fish Biol Fish**
573 2013;23:127–134.
- 574 BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; TRALDI, J. B.; MOREIRA-
575 FILHO, O. Chromosomal characterization of armored catfish *Harttia longipinna*
576 (Siluriformes, Loricariidae): first report of B chromosomes in the genus. **Zool**
577 **Sci** 2012;29:604–609

- 578 BOARETTO, M; JEREP, FC; SHIBATTA, OA & BIRINDELLI, JLO. 2020. Peixes
579 do rio Tibagi. ([https://sites.google.com/site/museudezoologia/projetos/peixes-](https://sites.google.com/site/museudezoologia/projetos/peixes-do-tibagi)
580 [do-tibagi](https://sites.google.com/site/museudezoologia/projetos/peixes-do-tibagi)). Versão eletrônica acessada em 09/03/2022.
- 581 BRANDÃO, K. de OLIVEIRA *et al.* Studies in two allopatric populations of
582 *Hypostomus affinis* (Steindachner, 1877): the role of mapping the ribosomal
583 genes to understand the chromosome evolution of the group. **Comparative**
584 **Cytogenetics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2018.
- 585 BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Manual de identificação de**
586 **peixes do Pantanal Mato-grossense**. 1999.
- 587 BRITTO, S. G. C.; SIROL, R. N.; VIANNA, N. C.; JARDIM, S. M.; SANTOS, J.
588 C.; PELISARI, E. **Peixes do rio Paranapanema**. Duke Energy, São Paulo.
589 2003. 112p.
- 590 BUENO, V. *et al.* Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of
591 *Hypostomus Lacépède* 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary
592 tendencies in the genus. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- 593 BUENO, V. *et al.* Karyotypic diversification in *Hypostomus Lacépède*, 1803
594 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives.
595 **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n. 1, p. 103-112, 2013.
- 596 BUENO, V. *et al.* Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus*
597 *Lacépède*, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the
598 correlation between diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish**
599 **Biology and Fisheries**, v. 22, n. 1, p. 241-250, 2012.
- 600 CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO,
601 A.C.; BENINE, R.C.; DARDIS, G.Z.P.; MELO, A.L.A.; STOPIGLIA, R.; ABREU,
602 T.X.; BOCKMANN, F.A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F.Z.; LIMA, F.C.T.
603 Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste
604 e sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v.3, n.1, p.1-14. 2003.
- 605 CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic
606 characterization and description of a XX/XY1Y2 sex chromosomes system in
607 catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenet Genome Res**
608 2006;112: 320–324.
- 609 CEREALI, S. S. *et al.* Karyotype description of two species of *Hypostomus*
610 (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetics and**
611 **Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 583-591, 2008.
- 612 CORREIA, V. C. S. (2010). **Estudos citogenéticos de seis espécies da**
613 **família Loricariidae (Siluriformes) pertencentes a bacias do rio Paranaíba**
614 **e Tocantins**. Dissertação, Universidade Federal de Uberlândia.
- 615 COVAIN, R. *et al.* Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily
616 Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with

- 617 morphological classification. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 94, p.
618 492-517, 2016.
- 619
620 DELARIVA, R. L.; AGOSTINHO, A. A. Relationship between morphology and
621 diets of six neotropical loricariids. **Journal of Fish Biology**, v. 58, p. 832-847,
622 2001.
- 623 ENDO, K. S. et al. Karyotype description of possible new species of the
624 *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other
625 Hypostominae. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 2, 2012.
- 626 FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; RONCATI, H. A.; MOREIRA-FILHO, O.;
627 BERTOLLO, L. A. C. A cytogenetic survey of the fish fauna from Argentina.
628 **Caryologia** 2003;56:197–204.
- 629 FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C. e LÓPEZ, P. (1990). Análise preliminar em
630 Siluriformes do baixo Paraná (Misiones, Argentina). I. *Bunocephalus cf. larai* e
631 *Loricariichthys sp.* In: **III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de**
632 **Peixes Neotropicais**. Botucatu, SP, pp. 25.
- 633 FERNANDES, C. A., DAMÁSIO, J. F.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic
634 studies in species of family Loricariidae (Osteichthyes, Siluriformes) from
635 Iguatemi River basin, Brazil. First cytogenetic report in *Farlowella amazonum*
636 (Gunther, 1864). **Caryologia** 2012;65:276–280.
- 637 FERRARIS, C. J. (2003). Subfamily Loricariinae (Armored catfishes). In: Check
638 list of the freshwater fishes of South and Central America (REIS, R. E.;
639 KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J, orgs). **EDIPUCRS**, p.330-350, Porto
640 Alegre, RS.
- 641 FERREIRA, R. O.; PEREIRA, A. L.; NAKAMICHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.;
642 SOUSA, L. M.; NORONHA, R. C. R. Caracterização citogenética de uma
643 espécie de *Spatuloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Xingu, (Pará,
644 Amazônia, Brasil) [Cytogenetic characterization of one *Spatuloricaria* specie
645 (Siluriformes, Loricariidae) from Xingú river (Pará, Amazônia, Brazil)]. **Biota**
646 **Amazonica** 2014;4:30–36.
- 647 FRICKE, R.; ESCHMEYER, WN & VAN DER LAAN, R. (eds) 2022.
648 **CATÁLOGO DE PEIXES DE ESCHMEYER: GÊNEROS, ESPÉCIES,**
649 **REFERÊNCIAS**.[http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/cc](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/ccatalo/fishcatmain.asp)
650 [atalo/fishcatmain.asp](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/ccatalo/fishcatmain.asp)). Versão eletrônica acessada em 24/02/2022.
- 651 GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em**
652 **populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae)**. Dissertação
653 de mestrado (Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São
654 Carlos. 78f. 1998.
- 655 GLUGOSKI, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.
656 R.; NOGAROTO, V. Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an
657 interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in

- 658 armored catfish. *Gene* 2018;650:49–54.ribosomal DNA markers. **Genetica**
659 2014;142:119–126. 26.
- 660 GRIFFITHS, S. P (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for
661 sampling intertidal rockpool fishes. **J Fish Biol** 57:1453–1464.
- 662 HAHN, N. S.; FUGI, R.; ANDRIAN, I. F. Trophic ecology of the fish
663 assemblages. *In*: THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (eds.).
664 **The Upper Paraná river and its floodplain: physical aspects, ecology and**
665 **conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, 2004. p. 247-269.
- 666 HOFFMANN, A. C.; ORSI, M. L.; SHIBATTA, O. A. Fish diversity in the UHE
667 Escola Engenharia Mackenzie (Cativara) reservoir, Paranapanema River,
668 upper Rio Paraná basin, Brazil, and the importance of large tributaries in its
669 maintenance. **Iheringia. Série Zoologia**, v.95, n.3, p.319-325. 2005.
- 670 HOORN, C.; WESSELINGH, F. P.; TER STEEGE, H.; BERMUDEZ, M. A.;
671 MORA, A.; SEVINK, J.; ANTONELLI, A. (2010). Amazônia ao longo do tempo:
672 soerguimento andino, mudanças climáticas, evolução da paisagem e
673 biodiversidade. **Ciência**, 330 (6006), 927-931.
- 674 HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus
675 organizer regions with a protective colloidal developer: as 1-step method.
676 **Experientia** 36: 1014-1015, 1980.
- 677 JARDULI, L. R., GARCIA, D. A. Z., VIDOTTO-MAGNONI, A. P., CASIMIRO, A.
678 C. R., VIANNA, N. C., ALMEIDA, F. S., JEREP, F. C., ORSI, M. L. Fish fauna
679 from the Paranapanema River basin, Brazil. **Biota Neotropica**. 20(1):
680 e20180707.2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2018-0707>.
- 681 KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O
682 (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes).
683 **Heredity** 94:180–186.
- 684 KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O
685 (2004). Heterochromatin characterization of four fish species of the family
686 Loricariidae (Siluriformes). **Hereditas** 141:237–242.
- 687 KRISTIANSEN, T.; SVENNING, J. C.; PEDERSEN, D.; EISERHARDT, W. L.;
688 GRÁNDEZ, C.; BALSLEV, H. (2011). Local and regional palm (Arecaceae)
689 species richness patterns and their cross-scale determinants in the western
690 Amazon. **Journal of Ecology**, 99(4), 1001-1015.
- 691 LARA KAMEI, M. C. S. *et al.* Chromosomal diversity of three species of
692 *Hypostomus Lacépède*, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from the Paraná River
693 Basin, Brazil: a species complex in *Hypostomus ancistroides* reinforced by a
694 ZZ/ZW sex chromosome system. **Zebrafish**, v. 14, n. 4, p. 357-363, 2017.
- 695 LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric
696 position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

- 697 LORSCHIEDER, Carla Andreia *et al.* Comparative cytogenetics among three
698 sympatric *Hypostomus* species (Siluriformes: Loricariidae): an evolutionary
699 analysis in a high endemic region. **Brazilian Archives of Biology and**
700 **Technology**, v. 61, 2018.
- 701 LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes**
702 **Tropicais**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1999. 534 p.
- 703 LUI, R. L.; BLANCO, D. R.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V. P.
704 Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding
705 technique. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, n. 7, p. 433-438, 2012.
- 706 LUJAN, N. K. *et al.* Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored
707 catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae.
708 **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 82, p. 269-288, 2015.
- 709 LUNDBERG, J. G., MARSHALL, L. G., GUERRERO, J., HORTON, B.,
710 MALABARBA, M. C. S. L., & WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish
711 diversification: a history of tropical South American rivers. **Phylogeny and**
712 **classification of Neotropical fishes**, 603, 14-48, 1998.
- 713 MAIA, T. P. A.; GIULIANO-CAETANO, L.; RODRIGUES, M. S.; RUBERT, M.;
714 TAKAGUI, F. H.; DIAS, A. L. Chromosomal banding in three species of the
715 genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). **Ichthyol Res**
716 2010;57:209–213.
- 717 MAIA, T. P. A (2008). **Estudos citogenéticos em peixes da subfamília**
718 **Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae)**. Dissertação de Mestrado.
719 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- 720 MARAJÓ, L.; VIANA, P. F.; FERREIRA, M.; RAPP PY-DANIEL, L. H.;
721 FELDBERG, E. Cytogenetics of two *Farlowella* species (Loricariidae:
722 Loricariinae): implications on the taxonomic status of the species. **Neotrop**
723 **Ichthyol** 2018;16:1–8.
- 724 MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, C. S.; BERTOLLO, L. A. C.;
725 MOREIRA-FILHO, O. 2009. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae*
726 Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**,
727 7: 595-600.
- 728 MARTINEZ, E. R. M. *et al.* Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species
729 (Siluriformes, Loricariidae). **Genetics and molecular biology**, v. 34, n. 4, p.
730 562-568, 2011.
- 731 MAURUTTO, F. A. M. *et al.* Cytogenetic characterization of three allopatric
732 species of *Hypostomus Lacépède* (1803) (Teleostei, Loricariidae). **Caryologia**,
733 v. 65, n. 4, p. 340-346, 2012.
- 734 MENDES-NETO, E. de O.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHOF,
735 O. (2011). Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905)

- 736 (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on
737 karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comparative Cytogenetics**,
738 <https://doi.org/10.3897/compcytogen.v5i2.964>.
- 739 MICHELE, J. L.; TAKAHASHI, C. S.; FERRARI, I. Karyotypic study of some
740 species of the family Loricariidae (Pisces). **Cytologia**, v. 42, n. 3-4, p. 539-546,
741 1977.
- 742 MILHOMEM, S.; CASTRO, R.; NAGAMACHI, C.; De SOUZA, A., FELDBERG,
743 E.; PIECZARKA J. (2010). Different cytotypes in fishes of the genus
744 *Hypostomus* Lcépède, 1803,(Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river
745 (Amazon region, Brazil). **Comparative cytogenetics**, 4, 45.
- 746 MOLINA, W.F., ALVES, D.E.O., ARAÚJO, W.C., MARTINEZ, P.A., SILVA, M.F.
747 M., COSTA, G.W.W.F. 2010. Performance of human immunostimulating agents
748 in the improvement of fish cytogenetic preparations. **Genetics and Molecular**
749 **Research**, v. 9, p. 1807- 1814.
- 750 MORLEY, Robert J. A review of the Cenozoic palaeoclimate history of
751 Southeast Asia. **Biotic evolution and environmental change in Southeast**
752 **Asia**, p. 79-114, 2012.
- 753 MURAMOTO, J. I; OHNO. S, ATKIN. N. B. On the diploid state of the fish order
754 Ostariophysi. **Chromosoma** 1968; 24: 59-66.
- 755 NELSON, JOSEPH S. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016.
- 756 OLIVEIRA, L. C.; RIBEIRO, M. O.; DUTRA, E. S.; ZAWADZKI, C. H.;
757 PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. (2015). Karyotype
758 structure of *Hypostomus* cf. *plecostomus* (Linnaeus, 1758) from tapajós river
759 basin, southern amazon: Occurrence of sex chromosomes (ZZ/ZW) and their
760 evolutionary implications. **Genetics and Molecular Research**,
761 <https://doi.org/10.4238/2015.June.18.5>.
- 762 PAIXÃO, A. C. **Revisao Taxonomica e Filogenia de Loricariichthys Bleeker,**
763 **1862 (Ostariophysi:Siluriformes: Loricariidae)**. Tese de Doutorado, Instituto
764 de Biociencias da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP-2012.
- 765 PANSONATO-ALVES, José Carlos *et al.* Mapping five repetitive DNA classes
766 in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae):
767 analysis of chromosomal variability. **Reviews in fish biology and fisheries**, v.
768 23, n. 4, p. 477-489, 2013.
- 769 PELEGRINI, L. S. **Biodiversidade dos metazoários parasitos das espécies**
770 **dominantes de peixes siluriformes do Rio Batalha, médio Rio Tietê, São**
771 **Paulo, Brasil**. Orientador: Dra. Vanessa Doro Abdallah Kozlowiski. 2018. 226f.
772 Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista,
773 Botucatu, 2018.

