

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL, MOLECULAR E GENÉTICA

GEIZE APARECIDA DEON

CITOGENÉTICA COMPARATIVA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL EM
Neoplecostomus (SILURIFORMES: LORICARIIDAE) EM AFLUENTES DO RIO
PARANÁ

PONTA GROSSA

2017

GEIZE APARECIDA DEON

CITOGENÉTICA COMPARATIVA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL EM
Neoplecostomus (SILURIFORMES: LORICARIIDAE) EM AFLUENTES DO RIO
PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia Evolutiva.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Co-orientadora: Prof.^a Dr^a Carla Andreia Lorscheider

PONTA GROSSA

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

D418 Deon, Geize Aparecida
 Citogenética comparativa e estruturação
 populacional em Neoplecostomus
 (Siluriformes: Loricariidae) em afluentes
 do Rio Paraná/ Geize Aparecida Deon. Ponta
 Grossa, 2017.
 73f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Biológicas - Área de Concentração:
 Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
 de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo
 Vicari.

 Coorientadora: Prof^a Dr^a Carla Andreia
 Lorscheider.

 1.DNA Barcoding. 2.COI.
 3.Neoplecostominae. I.Vicari, Marcelo
 Ricardo. II. Lorscheider, Carla Andreia.
 III. Universidade Estadual de Ponta
 Grossa. Mestrado em Ciências Biológicas.
 IV. T.

CDD: 576.312.32

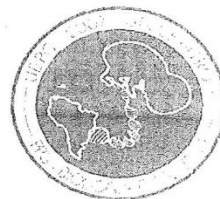


Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 08/2017

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Geize Aparecida Deon**.

Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, no auditório do Programa, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Marcelo Ricardo Vicari em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Geize Aparecida Deon**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Marcelo Ricardo Vicari (Orientador UEPG), Dr^a Lucia Giuliano Caetano (UEL) e Dr^a Kaline Ziemniczak (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Citogenética Comparativa e Estruturação Populacional em *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) em Afluentes do Rio Paraná**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 90 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título. recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 24 de fevereiro de dois mil e dezessete.

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari (UEPG)

Prof^a Dr^a Lucia Giuliano Caetano (UEL)

Prof^a Dr^a Kaline Ziemniczak (UEPG)

[Assinaturas manuscritas]
Lucia Giuliano Caetano
Kaline Ziemniczak

*Dedico este trabalho aos meus pais Valdir e Joice
e ao meu irmão Carlos Vitor.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer neste momento todo o modo de apoio e auxílio que recebi para a elaboração deste trabalho.

Ao meu orientador professor Dr. Marcelo Ricardo Vicari, pela grande oportunidade que me concedeu em ser sua orientada. Muito obrigada por todos os seus ensinamentos, ajuda na bancada e coletas. Tenho profunda admiração pelo profissional e ser humano incrível que você é.

Aos meus pais Valdir Deon e Joice do Nascimento por toda a educação que recebi de vocês e incentivo a estudar sempre. Obrigada por me apoiarem em mais esta etapa.

Especialmente à minha mãe Joice por todo amor incondicional. Você foi, é e sempre será pra mim a melhor mãe do mundo. Obrigada por sempre compreender minha ausência e apoiar meus planos. Você é o meu exemplo. Amo muito você!

Ao meu irmão caçula, Carlos Vitor Deon que, embora não esteja sempre comigo, não mediu esforços em me apoiar e incentivar. Você é o meu orgulho!

Aos meus familiares Rita, Rafaella, Wilson, Carla e Rodrigo, em especial aos meus avós Ernesto e Neuza (*in memoriam*) pelo seu incentivo e apoio aos meus estudos, mas principalmente por todo amor e carinho que recebi e tenho recebido.

Ao Vitor Sena Koseira, por toda ajuda que recebi de ti nestes dois anos com as coisas do mestrado, que foi desde fermentar peixes até montar soluções. Muito obrigada por todo apoio, carinho e paciência.

À professora Dr^a Viviane Nogaroto Vicari, por toda ajuda prestada com a parte laboratorial, sempre esclarecendo dúvidas e auxiliando ao máximo possível. Obrigada por todo carinho e amizade.

Ao professor Dr. Orlando Moreira-Filho do Departamento de Genética da Universidade Federal de São Carlos.

À minha co-orientadora Professora Dr^a Carla Andreia Lorscheider da Universidade Estadual do Paraná, Campus União da Vitória, por me ajudar nos primeiros passos com a citogenética de peixes ainda na graduação.

Ao professor Dr. Rafael Bueno Noleto da Universidade Estadual do Paraná, Campus União da Vitória e ao professor Dr. Fabio André Santos do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa por todo auxílio prestado.

Aos meus colegas do CBSF LAB: Amanda, Alain, Caroline Machado, Caroline Rosa, Daiane, Emanuel, Fernanda, Gabriela, Kaline, Larissa, Lucas, Marcela, Michele, Michelle, Rafael e Thais e Viviane. Dentre todos, gostaria de agradecer especialmente:

Ao Rafael Almeida por toda ajuda com as coletas, mas especialmente pela ajuda com todas as análises moleculares. Muito obrigada por toda sua atenção e paciência, sua ajuda foi fundamental. O mérito deste trabalho também é seu.

À minha parceira de laboratório Larissa Glugoski que no decorrer desses dois anos se aproximou de mansinho e tornou uma grande amiga pra vida toda. Muito obrigada por todo seu apoio, incentivo e paciência comigo. Obrigada de coração!

Ao Alain Barros por todo o auxílio com a captura dos peixes, procedimentos citogenéticos e por estar sempre pronto e disposto a ajudar.

À Kaline Ziemniczak, Marcela Baer Pucci e Michelle Orane que sempre estiveram à disposição para tirar dúvidas e auxiliar em procedimentos práticos no laboratório.

Às minhas co-orientadas de iniciação científica, Fernanda Oliveira e Gabriela Cardoso pela prontidão em me ajudar sempre que eu solicitei.