- 774 PELICICE, F. M. *et al.* Fish diversity in the cascade of reservoirs along the
775 Paranapanema River, southeast Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 2,
776 2018.
- 777 PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using
778 quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the**
779 **National Academy of Sciences of the USA**, v.83, p.2934-2938, 1986.
- 780 PORTO, E. F.; GINDRI, B. S.; VIEIRA, M. M.; BORIN, L. A.; PORTELA-
781 CASTRO, A. L.; MARTINS-SANTOS, I. C. Polymorfism of the nucleolus
782 organizing regions in *Loricaria cataphracta* (Siluriformes, Loricariidae) of the
783 upper Paraguay River basin indicate an association with transposable
784 elements. **Genet Mol Res** 2014;13:1627–1634.
- 785 PORTO, E. F.; VIEIRA, M. M.; BARBOSA, L. M.; BORIN-CARVALHO, L. A.;
786 VICARI, M. R.; PORTELA-CASTRO, A. L.; *et al.* Chromosomal polymorphism in
787 *Rineloricaria lanceolata* Gunther, 1868 (Loricariidae:Loricariinae) of the
788 Paraguay basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): evidence of fusions and their
789 consequences in the population. **Zebrafish** 2014;11:318–324.
- 790 PORTO, E. F.; PORTELA-CASTRO, A. L.; MARTINS-SANTOS, I. C.
791 Chromosome polymorfism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae,
792 Siluriformes) of the Parana´ river basin. **Ichthyol Res** 2011;58:225–231.
- 793 PRIMO, C. C.; GLUGOSKI, L.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V. Chromosome
794 mapping and molecular characterization of the Tc1/Mariner element in
795 *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae). **Braz Arch Biol Technol**
796 2018;61:e18170623.
- 797 PRIMO, C. C.; GLUGOSKI, L.; ALMEIDA, M. C.; ZAWADZKI, C. H.; MOREIRA-
798 FILHO, O.; VICARI, M. R.; *et al.* Mechanisms of chromosomal diversification in
799 species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). **Zebrafish**
800 2017;14: 161–168.
- 801 QUEIROZ, L. J. *et al.* (2020). *Evolutionary units delimitation and continental*
802 *multilocus phylogeny of the hyperdiverse catfish genus Hypostomus*. **Molecular**
803 **Phylogenetics and Evolution**, 145, 106711.
- 804 REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal**
805 **of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.
- 806 REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JR, C. J. **Check list of the**
807 **freshwater fishes of South and Central America**, Edipucrs, Porto Alegre, p.
808 742, 2003.
- 809 ROCHA-REIS, D. A. *et al.* The Persevering Cytotaxonomy: Discovery of a
810 Unique XX/XY Sex Chromosome System in Catfishes Suggests the Existence
811 of a New, Endemic and Rare Species. **Cytogenetic and genome research**, v.
812 156, n. 1, p. 45-55, 2018.

- 813 ROCHA-REIS, D. A.; BRANDÃO, K. O.; ALMEIDA TOLEDO, L. F.; PAZZA, R.;
814 KAVALCO, K. F. 2013. Análise citogenética de três espécies de *Hypostomus*
815 da bacia do rio Paraná. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, 4: 50-
816 58.
- 817 ROSA, K. O.; ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A. V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA,
818 M. C.; CESTARI, M. M.; *et al.* Numeric and structural chromosome polymorphism
819 in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusions points carrying 5S rDNA
820 or telomere sequence vestiges. **Rev Fish Biol Fish** 2011;22:739–749.
- 821 RUBERT, M.; da Rosa, R.; ZAWADZKI, C. H.; MARIOTTO, S.; MOREIRA-
822 FILHO, O.; GIULIANO-CAETANO, L. (2016). Chromosome mapping of 18S
823 ribosomal RNA genes in eleven *Hypostomus* species (Siluriformes,
824 Loricariidae): diversity analysis of the sites. **Zebrafish**, 13(4), 360-368.
- 825 RUBERT, M. *et al.* Cytogenetic characterization of four species of the genus
826 *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its
827 chromosomal diversity. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 5, p. 397, 2011.
- 828 RUBERT, M.; ZAWADZKI, C. H.; GIULIANO-CAETANO, L. (2008) Cytogenetic
829 characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae).
830 **Neotropical Ichthyology** 6: 93–100. doi: 10.1590/S1679-62252008000100011.
- 831 SCAVONE, M. D. P.; JÚLIO-JR, H. F. Cytogenetics analysis and heterochromatin
832 distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys*
833 *platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). **Rev Bras Genet** 1995;18:31–35.
- 834 SCAVONE, M. D. P.; JÚLIO-JR, H. F. Cytogenetic analysis and probable
835 supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. Females
836 (Loricariidae-Siluriformes) from the Parana´ river basin. **Rev Ictiol** 1994;2:41–
837 47.
- 838 SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific
839 heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes.
840 **Cytogenetic and Genome Research**, v. 27, n. 2-3, p. 190-193, 1980.
- 841 SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric
842 heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- 843 TAKAGUI, F. H. *et al.* Unrevealing the karyotypic evolution and cytotaxonomy of
844 armored catfishes (Loricariinae) with emphasis in *Sturisoma*, *Loricariichthys*,
845 *Loricaria*, *Proloricaria*, *Pyxiloricaria*, and *Rineloricaria*. **Zebrafish**, v. 17, n. 5, p.
846 319-332, 2020.
- 847 TAKAGUI, F. H.; VENTURELLI, N. B.; DIAS, A. L.; SWARCA, A. C, VICARI, M.
848 R.; FENOCCHIO, A. S.; *et al.* The importance of pericentric inversions in the
849 karyotypic diversification of the species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys*
850 *platymetopon*. **Zebrafish** 2014;11:300–305.

- 851 TEIXEIRA DE MELLO, F.; N. VIDAL.; I. GONZALEZ-BERGONZONI & C.
852 IGLESIAS. 2009. Length-weight relationships of eight fish espécies from the
853 lower section of the Uruguay River (Rio Negro, Uruguay). **Journal of Applied**
854 **Ichthyology**, 25: 128-129.
- 855 TRALDI, J. B. *et al.* Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes,
856 Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites.
857 **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p. 463-471, 2013.
- 858 TRALDI, J. B. *et al.* First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan,
859 1908): a case of heterochromatic polymorphism. **Comp Cytogenet.** 2012; 6:
860 115-125.
- 861 VARI, R. P. & MALABARBA, L. R. 1998. **Neotropical ichthyology: an**
862 **overview. In Phylogeny and classification of Neotropical fishes** (L. R.
863 Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena, eds).
864 Edipucrs, Porto Alegre, p. 1-12.
- 865 VIANNA, N. C.; NOGUEIRA, M. G. Ichthyoplankton and limnological factors in
866 the Cinzas River - an alternative spawning site for fishes in the middle
867 Paranapanema River basin, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.20,
868 p.139-151. 2008.
- 869 ZAWADZKI, C.; CARVALHO, P. H.; BIRINDELLI, J. L. O & AZEVEDO, F. M.
870 (2016). *Hypostomus nigrolineatus*, a new dark-striped species from the rio
871 Jequitinhonha and rio Pardo basins, Brazil (Siluriformes, Loricariidae).
872 **Ichthyological Exploration of Freshwaters** 27 (3): 263-274.
873

CAPÍTULO 1

1

2 “DIVERSIFICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM *Hypostomus* (LORICARIIDAE,
3 HYPOSTOMINAE): UMA ANÁLISE CITOGENÉTICA EM TRÊS ESPÉCIES
4 DA BACIA DO PARANAPANEMA, ALTO RIO PARANÁ”

5 Kátia Fabiana dos Santos, Luís Ricardo Santana Pompeo, Jaqueline Fernanda Dionisio,
6 Ana Beatriz Gois Fernandes Monteiro, Fábio Hiroshi Takagui e Lucia Giuliano-Caetano

7 *Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445*
8 *Km 380, Campus Universitário, P.O. Box 6001, CEP 86051-970, Laboratório de Citogenética Animal,*
9 *Londrina, Paraná, Brasil. (KFS) katia.fabiana.santos97@uel.br, (LRSP) luis.ricardo32@hotmail.com,*
10 *(JFD) jaquedionisio@hotmail.com, (ABGFM) abmonteiro91@gmail.com, (FHT)*
11 *fabiotakagui@hotmail.com, (LGC) giuliano@uel.br.*

12 **Este artigo será submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*.**

13

Resumo

14 O gênero *Hypostomus* forma o grupo de peixes mais abundante em número de espécies
15 nos ecossistemas de água doce. Além de apresentar uma ampla distribuição geográfica e
16 variações morfológicas, este gênero também é um dos mais analisados
17 citogeneticamente apresentando uma grande diversidade cariotípica. Neste estudo, três
18 espécies de *Hypostomus* foram analisadas: duas populações de *H. ancistroides*, sendo
19 uma coletada na microbacia Ribeirão Cambé e outra população no Ribeirão Três Bocas;
20 exemplares de *H. hermanni* coletados no Ribeirão Três Bocas e de *H. strigaticeps*
21 provenientes do Rio Laranjinha. Todos os locais de coletas são pertencentes ao Alto Rio
22 Paraná. As técnicas citogenéticas empregadas foram coloração por Giemsa e
23 fluorocromos CMA/DAPI, impregnação por nitrato de prata, bandeamento C e
24 hibridação *in situ* fluorescente com DNAr 18S e 5S. As duas populações de *H.*
25 *ancistroides* apresentaram $2n=68$ com fórmula cariotípica de $14m+16sm+8st+30a$; *H.*
26 *hermanni* e *H. strigaticeps* apresentaram $2n=72$ com fórmulas cariotípicas distintas,
27 sendo $10m+20sm+18st+24a$ e $10m+14sm+20st+28a$, respectivamente. A coloração com
28 fluorocromos revelou a presença de sinais GC positivos para todas as espécies e regiões
29 ricas em AT apenas em *H. strigaticeps*. Múltiplas regiões heterocromáticas foram
30 observadas nas espécies analisadas e blocos fortemente heterocromáticos foram
31 encontrados em *H. ancistroides* (Ribeirão Cambé), *H. hermanni* e *H. strigaticeps*. A
32 FISH com DNAr 18S evidenciou três sítios ribossômicos em *H. ancistroides* e
33 *H. strigaticeps*; *H. hermanni* apresentou uma fraca marcação em apenas um homólogo.
34 As Ag-RONs foram coincidentes com os locais de DNAr 18S em todas as espécies. Os
35 sítios de DNAr 5S estiveram presentes apenas no par cromossômico 4 nas duas
36 populações de *H. ancistroides*, enquanto que nas outras duas espécies esteve presente
37 em mais de um par de cromossomos O par 4 metacêntrico também apresentou sítios de
38 DNAr 5S em *H. strigaticeps*, além de *H. ancistroides*, indicando que possa ser um
39 importante marcador para diferenciação populacional. As espécies analisadas
40 apresentaram características cromossômicas particulares, tanto em variações
41 cariotípicas, quanto em posição e número de sítios ribossômicos, corroborando com
42 dados de outras espécies do gênero já analisadas, reforçando que rearranjos
43 cromossômicos (fusões, fissões e inversões) são os principais responsáveis pela
44 diversificação e evolução cariotípica do grupo *Hypostomus*.

45 **Palavra-chaves:** Diversidade Cariotípica. FISH. Hypostomus. Marcadores
46 Cromossômicos.

47 **Introdução**

48 A subfamília Hypostominae compreende o grupo de peixes mais diversificado
49 e amplamente distribuído na Região Neotropical, desde a Costa Rica até o sul
50 Argentino (REIS *et al.*, 2003). Esta subfamília é a mais abundante dentre as demais
51 alocadas em Loricariidae, sendo seus representantes conhecidos como “cascudos” e
52 são facilmente identificados pela estrutura corpórea achatada dorso/ventralmente e a
53 presença de placas ósseas (BRITSKI, 1972; ISBRUCKER, 1980; BRITSKI *et al.*,
54 1999). Os bagres do gênero *Hypostomus* (Lacépède, 1803) são os mais dominantes em
55 rios brasileiros com aproximadamente 149 espécies (QUEIROZ *et al.*, 2020). Seus
56 espécimes apresentam variações tanto na morfologia quanto no padrão de coloração
57 (ZAWADZKI *et al.*, 2008), tornando este gênero alvo em erros de identificação.

58 As revisões citogenéticas mostram que *Hypostomus* se destaca por apresentar o
59 maior número de espécies cariotipadas, com número diploide variando de $2n=52$ em
60 *H. emarginatus* (ARTONI e BERTOLLO, 2001) à $2n=84$ em *Hypostomus perdido*
61 (CEREALI *et al.*, 2008), sendo $2n=72$ o mais frequente e as espécies com maior
62 número de cromossomos apresentam uma alta proporção de cromossomos
63 subtelo/acrocêntricos se comparado com os meta/submetacêntricos (BUENO *et al.*,
64 2012). Isto pode ser explicado pela ação de rearranjos robertsonianos (fissões e fússões
65 cêntricas) envolvidos na evolução cariotípica do grupo, colocando este gênero em uma
66 posição derivada dentro de Loricariidae (ARTONI e BERTOLLO, 1996, 2001).

67 Além da diversidade em número diploide e fórmula cariotípica, *Hypostomus*
68 ainda apresenta uma diversidade cromossômica no padrão de distribuição de
69 heterocromatina, regiões organizadoras de nucléolo e no mapeamento de genes
70 ribossomais. Em Loricariidae, a presença de NORs simples em posição terminal nos
71 cromossomos é considerada ancestral para a família (ALVES *et al.*, 2005), mas no

72 gênero *Hypostomus*, NORs múltiplas são mais frequentes (BUENO *et al.*, 2012).

73 A heterocromatina constitutiva na subfamília Hypostominae apresenta dois
74 padrões de distribuição: pode ser encontrada em regiões centroméricas e
75 pericentroméricas de cromossomos meta/submetacêntricos ou em blocos
76 heterocromáticos em posições intersticiais ou telomérica de cromossomos
77 subtelo/acrocêntricos (ARTONI e BERTOLLO, 2001). As análises convencionais com
78 fluorocromos mostram que *Hypostomus* possui sítios ricos em bases CG e AT e as
79 análises citogenéticas moleculares mostram que os sítios ribossômicos 18S e 5S são
80 encontrados em diferentes posições e em múltiplos pares de cromossomos

81 A citogenética mostra ser uma excelente ferramenta para auxiliar na
82 delimitação e identificação correta das espécies a nível cromossômico, sendo capaz de
83 caracterizar populações pelo número diploide e estrutura cariotípica, assim como por
84 meio de bandeamentos cromossômicos. Considerando a diversidade em número de
85 espécies existente no gênero *Hypostomus* e a dificuldade/erros de identificação devido
86 às similaridades de padrões morfológicos, o presente estudo teve como objetivo
87 caracterizar citogeneticamente três espécies de *Hypostomus*, coletadas em dois
88 importantes afluentes da bacia hidrográfica do Paranapanema, visando auxiliar na
89 sistemática e no entendimento da evolução cariotípica no gênero.

90 **Material e Métodos**

91 **Amostragem e locais de coleta**

92 Um total de 93 exemplares de *Hypostomus* foram coletados em diferentes
93 localidades, sendo: 43 indivíduos de *H. ancistroides* (Ihering, 1911) (9 machos, 22
94 fêmeas e 12 NI) no Ribeirão Cambé; 10 de *H. ancistroides* (1 macho, 2 fêmeas e 7 NI)
95 no Ribeirão Três Bocas; 12 exemplares de *H. hermanni* (Ihering, 1905) (7 machos e 5
96 fêmeas) no Ribeirão Três Bocas e 28 exemplares de *H. strigaticeps* (Regan, 1908) (18

97 machos e 10 fêmeas) no Rio Laranjinha. Todas as localidades fazem parte do Alto Rio
98 Paraná. Todos os espécimes foram coletados com tarrafas e peneiras, com autorização
99 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) número
100 11399-1. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de
101 Ética com pesquisas com uso de animais da Universidade Estadual de Londrina
102 (Protocolo: 60/2017). Os exemplares foram fixados, identificados, e encontram-se
103 depositados no acervo zoológico do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de
104 Londrina.

105 **Obtenção cromossômica, coloração e bandeamentos**

106 Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com o protocolo de
107 Bertollo *et al.* (1978), que consiste na dissociação do tecido renal. As lâminas foram
108 coradas com Giemsa e as metáfases fotografadas usadas para determinar o número
109 diploide e montagem do cariótipo; posteriormente os cromossomos foram medidos
110 com o software EasyIdio e classificados em metacêntrico (m), submetacêntrico (sm),
111 subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a), de acordo com Levan *et al.* (1964). Os
112 cariótipos foram organizados pelo programa Adobe Photoshop CS6. As regiões
113 organizadoras de nucléolos (RONs) foram detectadas por impregnação com nitrato de
114 prata, seguindo o protocolo proposto por Howell & Black (1980). A heterocromatina
115 constitutiva foi detectada por bandeamento-C proposto por Sumner (1972) com
116 modificação na coloração, usando o fluorocromo Iodeto de Propídeo, conforme Lui *et*
117 *al.* (2012). Regiões ricas em CG e AT foram detectadas com fluorocromos CMA₃ e
118 DAPI, respectivamente, de acordo com o protocolo descrito por Schweizer (1980).

119 **Extração de DNA**

120 O DNA genômico total de *H. ancistroides*, *H. hermanni* e *H. strigaticeps*
121 foram extraídos a partir da musculatura, empregando o protocolo baseado em

122 fenol/clorofórmio proposto por Almeida *et al.* (2001). Uma amostra de *H. ancistroides*
123 foi utilizada para a preparação das sondas DNAr 18S e DNAr 5S.

124 **Obtenção das sondas de DNAr 18S 5S**

125 A obtenção da sonda de DNAr 18S, ocorreu por meio da reação em cadeia da
126 polimerase (PCR) utilizando os primers de 18S-F e 18S-R obtidos de *Prochilodus*
127 *argenteus*. As reações da PCR foram conduzidas em volume final de 25µL contendo:
128 2,5 µl de 10× Tampão; 0,5 µl de MgCl₂; 0,5 µl de Mix dNTPs; 0,5µl de primer
129 *Foward*; 0,5 µl de primer *Reverse*; 17,5 µl de H₂O miliQ autoclavada; 2 µl de DNA
130 (diluído à 50 ng) e 1 µl de Taq DNA Polimerase. As amplificações foram realizadas
131 utilizando uma desnaturação de 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C
132 durante 1 min, 56°C durante 45 s, 72°C durante 1 min, e uma extensão final de 72°C
133 durante 5 min. As reações de PCR para obtenção da sonda de DNAr 5S utilizou os
134 primers de 5S-F e 5S-R obtidos de *Megaleporinus elongatus* obteve uma concentração
135 final de 25µL contendo: 2,5 µl de Tampão Buffer; 1,5 µl de MgCl₂; 1,0 µl de Mix
136 dNTPs; 1,0µl de primer *Foward*; 1,0 µl de primer *Reverse*; 15,5 µl de H₂O miliQ
137 autoclavada; 3 µl de DNA (diluído à 12 ng) e 0,5 µl de Taq DNA Polimerase. As
138 reações de amplificações incluíram uma etapa de desnaturação de 94°C por 5 min,
139 seguido por 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 59°C durante 45 s, 72°C durante 1 min,
140 e uma extensão final de 72°C durante 5 min. As sondas foram marcadas por PCR, a de
141 DNAr 18S por Digoxigenina-11-dUTP e a DNAr 5S por Biotina-14-dATP.

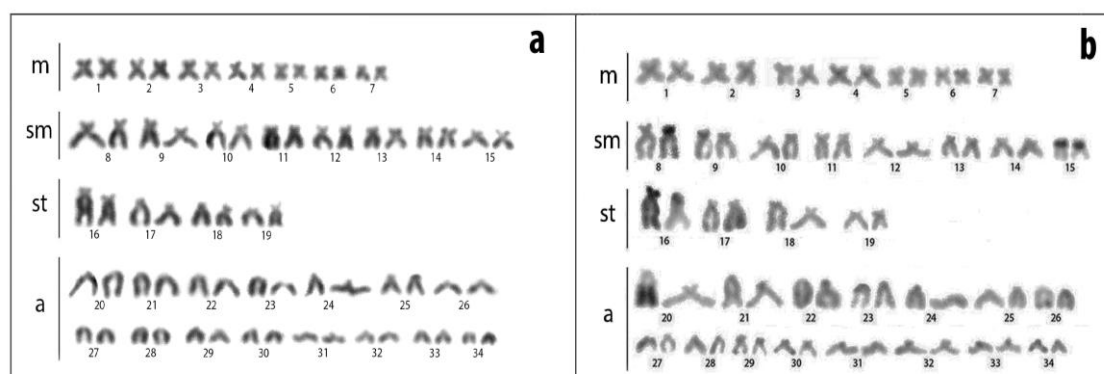
142 **Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)**

143 A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com o
144 protocolo de Pinkel *et al.* (1986), com algumas adaptações. A sonda de DNAr 18S foi
145 detectada com anti-digoxigenin-rhodamina (Roche) e a sonda de DNAr 5S com
146 biotinylated anti-avidin (Sigma-Aldrich). Os cromossomos foram contracolorados com o

147 fluorocromo 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI, 2µg/ml) e analisadas em um
 148 microscópio de epifluorescência (Leica DM2000), equipado com uma câmera digital.
 149 As imagens foram capturadas usando o Leica Application Suite versão 3.1.0. (Leica
 150 Microsystems).

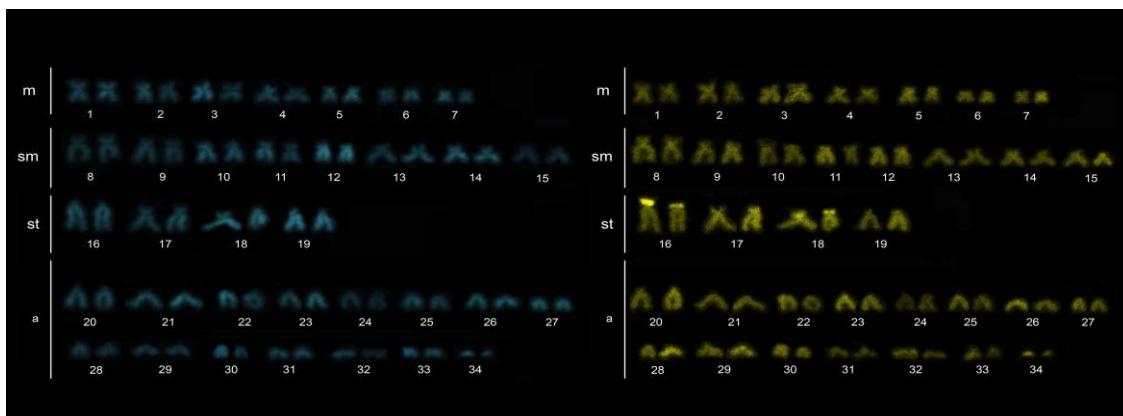
151 Resultados

152 ***Hypostomus ancistroides* (Ribeirão Cambé):** apresentou $2n = 68$
 153 cromossomos e fórmula cariotípica de $14m+16sm+8st+30a$ (NF 106) (Fig.1a). O
 154 bandejamento C revelou heterocromatina na região pericentromérica do par 4
 155 metacêntrico, no braço curto de um homólogo do par 8 submetacêntrico, na região
 156 intersticial do par 15 submetacêntrico e 16 subteloentrico, assim como no braço
 157 longo de apenas um homólogo do par 20 acrocêntrico (Fig.1b). Um heteromorfismo
 158 pode ser evidenciado no par 16 subteloentrico. A dupla coloração com fluorocromos
 159 revelou a presença de regiões ricas em GC em apenas dois pares cromossômicos (16 e
 160 18 subteloentrico) e nenhuma região rica com bases AT ($CMA_3^+ / DAPI^-$) (Fig. 2). A
 161 técnica de AgNOR foi coincidente com o DNAr 18S, evidenciando marcações na
 162 região terminal do braço curto do par 16 e em um dos homólogos do par 20, também
 163 na região terminal do braço curto (Fig.3). Já a sonda de DNAr 5S revelou uma
 164 marcação na região pericentromérica do par 4, metacêntrico (Fig. 3).



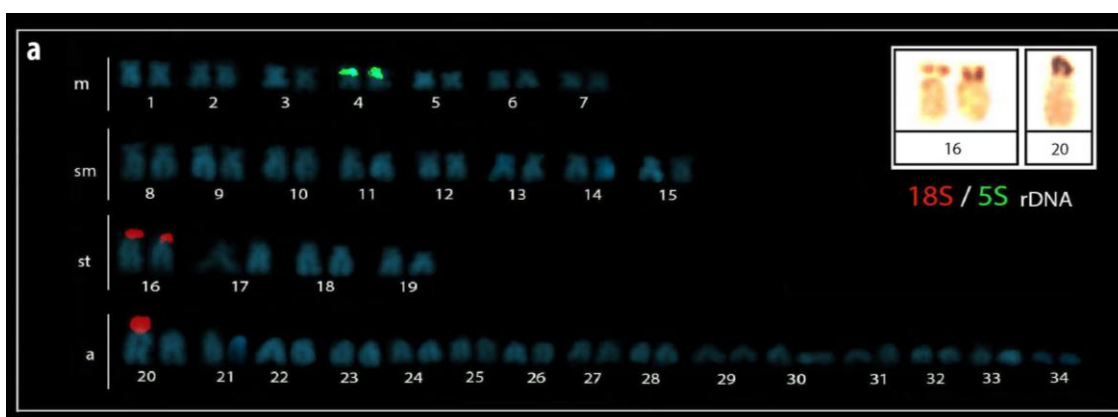
165
 166 **Fig. 1** – Cariótipos de *Hypostomus ancistroides* do Ribeirão Cambé. Coloração com

167 (a) Giemsa e (b) Banda C.



168

169 **Fig. 2** – Cariótipos de *Hypostomus ancistroides* (Ribeirão Cambé) coradas com DAPI
 170 (azul) e CMA₃ (amarelo).

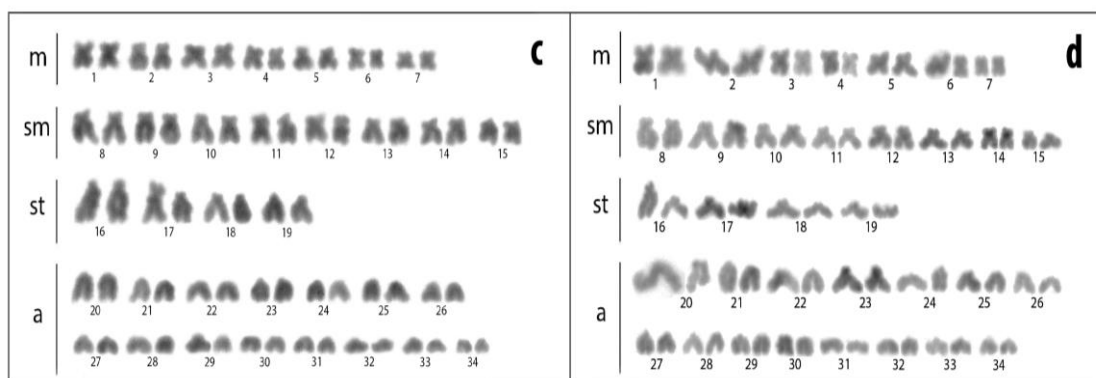


171

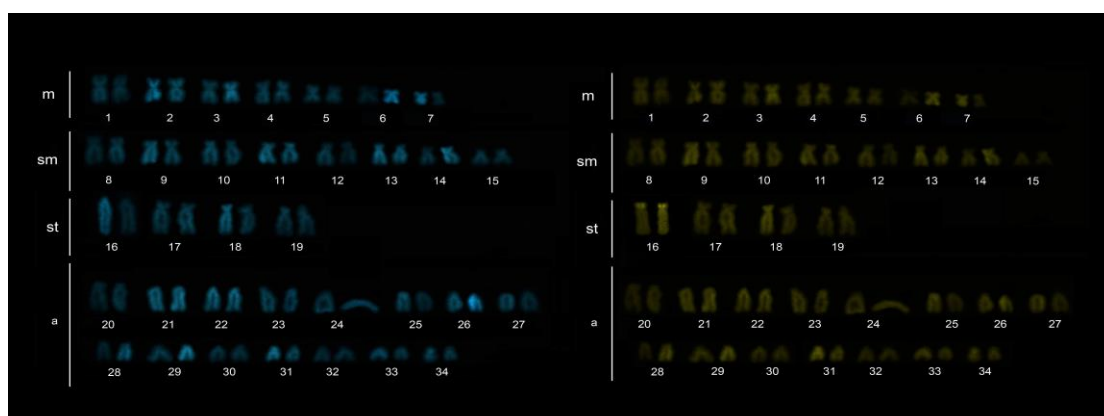
172 **Fig. 3** – Cariótipos de *Hypostomus ancistroides* (Ribeirão Cambé) com double FISH
 173 com DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). No box, os cromossomos com NORs
 174 após Impregnação com Nitrato de Prata.