Às minhas amigas: Emanuelli, Katia, Letícia e Merieli pelo apoio e carinho sempre.

Aos amigos da Citogenética de Insetos: Beatriz Raicoski, Bruno Kubis, Matheus Azambuja e Leonardo Goll pela amizade e pelos momentos de descontração.

À Professora Dr^a Elaine Regina Lopes Tiburtius do Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo apoio com reagentes e equipamentos.

Ao departamento de Agronomia da UEPG, especialmente a acadêmica Letícia Marise Lamana pelo auxílio prestado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da UEPG e a todo o seu corpo docente.

Aos colegas da Pós-Graduação: Caroline, Fabiane, Kamylla, Larissa, Louise, Miguel, Solange, Vanessa e William. Em especial, gostaria de agradecer à Louise por ter se tornado uma grande amiga e estar sempre à disposição para o que precisar.

Às agências de fomento CNPq, CAPES, Fundação Araucária, SETI e FAPESP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram com esta pesquisa.

"Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo. Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas. E sabe por quê? Porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos."

Walter Elias Disney

RESUMO

Loricariidae é uma das maiores famílias de peixes de água doce com 931 espécies válidas distribuídas em 100 gêneros. As espécies pertencentes a essa família são popularmente conhecidas como cascudos que possuem um corpo achatado, coberto por placas ósseas, e boca ventral em forma de ventosa. Pertencente à família Loricariidae e a subfamília Neoplecostominae, o gênero *Neoplecostomus* compreende espécies de tamanho pequeno que habitam riachos da região sul e sudeste do Brasil. O gênero apresenta interesse em estudos genéticos, visto que é composto por espécies vágeis e que, por raramente migrarem, podem acumular diferenças genéticas entre populações. Das dezesseis espécies válidas descritas até o momento para este gênero, oito foram descritas para a bacia do rio Paraná e há evidências da ocorrência de novas espécies para esta bacia. Sendo assim, este estudo teve como objetivo estudar a diferenciação cariotípica e a diversificação genética no gênero *Neoplecostomus* das bacias hidrográficas dos rios Iguaçu, Itararé, Cinzas e Tibagi com vistas ao entendimento da evolução cariotípica e descrição da biodiversidade. Para isso, foram realizadas coletas em quatro localidades: rio Pinhão (*Neoplecostomus* sp. 1), rio Samambaias (*Neoplecostomus* cf. *botucatu*), rio das Pedras (*Neoplecostomus* sp. 2) e rio São João (*Neoplecostomus yapo*). Os dados citogenéticos revelaram um número diploide de 54 cromossomos para as quatro populações, poucas regiões heterocromáticas e sítios cromossomo independentes para os genes ribossomais 5 e 18S. Os resultados citogenéticos evidenciam uma alta estabilidade cariotípica, observado também na subfamília Neoplecostominae. Foram realizadas análises moleculares envolvendo o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) e todas as distâncias genéticas foram superiores a 4,7 %. Além disso, contrários à estabilidade cromossômica, os dados de distância genética evidenciaram ausência de fluxo gênico e estruturação populacional, além de sugerir uma provável espécie de *Neoplecostomus* não descrita para o rio Pinhão, bacia do rio Iguaçu.

Palavras-chave: DNA *Barcoding*, COI, Neoplecostominae.

ABSTRACT

The Loricariidae family is one of the largest families of freshwater fishes, with 931 species distributed in 100 genera. Loricariidae members are popularly known as armored catfishes and characterized by a depressed body, covered by bony plates and a ventral sucker mouth. Inside the subfamily Neoplecostominae, the genus *Neoplecostomus* comprises small species that inhabit streams of south and southeast regions of Brazil. This genus is interested in genetic studies because they rarely migrate and can accumulate genetic differences between populations. Of the sixteen valid species described so far for this genus, eight were described for the Paraná river basin and there is evidence of new species occurring in this basin. Therefore, the objective of this study was to analyze the karyotype differentiation and genetic diversification in the genus *Neoplecostomus* from Iguaçu, Itararé, Cinzas and Tibagi river basins, with the goal of understand the karyotype evolution and biodiversity. The specimens were captured at four localities: Pinhão river (*Neoplecostomus* sp. 1), Samambaias river (*Neoplecostomus* cf. *botucatu*), Pedras river (*Neoplecostomus* sp. 2) and São João river (*Neoplecostomus yapo*). Cytogenetic data revealed a diploid number of 54 chromosomes to the four populations, few heterochromatic regions and independent chromosome sites for 5S and 18S ribosomal genes. The cytogenetic results revealed a high karyotypic stability, which is also observed for the subfamily Neoplecostominae. Also, were performed molecular analyzes by mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene (COI) amplification, where all genetic distances were higher than 4.7%. In addition, contrary to chromosome stability, genetic distance data also showed absence of gene flow, population structure and suggested a probable *Neoplecostomus* species not described yet for Pinhão river at Iguaçu basin.

Keywords: DNA *Barcoding*, COI, Neoplecostominae.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação entre as espécies descritas de *Neoplecostomus* (até o presente momento) e suas áreas de distribuição.....06

Tabela 2: Distâncias genéticas baseadas no modelo Kimura-2-Parâmetros entre pares de sequências (matriz inferior), entre as médias interpopulacionais (matriz superior) e médias intrapopulacionais.....30

Tabela 3: Resumo da identificação das espécies de acordo com a similaridade das sequências de *Barcode* obtidas com aquelas depositadas no BOLD Systems.....31

Tabela 4: Resultados da análise molecular de variância (AMOVA) para todas as populações considerando (Samambaias + Pedras) e (Pinhão + São João) ($p < 0,01$).....32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa representativo dos locais de coleta deste estudo. Ponto 1: rio Pinhão (*Neoplecostomus* sp. 1). Ponto 2: rio Samambaias (*Neoplecostomus* cf. *botucatu*). Ponto 3: rio das Pedras (*Neoplecostomus* sp. 2). Ponto 4: rio São João (*Neoplecostomus yapo*).....33

Figura 2: Espécimes de *Neoplecostomus* estudados neste trabalho. *Neoplecostomus* sp. 1 do rio Pinhão, *Neoplecostomus* cf. *botucatu* do rio Samambaias, *Neoplecostomus* sp. 2 do rio das Pedras e *Neoplecostomus yapo* do rio São João. O tamanho da barra corresponde a 2 cm.....34

Figura 3: Cariótipos de *Neoplecostomus* submetidos à coloração convencional por Giemsa. A) *Neoplecostomus* sp. 1, rio Pinhão. B) *Neoplecostomus* cf. *botucatu*, rio Samambaias. C) *Neoplecostomus* sp. 2, rio das Pedras. D) *Neoplecostomus yapo*, rio São João. Barra = 10 µm.....35

Figura 4: Cariótipos de *Neoplecostomus* submetidos à técnica de bandamento C. A) *Neoplecostomus* sp. 1, rio Pinhão. B) *Neoplecostomus* cf. *botucatu*, rio Samambaias. C) *Neoplecostomus* sp. 2, rio das Pedras. D) *Neoplecostomus yapo*, rio São João. Barra = 10 µm.....36

Figura 5: Cariótipos de *Neoplecostomus* submetidos à dupla FISH com sondas de rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde). A) *Neoplecostomus* sp. 1, rio Pinhão. B) *Neoplecostomus* cf. *botucatu*, rio Samambaias. C) *Neoplecostomus* sp. 2, rio das Pedras. D) *Neoplecostomus yapo*, rio São João. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI. Barra = 10 µm.....37

Figura 6: Árvore de *neighbor joining* construída com base nas distâncias genéticas segundo a taxa de substituição Kimura-2-Parâmetros. Números acima dos ramos indicam o valor de suporte de *bootstrap* com 1000 replicações.....38

Figura 7: Análise Bayesiana construída com o *software MrBayes*. A árvore foi gerada com 1.500.000 gerações utilizando o modelo de substituição evolutiva HKY+G indicado pelo programa *Modeltest*.....39

Figura 8: Rede de haplótipos construída através de *median joining* realizada no *software PopArt*. Cada círculo representa um haplótipo e é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham.....40

Figura 9: Disposição gráfica dos haplótipos realizada no *software PopArt* das quatro populações deste estudo de acordo com as coordenadas geográficas dos pontos de coleta.....41

Figura 10: Análise de inferência de estruturação populacional do BAPS considerando as quatro populações, 1) Samambaias, 2) Pedras, 3) Pinhão e 4) São João.....42

Figura 11: Análise de inferência de estruturação populacional Bayesiana do *Structure* considerando k=2. No eixo x estão as quatro populações deste estudo, 1) Samambaias, 2) Pedras, 3) Pinhão e 4) São João. No eixo y, encontram-se as probabilidades de atribuição.....42

Figura 12: Análise de inferência de estruturação populacional Bayesiana do *Structure* considerando k=3. No eixo x estão as quatro populações deste estudo, 1) Samambaias, 2) Pedras, 3) Pinhão e 4) São João. No eixo y, encontram-se as probabilidades de atribuição.....42

LISTA DE ABREVIATURAS

2n	Número diploide
NF	Número fundamental
rDNA	DNA ribossomal
RON	Região organizadora de nucléolo
COI	Citocromo c oxidase subunidade I
mtDNA	DNA mitocondrial
pb	Pares de base
AMOVA	Análise molecular de variância
MMA	Ministério de Meio Ambiente
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
O₂	Oxigênio
CO₂	Dióxido de carbono
g	Grama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
BOLD	<i>The Barcode of Life Data System</i>
m	Cromossomo metacêntrico
sm	Cromossomo submetacêntrico
st	Cromossomo subtelocêntrico
a	Cromossomo acrocêntrico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
BAPS	<i>Bayesian analysis of population structure</i>
K2P	Kimura-2-Parâmetros
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
rpm	Rotação por minuto
M	Molar

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 DADOS GERAIS DA FAMÍLIA LORICARIIDAE	13
1.2 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM LORICARIIDAE	14
1.2.1 Subfamília Hypostominae	15
1.2.2 Subfamília Loricariinae	16
1.2.3 Subfamília Hypoptopomatinae	16
1.2.4 Subfamília Neoplecostominae	17
1.3 GÊNERO <i>NEOPLECOSTOMUS</i> : ASPECTOS GERAIS E CITOGENÉTICOS	17
1.4 DNA <i>BARCODING</i>	20
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 MATERIAL	24
3.1.1 Coletas e procedimentos	24
3.2 MÉTODOS	24
3.2.1 Análises citogenéticas convencionais	24
3.2.2 Análises citogenéticas moleculares	25
3.2.3 Montagem dos cariótipos	26
3.2.4 Extração de DNA e PCR	26
3.2.5 Análise dos dados	27
4. RESULTADOS	28
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	64
ANEXO 1: LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO MMA/ IBAMA/ SISBIO: 15117-1	64
ANEXO 2: CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL	65
ANEXO 3: OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS (BERTOLLO ET AL., 1978) ...	66
ANEXO 4: DETECÇÃO DA HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA (SUMNER, 1972)	67
ANEXO 5: HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (PINKEL ET AL., 1986)	68
ANEXO 6: MINI PREPARAÇÃO PLASMIDIAL	69
ANEXO 7: MARCAÇÃO DE Sonda DO GENE 5S	70
ANEXO 8: MARCAÇÃO DE Sonda DO GENE 18S	71
ANEXO 9: EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980)	72
ANEXO 10: AMPLIFICAÇÃO DO GENE COI	73

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 DADOS GERAIS DA FAMÍLIA LORICARIIDAE

Os peixes constituem o grupo mais diversificado e um dos mais interessantes para estudos com ênfase na variabilidade genética e na evolução entre os vertebrados (NELSON, 2006). Dentre todas as ordens, Siluriformes é a mais diversificada e amplamente distribuída de Osteichthyes (peixes ósseos) com aproximadamente 3.500 espécies válidas (FERRARIS JÚNIOR, 2007; ESCHEMEYER; FONG, 2016). A diversidade de formas, tamanho do corpo e habitat dos Siluriformes sul-americanos é elevada. Entre eles estão inclusas as três mais diversas famílias de Siluriformes neotropicais: Loricariidae, Ariidae e Trichomycteridae (FERRARIS JÚNIOR, 2007; REIS; KULLANDER; FERRARIS JÚNIOR, 2003; ESCHEMEYER; FONG, 2016).