175 *Hypostomus ancistroides* (Ribeirão Três Bocas): apresentou $2n = 68$
 176 cromossomos e fórmula cariotípica de $14m+16sm+8st+30a$ (NF 106) (Fig.4c). O
 177 bandejamento C revelou blocos heterocromáticos na região pericentromérica dos pares
 178 14 submetacêntrico e 17 subtlocêntrico e no par 23 acrocêntrico (Fig.5d). Um
 179 heteromorfismo pode ser evidenciado no par 16 subtlocêntrico. A dupla coloração
 180 com fluorocromos revelou a presença de regiões ricas em GC em apenas no par 16
 181 subtlocêntrico, na porção pericentromérica e nenhuma região rica em bases AT
 182 (CMA₃ + / DAPI -) (Fig. 5). A impregnação com nitrato de prata mostrou as NORs
 183 coincidente com o DNAr 18S no braço curto de um cromossomo do par 15

184 metacêntrico; e no par 16 subtelocêntrico (Fig.6); enquanto que a sonda de DNAr 5S
 185 revelou apenas uma marcação na região pericentromérica do par 4 metacêntrico (Fig.
 186 6).



187
 188 **Fig. 4** – Cariótipos de *H. ancistroides* do Ribeirão Três Bocas. Coloração com (c)
 189 Giemsa e (d) Banda C.

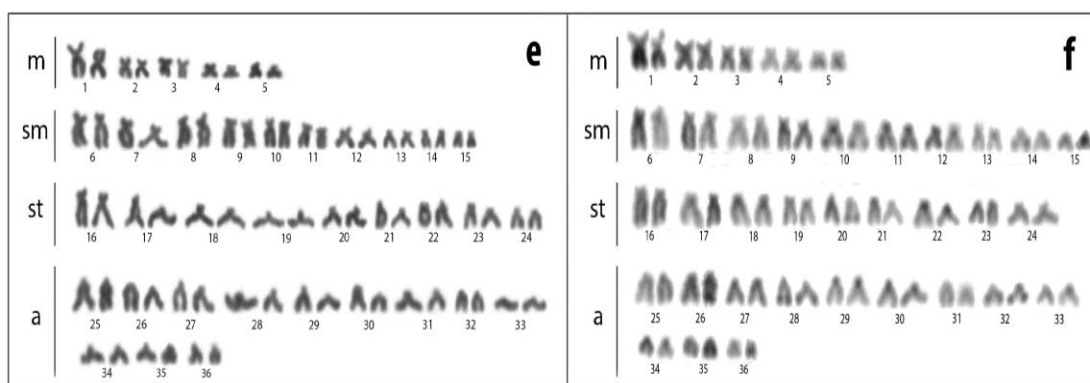


190 **Fig. 5** – Cariótipos de *H. ancistroides* (Ribeirão Três Bocas) coradas com dupla
 191 coloração DAPI (azul) e CMA₃ (amarelo).



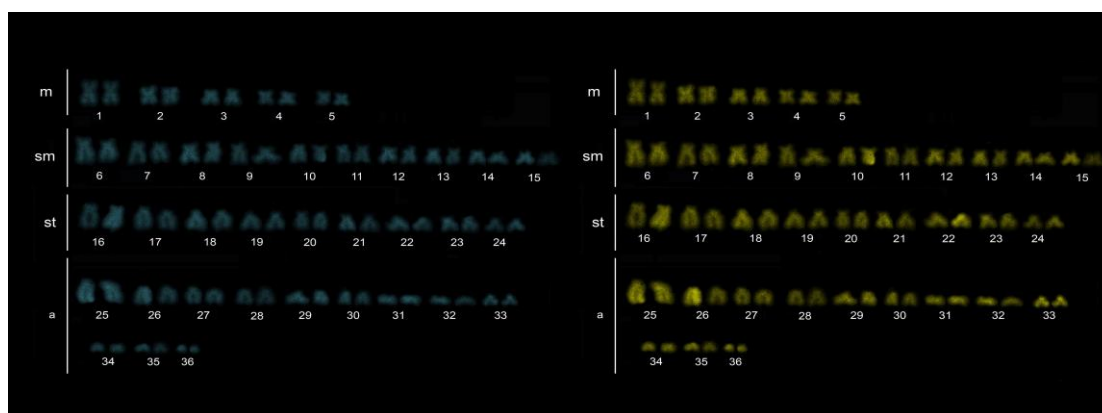
192 **Fig. 6** – Cariótipos de *H. ancistroides* (Ribeirão Três Bocas) com a double FISH com
 193 DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). No box, os cromossomos com NORs após
 194 Impregnação com Nitrato de Prata.

195 *Hypostomus hermanni*: apresentou $2n = 72$ cromossomos e fórmula
 196 cariotípica de $10m+20sm+18st+24a$ (NF 110) (Fig.7e). O bandeamento C revelou
 197 blocos heterocromáticos no braço longo do par 1 metacêntrico, nas regiões
 198 pericentroméricas dos pares 9, 10, 11, 15 submetacêntricos e subteloentrico (par 22)
 199 (Fig.7f). A dupla coloração com fluorocromos revelou apenas a presença de regiões
 200 GC ricas apenas no braço curto do par 33 acrocêntrico e nenhuma região rica em AT
 201 (CMA3+/DAPI-)(Fig. 8). A impregnação com nitrato de prata evidenciou NOR
 202 coincidente com o DNAr 18S no braço curto de um dos homólogos do par 33 (Fig.9).
 203 Já a sonda de DNAr 5S evidenciou oito marcações: na região pericentromérica dos
 204 pares 5 metacêntrico e 19 subteloentrico e nos pares 35 e 36, pericentromérica (Fig.
 205 9).



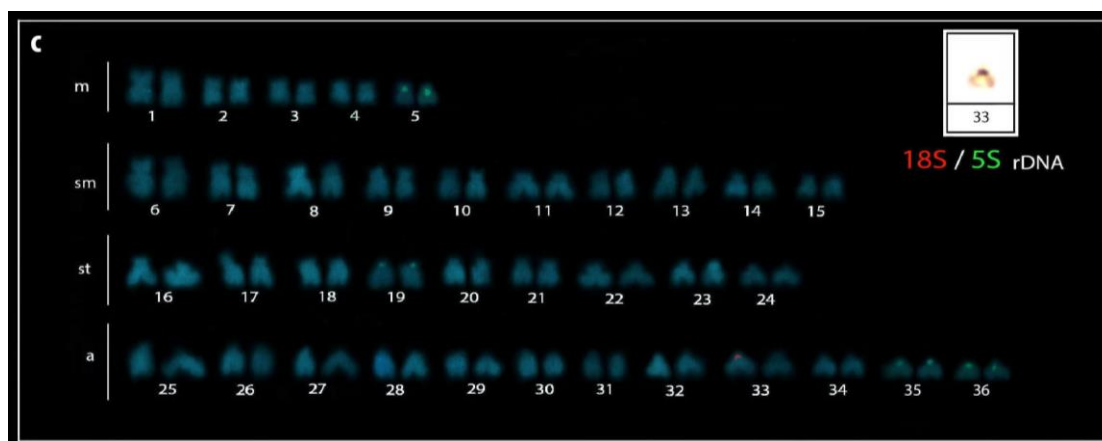
206
 207

Fig. 7 – Cariótipos de *H. hermanni*. Coloração com (e) Giemsa e (f) Banda C.



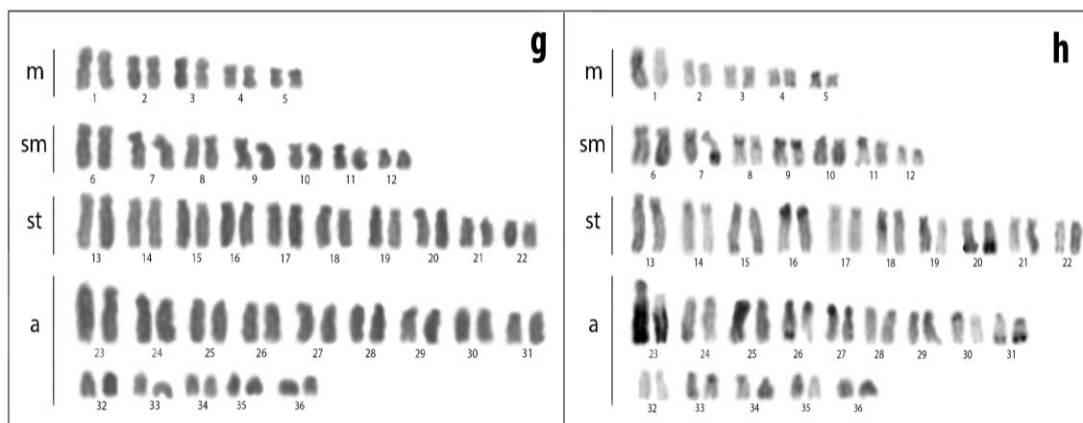
208
 209
 210

Fig. 8 – Cariótipos de *H. hermanni* coradas com dupla coloração DAPI (azul) e CMA₃ (amarelo).



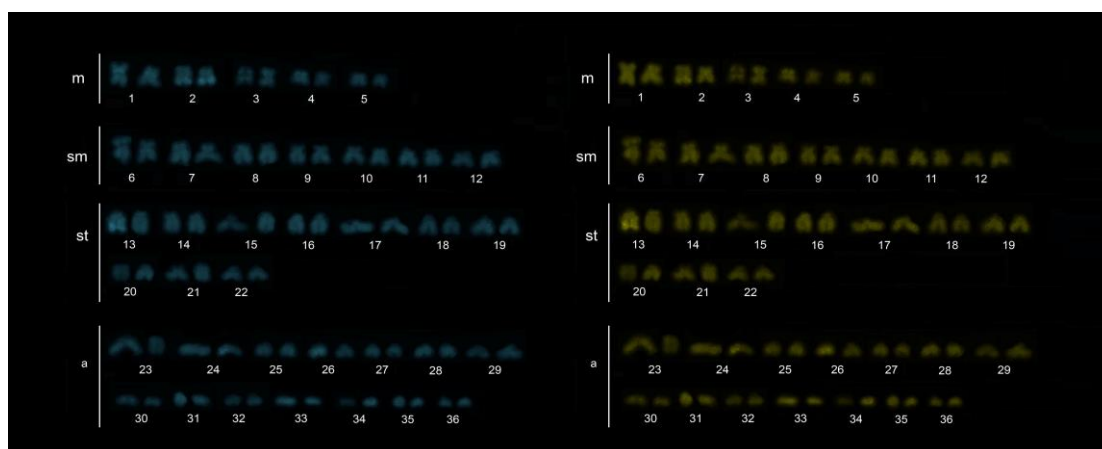
211
 212 **Fig. 9** – Cariótipos de *H. hermanni* com a double FISH com DNAr 18S (vermelho) e
 213 DNAr 5S (verde). No box, os cromossomos com NORs após Impregnação com
 214 Nitrato de Prata.

215 *Hypostomus strigaticeps*: apresentou $2n = 72$ cromossomos e fórmula
 216 cariotípica de $10m+14sm+20st+28a$ (NF 116) (Fig.10g). O bandeamento C revelou
 217 blocos heterocromáticos em cromossomos submetacêntricos: no braço longo de um
 218 dos homólogos do par 7, na região pericentromérica do par 8 e no braço curto do par
 219 9; em cromossomos subtelo-cêntricos: no braço curto do par 16 e no braço longo do par
 220 20; assim como em cromossomos acrocêntricos: um forte bloco em quase todo braço
 221 longo do par 23, marcação terminal no braço longo de um homólogo do par 26 e 31 e
 222 no braço curto do par 27 (Fig.10h). A dupla coloração com fluorocromos revelou a
 223 presença de regiões ricas em AT e GC no par 2 metacêntrico e regiões GC no 13
 224 subtelo-cêntrico ($CMA3^+/DAPI^+$) (Fig. 11). A impregnação com nitrato de prata
 225 evidenciou marcação terminal no braço longo de um homólogo do par acrocêntrico 23
 226 adjacente à heterocromatina e na região terminal do braço longo do par 32 (Fig.12,
 227 box). A double FISH com a sonda de DNAr 18S revelou três sítios ribossomais
 228 coincidentes com a AgNOR. Enquanto que a sonda com DNAr 5S revelou marcações
 229 na região centromérica do par 4 metacêntrico e no braço longo do par 21,
 230 subtelo-cêntrico (Fig. 12).



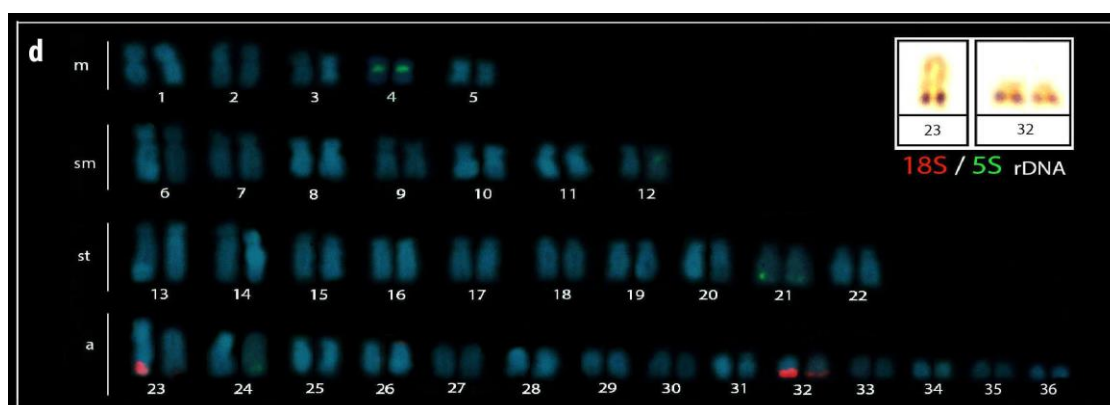
231
232

Fig. 10 – Cariótipos de *H. strigaticeps*. Coloração com (g) Giemsa e (h) Banda C.