Loricariidae é composta de indivíduos vulgarmente nomeados de “cascudos”, endêmicos da região Neotropical (Costa Rica, Panamá e América do Sul) (REIS; KULLANDER; FERRARIS JÚNIOR, 2003). Constitui uma das famílias de peixes de água doce com número elevado de representantes, 931 espécies válidas distribuídas em 100 gêneros (ESCHMEYER; FONG, 2016). De modo geral, habitam ambientes lóticos de pouca profundidade e com fundo arenoso (NELSON, 2006), mas podem ser encontrados também em lagos e rios com correnteza fraca a moderada, pequenos arroios e até rápidos tributários (COVAIN; FISCH-MULLER, 2007).

Os loricarídeos são caracterizados por um corpo deprimido, coberto por placas ósseas, presença de barbilhões na maioria das vezes e, sobretudo, uma importante modificação na estrutura da boca: ventral em forma de ventosa (maxilas soltas) (DELARIVA; AGOSTINHO, 2001; COVAIN; FISCH-MULLER, 2007). Essa adaptação estrutural permite que esses peixes fiquem aderidos ao substrato, até mesmo em fluxos de água particularmente rápidos. A boca e os dentes apresentam fortes adaptações que os permitem se alimentar de algas, pequenos invertebrados e detritos (COVAIN; FISCH-MULLER, 2007). Além disso, realizam respiração pelas brânquias e paredes vascularizadas do estômago, fato que lhes possibilitam ficar fora da água por longo período e ocupar os mais variados habitats (FERRARIS JÚNIOR, 2003).

Os cascudos apresentam características biológicas que lhes proporcionam acentuada importância ecológica, o que é salientado pelo hábito alimentar detritívoro-herbívoros, que varia em função das características do ambiente sendo, o alimento

aproveitado por estas espécies, produtos dos processos metabólicos do meio aquático (ANGELESCU; GNERI, 1949). Como os loricarídeos habitam todos os tipos de águas, desde pequenos riachos até grandes rios, eles são um importante componente da biodiversidade aquática (CRAMER; BONATTO; REIS, 2011).

Em 2015, a família Loricariidae agrupava sete subfamílias: Lithogeneinae, Delturinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Ancistrinae e Hypostominae (ESCHEMEYER; FONG, 2015). Porém para o ano de 2016, com uma nova classificação ela passa a ter oito subfamílias, com a criação de Rhinelepininae e Otothyrinae sendo que Ancistrinae então passa a formar uma tribo dentro de Hypostominae (ESCHEMEYER; FONG, 2016; LUJAN et al., 2015). Embora as bases de dados de diversidade de peixes considerarem a ocorrência destas oito subfamílias, dentro de Loricariidae a classificação destas e a relação entre seus gêneros vêm sendo alvo de repetidas reformulações (ISBRÜCKER, 1980; ARMBRUSTER, 2004; REIS; PEREIRA; ARMBRUSTER, 2006; CHIACHIO; OLIVEIRA; MONTOYA-BUGOS, 2008; CRAMER et al., 2008; CRAMER; BONATTO; REIS, 2011).

1.2 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM LORICARIIDAE

Entre os Siluriformes, a família Loricariidae apresenta uma ampla diversidade de formas cariotípicas e números cromossômicos (LARA-KAMEI, 1998). Com relação ao número cromossômico, ocorre variação do número diploide ($2n$) de $2n=34$ cromossomos em *Ancistrus cuiabae* (MARIOTTO et al., 2009) a $2n=96$ cromossomos em *Hemipsilichthys gobio*, citado como *Upsilonodus* sp. (KAVALCO et al., 2004a). Essa ampla variação no número diploide ocorre por mecanismos robertsonianos, do tipo fusão e fissão cêntrica (ARTONI; BERTOLLO, 2001). Além destes, alterações cromossômicas que modificam o número fundamental (NF) também são amplamente registradas na diversificação cariotípica (BUENO; ZAWADZKI; MARGARIDO, 2012). Contudo, estudos citogenéticos em Loricariidae ancorados na análise de grupos irmãos permitiram definir o número diploide de 54 cromossomos como um caráter basal na família (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ZIEMNICZAK et al., 2012).

No ano de 2000, dados citogenéticos para Loricariidae estavam disponíveis apenas para 56 espécies das 600 descritas na época (de OLIVEIRA; GOSZTONYI, 2000). Posteriormente, no ano de 2003, o número de registros citogenéticos aumentou de 56 para 70 espécies, porém, neste intervalo, mais 80 espécies foram descritas

(KAVALCO, 2003). Embora as informações sobre diferentes espécies estejam cada vez mais disponíveis devido ao aumento das atividades de pesquisa neste campo, o conhecimento de cariótipos de peixes é ainda reduzido quando comparados aos de mamíferos e outros grupos de seres vivos (MAURUTTO, 2010) e também quando comparado ao número de espécies da família Loricariidae (ARTONI; BERTOLLO, 2001).

1.2.1 Subfamília Hypostominae

A subfamília Hypostominae é a mais numerosa da família Loricariidae com 465 espécies válidas (ESCHEMEYER; FONG, 2016). Entre as espécies pertencentes a esta subfamília poucas mantêm o $2n$ de 54 cromossomos (ARTONI; BERTOLLO, 2001; BUENO; ZAWADZKI; MARGARIDO, 2012, BUENO et al., 2014). O gênero *Hypostomus*, é o mais numeroso dentro deste grupo com cerca de 120 espécies (ZAWADZKI; WEBER; PAVANELLI, 2010) e em relação à citogenética apresenta tendência de aumento do $2n$ a partir de rearranjos cromossômicos do tipo fissão cêntrica (ARTONI; BERTOLLO, 2001; BUENO; ZAWADZKI; MARGARIDO, 2012).

Os estudos citogenéticos em *Hypostomus* indicam grande variabilidade em diversos aspectos cariotípicos, o que confere ao grupo uma enorme complexidade (ARTONI; BERTOLLO, 1996). A variação do $2n$ ocorre de 54 cromossomos em *H. plecostomus* (MURAMOTO; OHNO; ATKIN, 1968) a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2 (CEREALI et al., 2008). As variações cromossômicas interpopulacionais são recorrentes, especialmente em relação à fórmula cariotípica (MICHELE; TAKAHASHI; FERRARI, 1977; ARTONI; BERTOLLO, 1996; ALVES et al., 2006; BUENO; ZAWADZKI; MARGARIDO, 2012). Uma característica muito interessante em Hypostominae é a relação inversa entre o número diploide e o número de cromossomos com dois braços, sugerindo a ocorrência de muitos eventos de fusão/fissão cêntrica na evolução do grupo (ARTONI; BERTOLLO, 2001).

Ancistrus também é um gênero bastante numeroso dentro desta subfamília com cerca de 62 espécies descritas (BIFI; PAVANELLI; ZAWADZKI, 2009). Análises cariotípicas neste grupo revelaram uma grande diversidade de número cromossômico, desde $2n = 34$ em *Ancistrus* sp. 1, *Ancistrus* sp. 2 e *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (de OLIVEIRA et al., 2007; MARIOTTO et al., 2011) até $2n = 54$, em *Ancistrus claro* Knaack, 1999 (MARIOTTO et al., 2011). Todos os representantes desta tribo possuem

$2n \leq 54$, indicando que fusões cêntricas contribuíram para a evolução cariotípica deste grupo (MARIOTTO et al., 2011).

1.2.2 Subfamília Loricariinae

Loricariinae é a segunda subfamília mais numerosa em Loricariidae com 239 espécies válidas (ESCHEMEYER; FONG, 2016) e os dados citogenéticos apontam uma grande diversidade tanto no que se refere ao número de cromossomos quanto à fórmula cariotípica (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005). Em Loricariidae, o $2n=54$ cromossomos é considerado característica primitiva (ARTONI; BERTOLLO, 2001), porém dentro de um único gênero, como *Rineloricaria*, por exemplo, há uma grande oscilação deste valor; de $2n=36$ em *Rineloricaria latirostris* (GIULIANO-CAETANO, 1998) a $2n=70$ em *Rineloricaria* sp. (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005). Rosa et al. (2012) relataram que tanto fissões quanto fusões cêntricas, aliados a mecanismos de inversão e combinações gaméticas, poderiam explicar a variação do $2n$.

Outra característica cromossômica importante para espécies deste gênero é a grande quantidade de variações inter e intrapopulacionais (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005). Rosa et al. (2012) estudando duas populações de *Rineloricaria* cf. *lima* na nascente do rio Ribeira na região sul do Brasil observaram um polimorfismo numérico e estrutural com variação do número diploide ($2n=66$ a $2n=70$), número de braços, distribuição da heterocromatina, número e localização de sítios do DNA ribossomal (rDNA) 5S, além da presença de sítios teloméricos intersticiais.

1.2.3 Subfamília Hypoptopomatinae

A subfamília Hypoptopomatinae é composta atualmente por 52 espécies válidas (ESCHEMEYER; FONG, 2016), sendo poucos os estudos citogenéticos realizados nesta subfamília. No entanto, o número diploide de 54 cromossomos e regiões organizadoras de nucléolo (RONs) intersticiais têm sido encontradas em quase todas as espécies (ANDREATA et al., 2000; KAVALCO et al., 2005). As exceções são para *Hisonotus gibbosus* com $2n=58$ cromossomos (ANDREATA et al., 2000) e *Otocinclus* aff. *vestitus* com $2n=72$ cromossomos (ANDREATA et al., 1994), sendo assim um grupo bastante conservado do ponto de vista cariotípico (CAMILO, 2004).

Estudando populações de *Parotocinclus maculicauda* na bacia hidrográfica do rio Ribeira, Ziemniczak et al. (2012) encontraram $2n=54$ cromossomos e NF 108 com heterocromatina distribuída preferencialmente nas regiões pericentroméricas dos pares 4, 11, 14, 16, 17 e 18, além de estar localizada no braço longo do par 12 em região proximal e terminal. As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram localizadas na região intersticial do braço longo do par 12. Também foram localizados os sítios cromossômicos dos genes ribossomais 5S e 18S, os quais se apresentaram sintênicos e adjacentes.

1.2.4 Subfamília Neoplecostominae

Em Neoplecostominae são descritas 58 espécies (ESCHEMEYER; FONG, 2016) agrupadas em seis gêneros: *Neoplecostomus*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Pareiorhaphis*, *Pareiorhina* e *Pseudotocinclus* (ARMBRUSTER 2004; CHIACHIO; OLIVEIRA; MONTOYA-BURGOS, 2008; ROXO; OLIVEIRA; ZAWADZKI, 2012). Estas espécies encontram-se distribuídas em regiões de drenagem na região sudoeste da América do Sul, desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, exceto *Pareiorhaphis regani*, a qual ocorre no rio Negro (Bacia Amazônica) (FERRARIS JÚNIOR, 2007; ROXO et al., 2014).