233
234
235
236

Fig. 11 – Cariótipos de *H. strigaticeps* coradas com dupla coloração DAPI (azul) e CMA₃ (amarelo).



237
238
239
240

Fig. 12 – Cariótipos de *H. strigaticeps* com a double FISH com DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). No box, cromossomos com NORs após Impregnação com Nitrato de Prata.

241 Discussão

242 As três espécies de *Hypostomus* analisadas no presente estudo apresentaram
243 manutenção no número diploide, quando comparadas com outras populações das

244 mesmas espécies com algumas exceções encontradas na literatura. Maurutto *et al.*
245 (2012) e Rocha-Reis *et al.* (2018), por exemplo, encontraram exemplares de 66
246 cromossomos em populações de *H. aff. ancistroides*, ambas provenientes da bacia do
247 Rio Tibagi. Duas populações de *H. strigaticeps* com 74 cromossomos já foram
248 encontradas (tabela 1), pertencentes às bacias do rio Grande e do Rio Tietê
249 (MICHELE *et al.*, 1977; ALVES *et al.*, 2012, respectivamente). Entretanto, a
250 população de *H. strigaticeps* coletado no Rio Corumbataí por Alves *et al.* (2012) que
251 exibiu $2n=74$, é considerada o topótipo da espécie, portanto, todas as demais espécies
252 com $2n=72$ podem ter se originado por uma fusão cêntrica. Manutenção do número
253 diploide e variações na fórmula cariotípica em *Hypostomus* também são observadas
254 em outras espécies do gênero disponíveis na literatura. Essas frequentes variações
255 intrapopulacionais sugerem que, além de rearranjos robertsonianos que promovem a
256 alteração do número diploide, rearranjos não robertsonianos estão alterando a estrutura
257 cariotípica entre populações de uma mesma espécie.

258 Quanto à variabilidade na estrutura cariotípica no gênero *Hypostomus* pode-se
259 observar, geralmente, uma alta frequência de cromossomos subtelo/acrocêntrico se
260 comparado com meta/submetacêntrico, em espécies com $2n$ maior. Existem aquelas
261 espécies que apresentam alto número diploide e conseqüentemente um número muito
262 superior de cromossomos subtelo/acrocêntrico, como *H. iheringii* e *H. mutuae*
263 (RUBERT *et al.*, 2016); *H. topavae* (ARTONI e BERTOLLO, 1996) e *Hypostomus*
264 *sp.2-3* (CEREALI *et al.*, 2008), reforçando a hipótese de que rearranjos de fissões
265 cêntricas têm participado na evolução do gênero (ARTONI e BERTOLLO, 1996,
266 2001).

267 Nas três espécies aqui analisadas, este mesmo padrão de proporção foi
268 observado, entretanto, contrastando com os dados da literatura, é possível notar que

269 algumas populações possuem mais cromossomos meta/submetacêntrico do que
270 subtelo/acrocêntrico, como *Hypostomus sp.* (ARTONI *et al.*, 1998), com $2n=64$; *H.*
271 *aff. cochliodon* (BECKER *et al.*, 2014), com $2n=64$ e *H. tapijara* (TRALDI *et al.*,
272 2013), com $2n=68$. A população de *Plecostomus ancistroides* que apresentava mais
273 cromossomos meta/submetacêntrico e a população de *H. strigaticeps* que apresentava
274 um número muito contrastante de cromossomos subtelo/acrocêntricos, ambas
275 analisadas por Michele *et al.* (1977), reforça a hipótese de que estas duas foram
276 descritas incorretamente (conversa pessoal com o orientador).

277 No gênero *Hypostomus*, existem dois padrões de distribuição da
278 heterocromatina, podendo ser em pouca quantidade em regiões centroméricas e
279 teloméricas de cromossomos meta/submetacêntricos e/ou blocos intersticiais em
280 cromossomos subtelo/acrocêntricos (ARTONI e BERTOLLO, 2001). Não é comum
281 neste gênero blocos de heterocromatina em cromossomos meta/submetacêntrico,
282 entretanto, a população de *H. hermanni* deste estudo apresentou um bloco de
283 heterocromatina no braço longo de um homólogo do par 1 metacêntrico. Isto pode ter
284 acontecido em decorrência à amplificação e transposição da heterocromatina. Fato
285 semelhante a este pôde ser encontrado em populações de *H. ancistroides*, *H. cf.*
286 *topavae* e *H. aff. hermanni* analisadas por Kamei *et al.* (2015); e sustentam a hipótese
287 de que a ocorrência de blocos não tão frequentes deve-se à mecanismos de evolução
288 divergentes que estão atuando no gênero.

289 Dados sobre coloração com fluorocromos em *Hypostomus* ainda são escassos
290 na literatura, e o que foi observado até o momento, nas espécies deste gênero, são as
291 marcações positivas ricas em GC, padrão similar ao encontrado em *H. ancistroides* e
292 *H. hermanni* do presente trabalho, como encontrado em *H. affinis* (KAVALCO *et al.*,
293 2004; 2005); *H. ancistroides* (RUBERT *et al.*, 2011) e *H. strigaticeps*

294 (BAUMGARTNER *et al.*, 2014). Pelo fluorocromo DAPI, apenas *H. strigaticeps* e *H.*
295 *regani* apresentou sinal positivo rico em AT, o que é raro em peixes, mas em algumas
296 espécies de *Hypostomus* essas marcações já foram encontradas, como em *H.*
297 *nigromaculatus* (RUBERT *et al.*, 2008); *H. paulinus* (RUBERT *et al.*, 2011);
298 *Hypostomus sp.XI* (MILHOMEM *et al.*, 2010) e *H. aff. unae* (BITENCOURT *et al.*,
299 2012).

300 Com exceção de *H. hermanni* deste estudo que apresentou apenas um sítio de
301 NOR, nas demais foram evidenciados 3 sítios em posição terminal, característica esta
302 já observada em outras espécies do gênero e que parece estar conservada no grupo.
303 Para todas as populações de *H. strigaticeps* disponíveis na literatura, Artoni e Bertollo
304 (1996), Pansonato-Alves *et al.* (2013) e Rubert *et al.* (2016) encontraram NORs
305 simples, nas demais populações destas espécies são encontrado sítios múltiplos
306 exclusivamente em cromossomos meta/submetacêntrico e subteloicêntrico. Bueno *et*
307 *al.* (2013) ressaltam que essas variações de Ag-RONs, sejam simples ou múltiplas,
308 possam ser causadas por transposição dessas seqüências, o que também explica a
309 distribuição dessas AgNORs em diferentes posições nos cromossomos. As espécies
310 aqui analisadas apresentaram variações quanto à posição e número de sítios hibridados
311 pela técnica de FISH; entretanto não houve sintonia entre as sondas de DNAr 18S e
312 DNAr 5S. Bueno *et al.* (2014) destaca que as espécies que possuem número diploide
313 de 68 a 72 cromossomos apresentam múltiplos sítios ribossômicos 18S, dados estes
314 que corroboram com os aqui encontrados.

315 Em relação à distribuição de sítios de DNAr 5S as três espécies apresentaram
316 variação de número, posição e tipo cromossômico, entretanto *H. ancistroides* e *H.*
317 *strigaticeps* apresentaram cístrons ribossômicos na região pericentromérica de um
318 mesmo par de cromossomos (4 metacêntrico), que pode ser considerado um par

319 marcador para estas espécies e para algumas outras do gênero *Hypostomus*, como em
320 *H. aff. ancistroides* (ROCHA-REIS *et al.*, 2018); *H. aff. hermanni* (LARA-KAMEI *et*
321 *al.*, 2017); *H. strigaticeps* (BUENO *et al.*, 2014; BAUMGARTNER *et al.*, 2014) entre
322 outros. Além deste possível par marcador *H. strigaticeps* também apresentou um outro
323 par com sítios de DNAr 5s, assim como *H. hermanni*, com 4 pares, confirmando
324 ocorrência de sítios múltiplos nestas espécies. Traldi *et al.* (2013) e Kamei *et al.*
325 (2017) encontraram múltiplos sítios de DNA5S em populações de *H. ancistroides*,
326 indicando que pode ocorrer variações no número e posição dos sítios em diferentes
327 populações da mesma espécie. Com isso, essas variações no número e localização do
328 DNAr 5S nestas e em outras espécies de *Hypostomus* podem também ser resultantes
329 de dispersão de elementos transponíveis e evidencia que o DNAr 5S seja um excelente
330 marcador para estudo de populações (KAVALCO *et al.*, 2004).

331 Diante disto, quando comparamos os dados aqui obtidos para *H. ancistroides*.
332 *H. hermanni* e *H. strigaticeps* com os dados presentes na literatura de outras
333 populações, é claramente notável a conservação do número diploide e que todas as
334 espécies apresentaram características particulares em relação a fórmula cariotípica,
335 sugerindo então, que rearranjos do tipo fissões/fusões cêntricas e também inversões
336 pericêntricas estão de fato atuando na diversificação de espécies de *Hypostomus*,
337 reforçando assim a hipótese proposta por Artoni e Bertollo (1996, 2001).

338 Os representantes do gênero *Hypostomus* são amplamente diversificados em
339 estrutura cariotípica, distribuição de heterocromatina, sítios ribossômicos, NORs; e
340 uma hipótese que também pode ser considerada para esta diversificação é o isolamento
341 geográfico, que permite com que alterações cromossômicas ocorram de maneira
342 independente entre as populações (RUBERT, 2007). Assim, os estudos citogenéticos
343 mostram ser marcadores eficazes para o entendimento da diversificação cromossômica

344 nos grupos de peixes neotropicais.

Tabela 1 –Dados citogenéticos disponíveis para *H. ancistroides*, *H. hermanni* e *H. strigaticeps* baseados em artigos originais. Legenda: **2n**= número diplóide; **m**= metacêntrico; **sm**= submetacêntrico; **st**= subtelocêntrico; **a**= acrocêntrico; **NORs**= regiões organizadoras nucleolares; **rDNA**= DNA ribossomal; **REF.**= Referências; ♀= Feminino; ♂= Masculino.

Espécie	Local de coleta	2n	NF	Fórmula cariotípica	Ag-RONs	18S rDNA	5S rDNA	Ref.
<i>Plecostomus ancistroides</i> (♀)		68	106	10m + 28sm + 30st/a				1
<i>Plecostomus ancistroides</i> (♂)		68	105	10m + 27sm + 31st/a				1
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Riacho Monjolinho, São Paulo	68	102	16m + 18sm + 34st/a	(10sm, 17sm, 18st/a)			2
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Araquá, São Paulo	68	96	18m + 10sm + 12st + 28a	(6m, 13sm, 14sm)			3
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Paranapanema, São Paulo	68	104	10m + 26sm + 32st/a	(19, 20, 21 e 22st-a)	(19, 20, 21 e 22st-a)		4
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Corumbataí, São Paulo	68	88	16m + 4sm + 16st + 32a	(1m, 10sm)			5
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Córrego Dourados, Paraná	68	56	14m + 12sm + 18st + 24a	(9sm, 10sm)			6
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Córrego Maringá, Paraná	68	57	16m + 12sm + 18st + 22a	(5m, 11sm, 15st)			6
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Córrego Ximbaúva, Paraná	68	52	8m + 10sm + 18st + 32a	(3m, 5sm, 9sm)			6
<i>Hypostomus aff. ancistroides</i>	Rio Tibagi, Paraná	66	104	12m + 16sm + 10st + 28a	(4 à 6 pares)	(4 à 6 pares)		7
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Piquiri, Paraná	68		14m + 14sm + 8st + 32a				8
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Piquiri, Paraná	68		14m + 14sm + 8st + 32a	(19st, 20st)			9
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Piquiri, Paraná	68		14m + 14sm + 8st + 32a	(19st, 20st)	(19st, 20st)	(5m)	10
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Riacho Hortelã, Rio Paranapanema	68	98	10m + 20sm + 10st + 28a	(12sm, 16st, 20st)	(12sm, 16st, 20st)	(15sm)	11
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Ribeirão da Lapa, Ipeúna, SP	68	120	14m + 16sm + 22st + 16a	(8sm, 13sm, 15sm)	(8sm, 13sm, 15sm)	(2m, 8sm, 13sm)	12
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Piquiri, Paraná	68		14m + 14sm + 8st + 32a	simples	(19a, 20a, 24a)	(5sm)	10
<i>H. aff. ancistroides</i> (♀)	Rio Keller, Bacia do rio Paraná	68	119	16m + 13sm + 22st + 17a	(7m, 9sm, 15st)	(7m, 9sm, 15st)	(8m, 21st)	13

<i>H. aff. ancistroides</i> (♂)	Rio Keller, Bacia do rio Paraná	68	118	16m + 12sm + 22st + 18a	(7m, 9sm, 15st)	(7m, 9sm, 15st)	(8m, 21st)	13
<i>H. aff. ancistroides</i> (♀)	Bacia do rio Paranapanema	66		16m + 12sm + 12st + 26a	(5m, 21a)	(5m, 21a)	(4m)	14
<i>H. aff. ancistroides</i> (♂)	Bacia do rio Paranapanema	66		17m + 12sm + 12st + 25a	(5m, 21a, Y)	(5m, 21a, Y)	(4m)	14
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Ribeirão Cambé, Londrina	68		14m + 16sm + 8st + 30a	(16st, 20a)	(16st, 20a)	(4m)	15
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Ribeirão Três Bocas, Londrina,	68		14m + 16sm + 8st + 30a	(15sm, 16st)	(15sm, 16st)	(4m)	15
<i>Hypostomus hermanni</i>	Rio Piquiri, Paraná	72		10m + 8sm + 32st + 22a	(27a, 29a, 33a)			9
<i>Hypostomus hermanni</i>	Rio Piquiri, Paraná	72		10m + 8sm + 32st + 22a		(27a, 29a, 33a)	múltiplos	10
<i>Hypostomus hermanni</i>	Rio Piracicaba, São Paulo	72	98	8m + 18sm + 46st/a	(16, 20, 22)	(20, 22)		16
<i>Hypostomus aff. hermanni</i>	Rio Keller, Paraná	72	124	12m + 22sm + 18st + 20a	(16sm, 22sm, 31a)	(16sm, 22sm, 31a)	(4m)	13
<i>Hypostomus hermanni</i>	Ribeirão Três Bocas, Londrina	72	110	10m + 20sm + 18st + 24a	(33a)	(33a)	(5m, 19st, 35,36a)	15
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Grande	74	86	8m + 4sm + 62st/a				1
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	72	102	12m + 18sm + 42st/a	(17st/a)			2
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Paranapanema	72	98	10m + 16sm + 46st/a	(18st/a, 28st/a)	18st/a, 28st/a)		4
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Corumbataí, São Paulo	74	98	10m + 14sm + 14st + 36a	(14st, 21a, 22a, 24a)			5
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Ivaí, Floresta, Paraná	72	96	10m + 14sm + 18st + 30a	(10sm, 14st, 18st, 29a)			6
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Piquiri, Paraná	72	96	12m + 12sm + 18st + 30a	(25a, 32a)			9
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Córrego Hortelã, Rio Paranapanema,	72	100	10m + 18sm + 18st + 26a	(28a)	(28a, 29a)	(3m, 18st, 22st, 26a, 31a, 32a)	11
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Piquiri, Paraná	72	96	12m + 12sm + 18st + 30a		(25a, 32a, 36a)	(4m, 21st, 26a)	10
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Riacho Atlântico, Paraná	72		12m + 12sm + 18st + 30a	(22a, 23a, 24a)	(22a, 23a, 24a)	(4m, 21st, 28a)	17

<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Piquiri, Paraná	72		12m + 12sm + 18st + 30a	(22a, 23a, 24a)	(22a, 23a, 24a)	(4m, 21st, 28a)	17
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Paraná, Paraná	72		12m + 12sm + 18st + 30a	(22a, 23a, 24a)	(22a, 23a, 24a)	(4m, 21st, 28a)	17
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Iguaçu, Paraná	72		12m + 12sm + 18st + 30a	(22a, 23a, 24a)	(22a, 23a, 24a)	(4m, 21st, 28a)	17
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo	72	98	10m + 16sm + 46st/a	(18st/a)	(18st/a)		16
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	Rio Laranjinha, Paraná	72	116	10m + 14sm + 20st + 28a	(23a, 32a)	(23a, 32a)	(4m, 21st)	15

Referências: **1-** Michele *et al.* (1977); **2-** Artoni e Bertollo (1996); **3-** Alves *et al.* (2006); **4-** Rubert *et al.* (2011); **5-** Alves *et al.* (2012); **6-** Endo *et al.* (2012); **7-** Maurutto *et al.* (2012); **8-** Bueno *et al.* (2012); **9-** Bueno *et al.* (2013); **10-** Bueno *et al.* (2014); **11-** Pansonato-Alves *et al.* (2013); **12-** Traldi *et al.* (2013); **13-** Lara-Kamei *et al.* (2017); **14-** Rocha-Reis *et al.* (2018), **15-** Presente estudo; **16-** Rubert *et al.* (2016); **17-** Baumgartner *et al.* (2014).

345 REFERÊNCIAS

- 346 ALMEIDA, F. S.; FUNGARO, M. H. P and SODRÉ, L. M. K (2001) RAPD and
347 isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes,
348 Pimelodidae) from the Tibagi river, Brazil. **J Zool** 253:113-120.
- 349 ALVES, A, L.; BORBA, R. S.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.;
350 FORESTI, F. (2012). Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical
351 catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae).
352 **Comparative Cytogenetics** 6(4): 443–452.
- 353 ALVES, A. L (2005). Análise da evolução da família loricariidae (Teleostei:
354 Siluriformes) com base em caracteres cromossômicos e de sequências de DNA. Ph.D.
355 Dissertation, Botucatu, São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade Estadual
356 Paulista, 150 pp.
- 357 ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C (2001) Trends in the karyotype evolution of
358 Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas** 134:201–210.
- 359 ARTONI, R. F.; VENERE, P. C.; BERTOLLO, L. A. C (1998) A heteromorphic
360 ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**
361 63:421–425.
- 362 ARTONI, R. F. & BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces,
363 Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus
364 *Hypostomus*. **Caryologia**, 49: 81-90. 1996.
- 365 BAUMGAERTNER, L.; PAIZ, L. M.; ZAWADZKI, C. H.; MARGARIDO, V. P.;
366 PORTELA CASTRO, A. L. D. B. (2014). Heterochromatin polymorphism and physical
367 mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in four populations of *Hypostomus strigaticeps*
368 (Regan, 1907) from the Paraná River Basin, Brazil: evolutionary and environmental
369 correlation. **Zebrafish**, 11(5), 479-487.
- 370 BECKER, Q. M. C.; CASTRO, R. J.; SILVA, A. M, VIZZOTTO, P. C. Cytogenetic
371 characterization of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) from
372 tributaries of the Vermelho river, Upper Paraguay river basin. **Biodiversidade**. 2014; 13:
373 2-13.
- 374 BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. 1978.
375 Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev. Brasil.**
376 **Genet.** 1: 103-120.
- 377 BITENCOURT, J. A.; AFFONSO, P. R. A. M.; GIULIANO-CAETANO, L.;
378 CARNEIRO, P. L. S.; Dias, A. L. (2012). Population divergence and peculiar
379 karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern
380 Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 11(2), 933-943.
- 381 BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Manual de identificação de**
382 **peixes do Pantanal Mato-grossense**. 1999.
383 BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo-Sistemática. **Poluição e**

- 384 **Piscicultura**. Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de pesca da coordenadoria
385 da Pesquisa de Recursos Naturais da Secretaria da Agricultura, 1972.
- 386 BUENO, V. et al. Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of
387 *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary tendencies in the
388 genus. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- 389 BUENO, V. *et al.* Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803
390 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. **Reviews in**
391 **Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n. 1, p. 103-112, 2013.
- 392 BUENO, V. *et al.* Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède,
393 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between
394 diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22,
395 n. 1, p. 241-250, 2012.
- 396 CEREALI, S. S. *et al.* Karyotype description of two species of *Hypostomus*
397 (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetics and**
398 **Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 583-591, 2008.
- 399 FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO-FILHO, S. A (1981).
400 Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic Cell Genet**,
401 31:137-144.
- 402 HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer
403 regions with a protective colloidal developer: as 1-step method. **Experientia** 36: 1014-
404 1015, 1980.
- 405 ISBRUCKER, I. J. H. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces,
406 Siluriformes). **Versl. Tech. Gegevens**, 22: 1-181. 1980.
- 407 KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O (2005)
408 Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**
409 94:180–186.
- 410 KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O (2004).
411 Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae
412 (Siluriformes). **Hereditas** 141:237–242.
- 413 LARA KAMEI, M. C. S. *et al.* Chromosomal diversity of three species of *Hypostomus*
414 Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from the Paraná River Basin, Brazil: a
415 species complex in *Hypostomus ancistroides* reinforced by a ZZ/ZW sex chromosome
416 system. **Zebrafish**, v. 14, n. 4, p. 357-363, 2017.
417
- 418 LARA-KAMEI, Marcia Cristina de Souza. Análise citogenética em espécies do gênero
419 *Hypostomus* Lacépède, 1803 (siluriformes: loricariidae) de afluentes da bacia do alto rio
420 Paraná-PR, Brasil: uma contribuição a diversidade cariotípica do gênero. 2015.

- 421 LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position
422 on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.
- 423 LUI, R. L.; BLANCO, D. R.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. Propidium
424 iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique.
425 **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, n. 7, p. 433-438, 2012.
- 426 MAURUTTO, F. A. M. *et al.* Cytogenetic characterization of three allopatric species of
427 *Hypostomus Lacépède* (1803) (Teleostei, Loricariidae). **Caryologia**, v. 65, n. 4, p. 340-
428 346, 2012.
- 429 MICHELE, J. L.; TAKAHASHI, C. S.; FERRARI, I. Karyotypic study of some species
430 of the family Loricariidae (Pisces). **Cytologia**, v. 42, n. 3-4, p. 539-546, 1977.
- 431 MILHOMEM, S.; CASTRO, R.; NAGAMACHI, C.; De SOUZA, A., FELDBERG, E.;
432 PIECZARKA J. (2010). Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus*
433 *Lacépède*, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region,
434 Brazil). **Comparative cytogenetics**, 4, 45.
- 435 PANSONATO-ALVES, José Carlos *et al.* Mapping five repetitive DNA classes in
436 sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of
437 chromosomal variability. **Reviews in fish biology and fisheries**, v. 23, n. 4, p. 477-489,
438 2013.
- 439 PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative,
440 high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of**
441 **Sciences of the USA**, v.83, p.2934-2938, 1986.
- 442 QUEIROZ, L. J. *et al.* (2020). *Evolutionary units delimitation and continental*
443 *multilocus phylogeny of the hyperdiverse catfish genus Hypostomus*. **Molecular**
444 **Phylogenetics and Evolution**, 145, 106711.
- 445 REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JR, C. J. **Check list of the freshwater**
446 **fishes of South and Central America**, Edipucrs, Porto Alegre, p. 742, 2003.
- 447 ROCHA-REIS, D. A. *et al.* The Persevering Cytotaxonomy: Discovery of a Unique
448 XX/XY Sex Chromosome System in Catfishes Suggests the Existence of a New,
449 Endemic and Rare Species. **Cytogenetic and genome research**, v. 156, n. 1, p. 45-55,
450 2018.
- 451 RUBERT, M.; da Rosa, R.; ZAWADZKI, C. H.; MARIOTTO, S.; MOREIRA-FILHO,
452 O.; GIULIANO-CAETANO, L. (2016). Chromosome mapping of 18S ribosomal RNA
453 genes in eleven *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae): diversity analysis of
454 the sites. **Zebrafish**, 13(4), 360-368.
- 455 RUBERT, M. *et al.* Cytogenetic characterization of four species of the genus
456 *Hypostomus Lacépède*, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its
457 chromosomal diversity. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 5, p. 397, 2011.

- 458 RUBERT, M.; ZAWADZKI, C. H.; GIULIANO-CAETANO, L. (2008) Cytogenetic
459 characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae).
460 **Neotropical Ichthyology** 6: 93–100. doi: 10.1590/S1679-62252008000100011.
- 461 RUBERT, M. **Estudos citogenéticos em diferentes populações de Hypostomus**
462 **(Loricariidae, Hypostominae)**. 2007. 136 f. Dissertação (Mestrado em Genética e
463 Biologia Molecular), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de
464 Londrina, Londrina,2007.
- 465 SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific
466 heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetic and**
467 **Genome Research**, v. 27, n. 2-3, p. 190-193, 1980.
- 468 SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.
469 **Exp. Cell Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- 470 TRALDI, J. B. *et al.* Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes,
471 Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genetics**
472 **and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p. 463-471, 2013.
- 473 ZAWADZKI, C. H.; BIRINDELLI, J. L. O.; LIMA, F. C. T. 2008a. A new pale-spotted
474 species of *Hypostomus* Lacépède (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Tocantins
475 and Xingu basins in central Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 6: 395-402.

CAPÍTULO 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE UMA POPULAÇÃO DE
Loricariichthys platymetopon (LORICARIIDAE, LORICARIINAE) DA REGIÃO
URBANA DE LONDRINA, PARANÁ.**

Kátia Fabiana dos Santos, Carolina Sarturi, Jaqueline Fernanda Dionisio e Lucia
Giuliano-Caetano

*Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445
Km 380, Campus Universitário, P.O. Box 6001, CEP 86051-970, Laboratório de Citogenética Animal,
Londrina, Paraná, Brasil. (KFS) katia.fabiana.santos97@uel.br, (CS) carolina.sarturi@uel.br, (JFD)
jaquedionisio@hotmail.com, (LGC) giuliano@uel.br*

12 **Este artigo será submetido à revista Neotropical Ichthyology como Short**
13 **Communication.**

14

Resumo

15 Os loricariíneos compreendem a segunda maior subfamília de peixes de água doce da
16 família Loricariidae. Aproximadamente 257 espécies são reconhecidas nesta subfamília,
17 e podem ser encontradas na região da Costa Rica, Panamá e em toda a América do Sul.
18 São caracterizadas pela presença de pedúnculo longo e deprimido e ausência de
19 nadadeira adiposa. Com apenas 17 espécies de cascudos-chinelos válidos, o gênero
20 *Loricariichthys* encontra-se amplamente distribuído nas bacias amazônicas até as
21 drenagens do sul; e, embora o diagnóstico deste gênero seja fácil, as espécies possuem
22 muitos conflitos taxonômicos pelo fato de serem muito semelhantes e a difícil
23 identificação torna este grupo alvo de erros por apresentarem alto grau de similaridade.
24 As similaridades das espécies são voltadas tanto para a morfologia externa quanto na
25 caracterização cromossômica, uma vez que os dados citogenéticos mostram uma
26 manutenção de número diploide de $2n=54$ cromossomos para quase todas as espécies já
27 cariotipadas com variações apenas na macroestrutura cromossômica. No presente
28 estudo, foi analisada uma população de *Loricariichthys platymetopon* provenientes do
29 Lago Igapó, região urbana de Londrina, pertencente a bacia do Alto Rio Paraná. As
30 técnicas citogenéticas empregadas foram coloração por Giemsa e fluorocromos
31 CMA/DAPI, impregnação por nitrato de prata, bandeamento C e Hibridação *in situ*
32 fluorescente com DNAr 18S e 5S. Os exemplares de *L. platymetopon* exibiram $2n=54$
33 cromossomos, com fórmula cariotípica de $8m+18sm+4st+24a$. O bandeamento C
34 evidenciou heterocromatina em apenas um par de cromossomos correspondente com a
35 constrição secundária observada pela Giemsa. Sítios ricos em bases AT foram
36 encontrados em regiões pericentroméricas e terminais de quase todo o conjunto
37 cromossômico e uma marcação rica em bases CG pode ser evidenciado em apenas um
38 par de cromossomos. As regiões organizadoras de nucléolos foram coincidentes com os
39 locais de DNAr 18S, estando presente na região terminal do braço curto do par 14.
40 Neste mesmo par, houve uma condição sintênica entre as sondas de DNAr 18S e DNAr
41 5S, e um par submetacêntrico também exibiu sítios ribossômicos 5S. O par 14
42 subtelocêntrico é considerado um par marcador espécie-específicos, visto que ele é
43 encontrado em todas as demais populações de *L. platymetopon* já analisadas. A estrutura
44 cariotípica desta população difere das demais populações estudadas, sugerindo que
45 essas variações estão ocorrendo por meio de rearranjos cromossômicos do tipo
46 inversões pericêntricas.