A citogenética do grupo tem demonstrado um $2n=54$ cromossomos estável, além de sítios de rDNA 5S e 18S sintênicos, características compartilhadas com o grupo irmão Trichomycteridae e considerados como primitivos para o grupo (ZIEMNICZAK et al., 2012). Entre as principais variações cariotípicas descritas para esta subfamília estão as alterações de fórmula cariotípica, de número de sítios de rDNA, além de variações em relação aos blocos de heterocromatina (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005; ZIEMNICZAK et al., 2012).

1.3 GÊNERO *Neoplecostomus*: ASPECTOS GERAIS E CITOGENÉTICOS

O gênero *Neoplecostomus* é endêmico da América do Sul e inclui atualmente 16 espécies, sendo 8 destas pertencentes à bacia do rio Paraná (Tabela 1) (LANGEANI, 1990; ANDRADE, 2012). Compreende espécies de tamanho pequeno (até 15 cm) e seus representantes são encontrados na região sul e sudeste do Brasil em pequenos riachos de águas claras e rasas, com correnteza forte a moderada e fundo com

pedregulhos e, às vezes, arenoso (LANGEANI, 1990; PEREIRA; REIS, 2002; PEREIRA; OYAKAWA, 2003). Espécies desse gênero são diagnosticadas por possuir o lábio inferior com duas ou três séries de papilas bem desenvolvidas e proeminentes após cada série de dentes e por possuir o ventre recoberto parcialmente por um escudo, entre as nadadeiras peitorais e pélvicas, formado por pequenas placas e limitado por áreas nuas (LANGEANI, 1990).

Tabela 1: Relação das espécies descritas de *Neoplecostomus* (até o presente momento) e suas áreas de distribuição.

Espécie	Localidade	Autores
<i>N. granosus</i>	bacia do rio Atlântico Leste	Cuvier; Valenciennes (1840)
<i>N. microps</i>	bacia do rio Paraíba do Sul	Steindachner (1877)
<i>N. paranensis</i>	bacia do rio Paraná	Langeani (1990)
<i>N. franciscoensis</i>	bacia do rio São Francisco	Langeani (1990)
<i>N. espiritosantensis</i>	bacia do Atlântico Leste	Langeani (1990)
<i>N. ribeirensis</i>	bacia do rio Ribeira de Iguape	Langeani (1990)
<i>N. variipictus</i>	bacia do rio Paraíba do Sul	Bizerril (1995)
<i>N. corumba</i>	bacia do rio Paraná	Zawadzki; Pavanelli; Langeani (2008)
<i>N. selenae</i>	bacia do rio Paraná	Zawadzki; Pavanelli; Langeani (2008)
<i>N. yapo</i>	bacia do rio Paraná	Zawadzki; Pavanelli; Langeani (2008)
<i>N. botucatu</i>	bacia do rio Paraná	Roxo; Oliveira; Zawadzki (2012)
<i>N. bandeirante</i>	bacia do rio Paraná	Roxo; Oliveira; Zawadzki (2012)
<i>N. langeanii</i>	bacia do rio Paraná	Roxo; Oliveira; Zawadzki (2012)
<i>N. jaguari</i>	bacia do rio Paraná	Andrade; Langeani (2014)
<i>N. doceensis</i>	bacia do rio Doce	Roxo et al. (2014)
<i>N. paraty</i>	bacia do Atlântico Leste	Cherobim; Lazzarotto; Langeani (2016)

Fonte: Andrade (2012) com modificações.

Embora as espécies desse gênero sejam bastante semelhantes entre si, normalmente elas apresentam algumas características morfológicas distintas, como caracteres morfométricos e padrões de coloração (LANGEANI, 1990; ZAWADZKI et al., 2004; ZAWADZKI; PAVANELLI; LANGEANI, 2008). A espécie *N. paranensis* é caracterizada principalmente pela ausência ou redução da nadadeira adiposa (LANGEANI, 1990) o que não ocorre, por exemplo, com *N. corumba*, *N. selenae* e *N.*

yapo onde todas apresentam a nadadeira adiposa bem desenvolvida (ZAWADZKI; PAVANELLI; LANGEANI, 2008).

Algumas espécies apresentam dimorfismo sexual como é o caso de *N. jaguari*. Machos apresentam papilas urogenitais visíveis o que não ocorre nas fêmeas. Já as fêmeas apresentam maior largura mandibular com dentes mais longos e finos e mais curtos e robustos nos machos (ANDRADE; LANGEANI, 2014).

Até o ano de 2015, os dados citogenéticos para as espécies deste gênero estavam disponíveis apenas para *N. microps*, *N. paranensis* e *N. yapo*. Os estudos cariotípicos nestas espécies demonstraram o número diploide de 54 cromossomos e uma aparente conservação cariotípica (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005; KAVALCO et al., 2005).

Em um estudo citogenético realizado por Kavalco et al. (2004a) para a região da bacia do rio Paraíba do Sul, *N. microps* apresentou $2n=54$ cromossomos ($24m+20sm+10st$) e NF 108. Foi observada pouca heterocromatina constitutiva, restrita a região intersticial dos pares dos cromossomos 14 e 25. Com a técnica de tripla coloração (cromomicina/distamicina/DAPI), foi possível observar que essas regiões heterocromáticas apresentaram sinal positivo após a coloração com cromomicina, evidenciando regiões GC ricas. Com DAPI não houveram evidências de regiões AT ricas.

Espécimes de *N. yapo* coletados no rio Verde (bacia do rio Tibagi) foram estudados por Ziemniczak et al. (2012), onde observaram um $2n$ de 54 cromossomos ($22m+22sm+10st$) com NF 108. Também blocos heterocromáticos foram evidenciados no braço longo dos pares 10 e 24 e bandas menos evidentes em região centromérica de outros cromossomos. As RONS foram localizadas na região intersticial do braço longo do par 10, onde foi localizado o rDNA 18S e um sítio de rDNA 5S foi localizado em região intersticial do braço longo do par de cromossomos 24.