47 **Palavra-chaves:** Loricariinae. Inversões Cromossômicas. Evolução cariotípica.
48 *Loricariichthys*.

49 **Introdução**

50 Loricariidae, pertencente à ordem Siluriformes, é a mais especiosa família
51 dentre todos os demais grupos de peixes neotropicais. Reconhecida popularmente como
52 cascudos, esta família possui cerca de 1015 espécies válidas (FRICKE *et al.*, 2022).
53 Dividida em seis subfamílias (COVAIN *et al.*, 2016; ROXO *et al.*, 2019), a subfamília
54 Loricariinae possui cerca de 257 espécies válidas e aproximadamente 30 gêneros
55 (FRICKE *et al.*, 2022). Os loricariíneos são representados por peixes de tamanho
56 pequeno a médio porte chamados de cascudos-chinelos, e se diferem dos demais por
57 apresentarem um pedúnculo caudal longo e ausência de nadadeira adiposa (FERRARIS,
58 2003; FERRARIS, 2007).

59 A monofilia filogenética mais recente da subfamília Loricariinae proposta por
60 COVAIN *et al.* (2016) e ROXO *et al.* (2019) reavaliou e confirmou que ela é
61 subdividida em duas tribos: Harttiini e Loricariini. Dentro de Loricariini, o gênero
62 *Loricariichthys* (Bleeker, 1862), com apenas 17 espécies, é um grupo com ampla
63 distribuição na bacia amazônica, no sistema do Paraná e nos rios costeiros dos Escudos
64 da Guiana e do Brasil. Embora seja facilmente diagnosticado devido a morfologia
65 externa, as espécies deste gênero são muito semelhantes e ocasiona na maioria das
66 vezes, erros de identificação devido ao alto grau de similaridade (FERRARIS, 2003).
67 Segundo Covain e Fish-Muller (2007), a falta do holótipo e da localidade tipo tem
68 levado este gênero a uma incerteza taxonômica, indicando necessidade de uma revisão
69 mais ampla.

70 Ainda que escassos, os dados citogenéticos em *Loricariichthys* mostram uma
71 manutenção de $2n=54$ cromossomos em *Loricariichthys* *sp.* (FENNOCHIO *et al.*,
72 1990), *L. anus* (TAKAGUI *et al.*, 2014, 2020) e *L. platymetopon* (SCAVONE E JÚLIO
73 JR, 1995; TAKAGUI *et al.*, 2014, 2020) entretanto, exemplares de $2n=56$ cromossomos

74 já foram relatados em *L. s maculata* (Fenocchio *et al.*, 2003), assim como um sistema de
75 cromossomos sexuais ZZ/ZW para uma população de *L. platymetopon* por SCAVONE
76 e JÚLIO-JR (1995). Embora o número diploide se mantenha conservado na maioria das
77 espécies analisadas, variações na estrutura cariotípica são constantes e pouca
78 heterocromatina é encontrada, preferencialmente em região pericentromérica sintênica
79 aos genes ribossomais e às NORs. O objetivo deste estudo foi caracterizar o cariótipo de
80 uma população de *Loricariichthys platymetopon*, por meio de diferentes técnicas
81 citogenéticas e relacionar com os dados descritos na literatura, com o intuito de tentar
82 inferir hipóteses que estejam relacionadas na evolução cariotípica da espécie.

83 **Materiais e Métodos**

84 **Espécimes e local de coleta**

85 Um total de 34 exemplares de *Loricariichthys platymetopon* (15 machos e 19
86 fêmeas) foram coletados no Ribeirão Cambé, Afluente do Rio Tibagi, no município de
87 Londrina, Paraná, Brasil. Todos os espécimes foram coletados com tarrafas com
88 autorização do IBAMA-SISBIO nº 11399-1. Posteriormente, foram fixados,
89 identificados e depositados no acervo zoológico do Museu de Zoologia da Universidade
90 Estadual de Londrina (voucher MZUEL: 21108). A conduta experimental foi aprovada
91 pelo Comitê de Ética no uso de animais da UEL, protocolo número 60/2017.

92 **Obtenção cromossômica, coloração e bandeamentos**

93 Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com o protocolo de Bertollo
94 *et al.* (1978), que consiste na dissociação do tecido renal. As lâminas foram coradas
95 com Giemsa e as metáfases fotografadas usadas para determinar o número diploide e
96 montagem do cariótipo, posteriormente os cromossomos foram medidos com o software
97 EasyIdio e classificados em metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico
98 (st) e acrocêntrico (a), de acordo com Levan *et al.* (1964). Os cariótipos foram

99 organizados pelo programa Adobe Photoshop CS6. As regiões organizadoras de
100 nucléolos foram detectadas por impregnação com nitrato de prata, seguindo o protocolo
101 de Howell & Black (1980). A heterocromatina constitutiva foi detectada por
102 bandeamento-C proposto por Sumner (1972), com modificação na coloração, usando o
103 fluorocromo Iodeto de Propídeo, conforme Lui *et al.* (2012). Regiões ricas em CG e AT
104 foram detectadas com fluorocromos CMA₃ e DAPI, respectivamente, de acordo com o
105 protocolo descrito por Schweizer (1980).

106 **Extração de DNA**

107 O DNA genômico total de *Loricariichthys platymetopon* foi extraído a partir da
108 musculatura, empregando o protocolo baseado em fenol/clorofórmio proposto por
109 Almeida *et al.* (2001) e uma amostra foi utilizada para a preparação das sondas DNAr
110 18S e DNAr 5S.

111 **Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)**

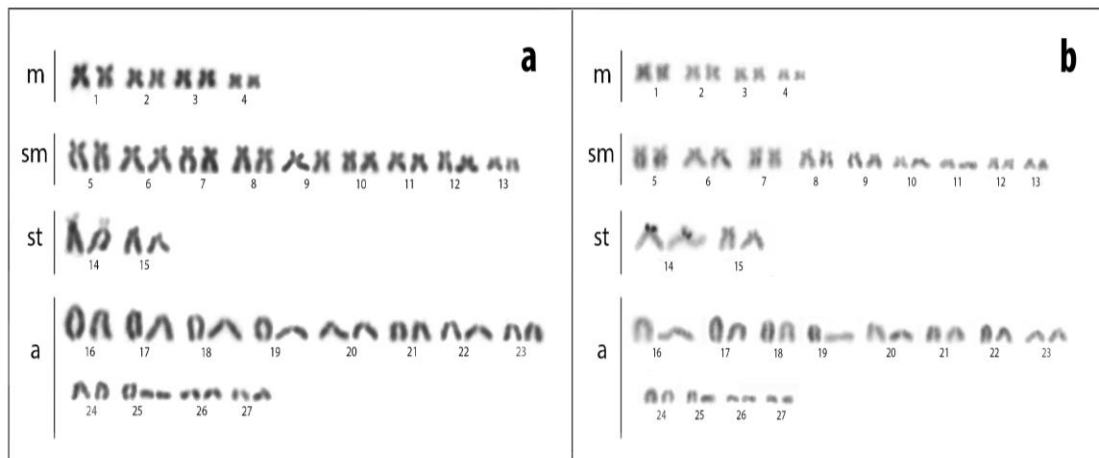
112 A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com o
113 protocolo de Pinkel *et al.* (1986), com algumas adaptações. A sonda de DNAr 18S
114 obtida de *L. platymetopon* foi marcada com Digoxigenina e detectada com anti-
115 digoxigenin-rhodamina (Roche) e a sonda de DNAr 5S marcada com Biotina e
116 detectada com biotinylated anti-avidin (Sigma-Aldrich). Os cromossomos foram
117 contracorados com o fluorocromo 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI, 2µg/ml) e
118 analisadas em um microscópio de epifluorescência (Leica DM2000), equipado com uma
119 câmera digital. As imagens foram capturadas usando o Leica Application Suite versão
120 3.1.0. (Leica Microsystems).

121

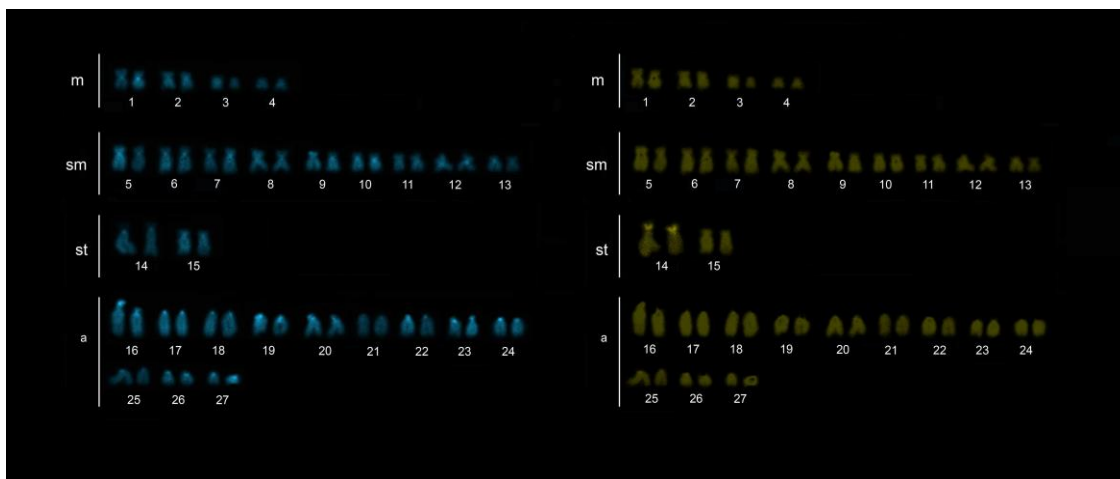
122 **Resultados**

123 *Loricariichthys platymetopon* (Isbrucker & Nijssen, 1979) apresentou 2n=54

124 cromossomos e fórmula cariotípica de 8m+18sm+4st+24a, com uma constrição
 125 secundária no braço curto do par 14 (Fig.1a), e o bandeamento C revelou
 126 heterocromatina neste mesmo par 14, coincidente com a constrição (Fig.1b), assim
 127 como a coloração com CMA3, configurando uma região rica em bases GC (Fig. 2). A
 128 coloração com fluorocromo DAPI revelou a presença de regiões ricas em AT em quase
 129 todos os cromossomos, preferencialmente na região pericentromérica e terminal
 130 (CMA₃⁺/DAPI⁺) (Fig. 2). A impregnação pelo nitrato de prata foi coincidente com o
 131 DNAr 18S, na qual revelaram marcação na região do braço curto do cromossomo
 132 subtelocêntrico (par 14), concidente com a constrição secundária observada pela
 133 Giemsa (Fig. 3 e box). Já a sonda de DNAr 5S revelou quatro sítios, estando presente na
 134 região proximal do braço longo do par 8 submetacêntrico e na região intersticial do
 135 braço longo do par 14 (sintênico com o DNAr 18S) (Fig. 3).

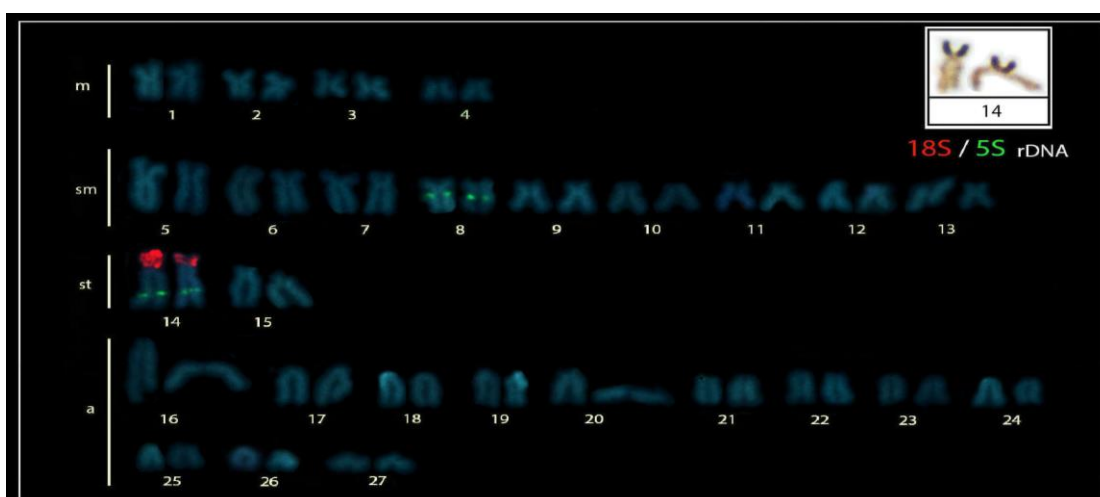


136
 137 **Fig. 1** – Cariótipos de *L. platymetopon*. Coloração com (a) Giemsa e (b) Banda C.
 138 Observe a constrição no par 14 (a) coincidente com a heterocromatina (b).



139
140
141

Fig. 2 – Cariótipos de *L. platymetopon* coradas com dupla coloração DAPI (azul) e CMA₃ (amarelo). Observe o par 14 com DAPI negativo e CMA positivo.



142
143
144
145

Fig. 3 – Cariótipo de *L. platymetopon* com a double FISH com DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). No box, par cromossômico 14 com NORs após Impregnação com Nitrato de Prata.