Neoplecostomus yapo também foi estudado citogeneticamente na região de Londrina e Califórnia (Paraná) por Rubert et al. (2010), onde apresentou $2n=54$ ($22m+20sm+12st-a$), com a presença de constrição secundária na região intersticial do braço longo do par 12. A impregnação por nitrato de prata detectou RONS simples nos pares dos cromossomos 12. Quanto à distribuição da heterocromatina as bandas positivas localizaram-se na região pericentromérica de um par *st-a* e no par 12, provavelmente associada às regiões organizadoras de nucléolo.

1.4 DNA *Barcoding*

Historicamente os dados morfológicos foram os primeiros a serem utilizados para a identificação de espécies, pois foram os primeiros disponíveis aos pesquisadores que começaram com a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos. Com o avanço da ciência e o aumento do número de espécies estudadas, novas fontes de dados foram adicionadas aos processos de descrição e classificação das espécies. Atualmente, caracteres fisiológicos, embriológicos, comportamentais e moleculares auxiliam como ferramentas adicionais aos dados morfológicos clássicos à descrição de espécies (PEREIRA; OLIVEIRA, 2015).

Utilizar métodos moleculares para identificar espécies apresenta algumas vantagens com relação ao método tradicional, embora não vise à substituição deste e sim complementariedade entre ambos. Podemos destacar que o método molecular é rápido e tem se tornado menos custoso nos últimos anos. Pode ser utilizado para a identificação a partir de qualquer estágio de vida, especialmente com os que passam por diversos estágios, como por exemplo, insetos e plantas. Além disso, tem facilitado a identificação de espécies muito semelhantes morfologicamente (HEBERT et al., 2003; PEREIRA; OLIVEIRA, 2015).

Diversos procedimentos moleculares têm sido utilizados com o intuito de identificar espécies. A técnica de eletroforese de aloenzimas é uma delas e tem contribuído em estudos de interpretação de variabilidade genética. Esta técnica é útil na discriminação de populações de alguns gêneros de peixes, como por exemplo, em *Neoplecostomus* (LUCENA et al., 2012; PHILIPPSEN et al., 2009) e *Oligosarcus* (SANTOS; RENESTO, 2013).

Em um estudo realizado por Zawadzki et al. (2004) utilizando a técnica de eletroforese de aloenzimas, analisaram duas populações de *Neoplecostomus*, uma do Rio Corumbá (Caldas Novas-MG) e outra de tributário do rio Paranapanema (Botucatu-SP). Foram encontrados seis *locus* diagnósticos e a divergência genética com diferenças significativas entre amostras das duas localidades, sugerindo que os espécimes da população do rio Corumbá poderiam representar uma nova espécie.

Embora as ferramentas moleculares tenham fornecido novas oportunidades de estudo, principalmente na biologia evolutiva, o uso de diferentes técnicas e/ou genes, para diferentes grupos taxonômicos, inviabilizava a criação de um sistema universal de identificação molecular de espécies (PEREIRA; OLIVEIRA, 2015). Com o intuito de

solucionar essa problemática, Herbert e colaboradores no ano de 2003 propuseram o uso de uma metodologia denominada DNA *Barcoding* utilizando um fragmento da subunidade 1 do gene mitocondrial citocromo c oxidase (COI ou Cox1). O fundamento básico deste método está na busca da variabilidade existente entre as sequências de DNA de um mesmo gene devido ao acúmulo de mutações ao longo da história evolutiva (HERBERT et al., 2003).

A mitocôndria possui um genoma próprio, conhecido como DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA animal é uma molécula circular, cujo tamanho varia de 16 a 20 mil nucleotídeos. Apresenta um conteúdo gênico conservado, porém com divergência rápida. (BILLINGTON; HERBERT, 1991). Possui 13 genes codificantes de proteínas, dois RNA ribossômicos, 22 RNA transportadores e uma região conhecida como “região controle” responsável pelo processo de transcrição e replicação da molécula (PEREIRA; OLIVEIRA, 2015).

Esta metodologia foi denominada DNA *Barcoding*, em analogia ao sistema de identificação de produtos utilizando códigos de barras. Da mesma forma que um produto é identificado por sua combinação única e exclusiva de código de barras, uma espécie poderia ser identificada por uma combinação única e exclusiva de nucleotídeos desse fragmento de aproximadamente 650 pares de base (pb) do gene COI (HEBERT et al., 2003). Essa combinação é oriunda do acúmulo de mutações no decorrer da história evolutiva de cada espécie que pode gerar variações nas sequências de DNA. Sabendo então que as histórias evolutivas são independentes e que o processo de mutação é aleatório, uma sequência de nucleotídeos poderia ser capaz de identificar uma espécie (PEREIRA; OLIVEIRA, 2015).

O mtDNA animal reúne várias características que o tornam um marcador adequado para estudos evolutivos como por exemplo, sua alta taxa de evolução, a qual acredita ser 10 vezes superior à de um gene nuclear. Isso se deve a baixa capacidade de reparo da enzima DNA polimerase e a alta exposição da molécula de DNA aos agentes oxidativos que são gerados durante o processo de respiração celular (BROWN; GEORGE JÚNIOR; WILSON, 1979). Além disso, os genes mitocondriais não possuem íntrons (espaçadores gênicos), os quais, usualmente atrapalham as análises dos segmentos de DNA, pela grande variação existente nesses segmentos. Outra característica favorável é o fato deste DNA ser haplóide, ou seja, possui apenas uma cópia do material genético em comparação ao genoma nuclear (PEREIRA; OLIVEIRA, 2015).

As sequências de DNA dentro de uma espécie (variação intraespecífica) devem ser mais semelhantes entre si do que quando comparadas em espécies diferentes (variação interespecífica) (HERBERT et al., 2003). Na maioria dos casos é o que ocorre, porém existem exceções. A hibridação entre espécies pode criar uma incerteza taxonômica, já que a herança do gene COI é materna e neste caso a geração híbrida teria o DNA mitocondrial de uma espécie (WARD et al., 2005).