146 **Discussão**

147 Os estudos citogenéticos disponíveis para o gênero *Loricariichthys* são escassos,
148 uma vez que das 17 espécies descritas, apenas 3 (ou 4) foram analisadas e, além de
149 apresentarem similaridades na morfologia externa (COVAIN & FISCH-MULLER,
150 2007), há a existência de número diploide igual para duas das três espécies
151 cariotipadas, apresentando $2n=54$ cromossomos em *L. anus*, *L. platymetopon*; onde
152 somente *L. maculata* exibiu número diploide de $2n=56$ (FENNOCHIO *et al.*, 2003). O
153 número diploide de $2n=54$ manteve-se conservado na população de *L. platymetopon*

154 analisada neste estudo, diferindo das demais populações apenas em relação à estrutura
155 cariotípica. Enquanto em *L. platymetopon* do presente estudo a constituição cariotípica
156 de 26m/sm+28st/a, Takagui *et al.* (2014) e Scavone e Júlio-Jr (1995) encontraram uma
157 variação interpopulacional, sendo que a população analisada mais recentemente por
158 Takagui *et al.* (2020) apresentava 10m+16sm+28a para as duas populações. Assim
159 como Artoni e Bertollo (2001) sugerem que $2n=54$ é uma característica ancestral em
160 Loricariidae e que a ocorrência desse número diplóide em Loricariinae é rara, sendo
161 encontrada em duas espécies de Rineloricaria e em apenas espécies do gênero
162 *Loricariichthys*, poucas variações essas encontradas na macroestrutura cariotípica das
163 populações analisadas por Takagui *et al.* (2014) e Scavone e Júlio-Jr (1995) e do
164 presente estudo deve-se à rearranjos cromossômicos do tipo inversão pericêntrica, uma
165 vez que o número diploide não sofreu alterações. Na tribo Loricariini, apenas a
166 população de *L. platymetopon* observada por Scavone e Júlio-Jr (1995) apresentou
167 sistema sexual ZZ/ZW até o momento, mostrando a diversificação na espécie.
168 Entretanto, quando comparado com os dados da tribo Harttiini, nota-se que *Harttia*
169 *carvalhoi* e *Harttia punctata* também apresentam sistema sexual do tipo múltiplo
170 identificado (BLANCO *et al.*, 2017; BLANCO *et al.*, 2014; BLANCO *et al.*, 2013).

171 As populações de *L. platymetopon* dos rios Jacutinga e Paranapanema analisadas
172 por Takagui *et al.* (2014) apresentaram heterocromatina preferencialmente em regiões
173 pericentroméricas para *L. anus*, enquanto que a população de *L. platymetopon* coletada
174 no Rio do Peixe, afluente direto do Alto Paraná, analisado por Rodrigues (2010), as
175 regiões heterocromáticas estiveram presentes também em regiões pericentroméricas de
176 quase todo o complemento cromossômico. Para Loricariidae, a distribuição e número de
177 regiões heterocromáticas é considerada variável (KAVALCO *et al.*, 2004), em
178 Loricariinae a falta de grandes blocos heterocromáticos parece ser um caráter ancestral

179 nos peixes desta subfamília (ZIEMNICZAK *et al.*, 2012), padrão este observado em
180 todas as espécies de *Loricariichthys* já cariotipadas.

181 *Loricariichthys platymetopon* é a espécie mais amplamente distribuído dentro
182 do gênero (FERRARIS, 2003), ocorrendo desde a bacia amazônica até as drenagens do
183 sul. Mais ao sul, ocorre nas bacias dos rio Paraguai, Baixo rio Paraná e Baixo e Médio
184 rio Uruguai. Considerando as populações de *Loricariichthys platymetopon* analisadas
185 por Takagui *et al.* (2014, 2020) do rio Jacutinga, pertencente a bacia do rio Paraná e a
186 população analisada no presente, aparentemente não há barreiras geográficas separando
187 as populações; sendo possível inferir que estas populações estão se adaptando e fica
188 notório que as diversificações entre ambas deve-se à rearranjos cromossômicos que
189 estão atuando no grupo, uma vez que não há indícios de fluxo gênico entre elas.

190 Este estudo traz os primeiros dados com fluorocromos CMA₃ e DAPI no gênero
191 *Loricariichthys*. Entretanto, um padrão semelhante a este é corroborado com os dados
192 de Benitez *et al.*(2016) para *Loricaria simillima*, onde afirma que presença de regiões
193 ricas em CG é esperado devido à riqueza de nucleotídeos guanina e citosina na região
194 da NOR em vertebrados.

195 Nas espécies de *Loricariichthys* analisadas até o momento, o fenótipo de NOR
196 simples e em posição intersticial em Loricariinae é uma característica plesiomórfica
197 (ZIEMNICZAK *et al.*, 2012), pois é um padrão comum nas subfamílias mais basais de
198 Loricariidae, como em Neoplecostominae e Hypoptopomatinae (ALVES *et al.*, 2005).
199 RONS terminais únicas foram encontradas em *Loricariichthys platymetopon*,
200 posteriormente confirmada pela FISH com sonda de DNAr18S; e este padrão único foi
201 descrito para quase todas as espécies de Loricariinae, todavia, excepcionalmente as
202 espécies de *L. platymetopon* provenientes dos rios Jacutinga e Paranapanema
203 (TAKAGUI *et al.* 2014) e do rio Miranda (TAKAGUI *et al.* 2020) assim como do

204 presente estudo, os sítios de Ag-NORs e DNAr 18S estavam presentes no mesmo par de
205 cromossomo 14 subtelocêntrico, indicando que este seja um marcador espécie-
206 específico para identificação desta espécie.

207 Enquanto o DNAr 18S em *Loricariichthys* é frequentemente detectado em
208 apenas um par cromossômico, apenas duas populações de *Loricariichthys*
209 *platymetopon*, incluindo deste estudo, tiveram seus genes de DNAr 5S mapeados; a
210 população do rio Miranda apresentou sítios nos pares 9 e 14 (TAKAGUI *et al.*, 2020
211 neste estudo a espécie apresentou nos pares 8 e 14. Além disso, ambos ainda
212 apresentaram uma condição sintênica no par 14 entre as sondas de DNAr18S e
213 DNAr5S, confirmando este par como espécie específico. A presença de DNAr 5S
214 múltiplos é uma característica comum para algumas espécies da tribo Loricariinae,
215 como em *Sturisoma barbatum* (TAKAGUI *et al.*; 2020), *Rineloricaria capitonia*, *R.*
216 *stellata*, *R. pentamaculata* (PRIMO *et al.*; 2017, 2018) e *R. latirostris* (PRIMO *et al.*;
217 2017, 2018; GLUGOSKI *et al.*, 2018). Segundo Kavalco *et al.*, (2004), essas variações
218 no número e localização do DNAr 5S podem ser resultados de dispersão de elementos
219 transponíveis e fica evidente que o DNAr 5S é um excelente marcador citotaxômico
220 para estudo de populações.

221 Desta forma, analisando a população de *Loricariichthys platymetopon* do rio
222 Jacutinga (TAKAGUI *et al.*, 2020) e a do presente estudo, concluímos este trabalho
223 propondo duas possíveis hipóteses para a diversificação cromossômica desta espécie: a
224 primeira hipótese corrobora com os dados da literatura de que a existência de rearranjos
225 do tipo inversões pericêntricas marcaram a variação cariotípica desta espécie assim
226 como nas demais da subfamília; e a segunda seria que estas espécies estão evoluindo
227 dentro de seus próprios sistemas hidrográficos, acumulando diferenças apenas na
228 estrutura cromossômica, uma vez que o número diploide permanece constante.

229 REFERÊNCIAS

- 230 ALMEIDA, F. S.; FUNGARO, M. H. P and SODRÉ, L. M. K (2001) RAPD and
231 isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes,
232 Pimelodidae) from the Tibagi river, Brazil. **J Zool** 253:113-120.
- 233 ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of
234 eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes:
235 Loricariidae). **Genetica**, 124:127-136. 2005.
- 236 ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C (2001) Trends in the karyotype evolution of
237 Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas** 134:201–210.
- 238 BENITEZ, M. F.; PASTORI, M C.; GARRIDO, G. G.; TAKAGUI, F. H.; GIULIANO,
239 L.; FENOCCHIO, A. S. First cytogenetic characterization of *Loricaria simillima*
240 (*Loricariidae*, *Siluriformes*) from Parana River (Argentina) with emphasis in
241 cytotaxonomy of *Loricaria*. **Caryologia** 2016;70:29–33.
- 242 BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. 1978.
243 Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev. Brasil.**
244 **Genet.** 1: 103-120
- 245 BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; TRALDI, J. B.; BUENO, V.;
246 MARTINEZ, J. F. *et al.* Karyotype diversity and evolutionary trends in armored catfish
247 species of the genus *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae). **Zebrafish** 2017;14:169–176.
- 248 BLANCO, D.R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; ARTONI, R. F.; ALMEIDA, M. C.;
249 TRALDI, J. B. Origin of the X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system of *Harttia*
250 *punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with
251 ribosomal DNA markers. **Genetica** 2014;142:119–126.
- 252 BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; TRALDI, J. B.; BERTOLLO, L. A. C.;
253 MOREIRA-FILHO, O. The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the
254 XX/XY1Y2 sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia*
255 species (Siluriformes, Loricariidae). **Rev Fish Biol Fish** 2013;23:127–134.
- 256 COVAIN, R. *et al.* Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily
257 Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with morphological
258 classification. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 94, p. 492-517, 2016.
- 259 COVAIN, R.; FISCH-MULLER, S (2007). The genera of neotropical armored catfish
260 subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae): a practical key and synopsis.
261 **Zootaxa**, 1462: 1-40.
- 262 FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; RONCATI, H. A.; MOREIRA-FILHO, O.;
263 BERTOLLO, L. A. C. A cytogenetic survey of the fish fauna from Argentina.
264 **Caryologia** 2003;56:197–204.
- 265 FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C.; LÓPEZ, P. (1990). Análise preliminar em
266 Siluriformes do baixo Paraná (Misiones, Argentina). I. *Bunocephalus cf. larai* e

- 267 *Loricariichthys sp.* In: **III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes**
268 **Neotropicais. Botucatu, SP, pp. 25.**
- 269 FERRARIS, C. J. (2007). Checklist of catfishes, recente and fóssil (Osteichthyes:
270 Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, 1418: 1-628.
- 271 FERRARIS, C. J. (2003). Subfamily Loricariinae (Armored catfishes). In: Check list of
272 the freshwater fishes of South and Central America (REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.;
273 FERRARIS, C. J, orgs). **EDIPUCRS**, p.330-350, Porto Alegre, RS.
- 274 FRICKE, R.; ESCHMEYER, WN & VAN DER LAAN, R. (eds) 2022. **CATÁLOGO**
275 **DE PEIXES DE ESCHMEYER: GÊNEROS, ESPÉCIES,**
276 **REFERÊNCIAS.**[http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/ccatalogo/fi](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/ccatalogo/fishcatmain.asp)
277 [shcatmain.asp](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/ccatalogo/fishcatmain.asp). Versão eletrônica acessada em 24/02/2022.
- 278 GLUGOSKI, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R.;
279 NOGAROTO, V. Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial
280 telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish.
281 *Gene* 2018;650:49–54.ribosomal DNA markers. **Genetica** 2014;142:119–126. 26.
- 282 HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer
283 regions with a protective colloidal developer: as 1-step method. **Experientia** 36: 1014-
284 1015, 1980.
- 285 KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O (2004).
286 Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae
287 (Siluriformes). **Hereditas** 141:237–242.
- 288 LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position
289 on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.
- 290 LUI, R. L.; BLANCO, D. R.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. Propidium
291 iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique.
292 **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, n. 7, p. 433-438, 2012.
- 293 PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative,
294 high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of**
295 **Sciences of the USA**, v.83, p.2934-2938, 1986.
- 296 PRIMO, C. C.; GLUGOSKI, L.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V. Chromosome
297 mapping and molecular characterization of the Tc1/Mariner element in Rineloricaria
298 (Siluriformes: Loricariidae). **Braz Arch Biol Technol** 2018;61:e18170623.
- 299 PRIMO, C. C.; GLUGOSKI, L.; ALMEIDA, M. C.; ZAWADZKI, C. H.; MOREIRA-
300 FILHO, O.; VICARI, M. R.; *et al.* Mechanisms of chromosomal diversification in
301 species of Rineloricaria (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). **Zebrafish**
302 2017;14: 161–168.

- 303 RODRIGUES, Raquel Maria. **Estudos cromossômicos e moleculares em**
304 **Loricariinae com ênfase em espécies de Rineloricaria (Siluriformes, Loricariidae):**
305 **uma perspectiva evolutiva.** 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- 306 ROXO, Fábio F. et al. Phylogenomic reappraisal of the Neotropical catfish family
307 Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) using ultraconserved elements. **Molecular**
308 **phylogenetics and evolution**, v. 135, p. 148-165, 2019.
- 309 SCAVONE, M. D. P.; JÚLIO-JR, H. F. Cytogenetics analysis and heterochromatin
310 distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys*
311 *platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). **Rev Bras Genet** 1995;18:31–35.
- 312 SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific
313 heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetic and**
314 **Genome Research**, v. 27, n. 2-3, p. 190-193, 1980.
- 315 SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.
316 **Exp. Cell Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- 317 TAKAGUI, F. H. *et al.* Unrevealing the karyotypic evolution and cytotaxonomy of
318 armored catfishes (Loricariinae) with emphasis in *Sturisoma*, *Loricariichthys*, *Loricaria*,
319 *Proloricaria*, *Pyxiloricaria*, and *Rineloricaria*. **Zebrafish**, v. 17, n. 5, p. 319-332, 2020.
- 320 TAKAGUI, F. H.; VENTURELLI, N. B.; DIAS, A. L.; SWARCA, A. C, VICARI, M.
321 R.; FENOCCHIO, A. S.; *et al.* The importance of pericentric inversions in the
322 karyotypic diversification of the species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys*
323 *platymetopon*. **Zebrafish** 2014;11:300–305.
- 324 ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A. V.; ROSA, K. O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.
325 C.; CESTARI, M. M.; *et al.* Comparative cytogenetic of Loricariidae (Actinopterygii:
326 Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Ital. J. Zool.**
327 2012;79: 492–501.