As diferenças observadas entre as variações intra e interespecíficas é denominada de “*Barcoding gap*” o qual pode variar de acordo com o grupo de estudo. A primeira proposta sugeriu que este valor deve ser de pelo menos 10 vezes o valor da média de divergência intraespecífica (HEBERT et al., 2004). Outra proposta, mais utilizada, baseada em análises estatísticas, sugere que se um espécime desconhecido apresentar um valor de divergência genética maior que 2% em relação a um espécime conhecido, esse espécime terá 95% de probabilidade de representar uma espécie diferente (WARD et al., 2009).

Inicialmente, a proposta de usar o DNA *Barcoding* era padronizar o processo de identificação de espécies usando um único segmento de DNA de um único gene. Porém, se fez necessário a busca por segmentos alternativos para grupos nos quais o COI não foi resolutivo. Alguns grupos de espécies, por exemplo, apresentam baixa taxa de evolução deste gene, apresentando valores de divergência genética tão baixa que impedem sua discriminação (WARD et al., 2009). Por esse motivo, para fungos está sendo utilizado além do COI, um fragmento do espaçador transcrito interno do DNA ribossômico. Para alguns grupos de insetos, o gene 28S tem demonstrado melhor desempenho. No caso das plantas, genes do cloroplasto *matk*, *rbcl*a e *rbcl*b tem sido utilizados (PEREIRA; OLIVERA, 2015).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Atualmente, há evidências de espécies ainda não descritas para *Neoplecostomus* provenientes do alto rio Paraná, do rio Iguaçu e de rios litorâneos brasileiros. Algumas destas evidências são oriundas de estudos moleculares, investigações osteológicas e ocorrência de dimorfismo sexual em dentição. As espécies desse gênero são morfometricamente semelhantes e poucos caracteres morfológicos são úteis para distingui-los. Além disso, alguns estudos citogenéticos também já foram realizados para este gênero e os resultados sugerem uma constituição cariotípica estável e conservada. Portanto, devido à similaridade morfológica e cariotípica outros caracteres são necessários para auxiliar na identificação e caracterização de novas espécies neste grupo. Outras abordagens principalmente genéticas e bioquímicas podem servir como ferramentas auxiliares para a taxonomia. Com isso, a avaliação citogenética e molecular em diferentes populações de *Neoplecostomus* podem ser mais uma ferramenta na análise da biodiversidade deste gênero.

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a diferenciação cariotípica e a diversificação genética no gênero *Neoplecostomus* nas bacias hidrográficas do rio Tibagi, Iguaçu, Cinzas e Itararé com vistas ao entendimento da evolução cariotípica e descrição da biodiversidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar através de técnicas citogenéticas convencionais e moleculares os espécimes coletados em afluentes da bacia do rio Paraná;
- Estimar através da técnica de DNA *Barcoding* a divergência nucleotídica e distância genética entre as espécies e entre seus respectivos grupos;
- Demonstrar através de dados de variância molecular (AMOVA), de redes haplotípicas e Análise Bayesiana se as populações estão estruturadas e qual o nível de estruturação destas;
- Comparar e correlacionar os dados obtidos com os disponíveis na literatura para entendimento da evolução cariotípica do gênero.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Coletas e procedimentos

Foram realizadas coletas de *Neoplecostomus* em quatro rios pertencentes a diferentes bacias hidrográficas no estado do Paraná (Figura 1). No rio Pinhão (25°35'49.52" S, 51°40'43.85" O), município de Pinhão-PR pertencente à bacia hidrográfica do Iguaçu foram amostrados 14 exemplares de *Neoplecostomus* sp. 1 (6 machos e 8 fêmeas). No rio Samambaias (24°13'16.84" S, 49°39'38.11" O), município de Jaguariaíva-PR, bacia hidrográfica do rio Itararé foram amostrados 10 exemplares de *Neoplecostomus* cf. *botucatu* (6 machos e 4 fêmeas). Já no rio das Pedras (24°07'40.30" S, 50°14'11.55" O), município de Ventania-PR, bacia hidrográfica do rio das Cinzas foram amostrados 21 exemplares de *Neoplecostomus* sp. 2 (11 machos e 10 fêmeas). No rio São João (24°53'46.61" S, 50°12'36.36" O), município de Carambeí-PR, bacia hidrográfica do rio Tibagi, foram amostrados 15 exemplares de *Neoplecostomus yapo* (5 machos e 10 fêmeas) (Figura 2).

Os peixes foram coletados na natureza com licença do Ministério do Meio Ambiente (MMA)/ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (Anexo 1) fazendo uso de peneiras e tarrafas. Após a captura, os exemplares foram acondicionados em recipientes com água e posteriormente encaminhados ao laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura & Função (Chromosome Biology: Structure & Function) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus Uvaranas, onde permaneceram em aquários aerados até a realização das técnicas. Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética do uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo 8782/2016) (Anexo 2).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Análises citogenéticas convencionais

Para a análise cromossômica foi necessária a obtenção de células metafásicas, tanto em qualidade como em quantidade. O rim possui função hematopoiética, ou seja, produzir células sanguíneas (tanto as de defesa como as de transporte de O₂/CO₂). Sendo assim, foi injetado uma solução de fermento (0,5 gramas de fermento biológico, 1,5 gramas de dextrose e completado com 6 mL de água) na região ventral do animal

com a intenção de induzir um aumento na frequência no número de mitoses, através da técnica de Suspensão de levedura de Cavallini e Bertollo (1988). Após 24 horas da aplicação deste indutor, injetou-se intraperitonealmente uma solução de colchicina (0,025%) na proporção de 1mL/100g de peso do animal para obter células em fase de metáfase.

Após 45 minutos da aplicação da colchicina o animal foi anestesiado e posteriormente eutanasiado. Foram retiradas amostras de fígado para estudos moleculares, as quais foram preservadas em etanol absoluto e mantidas a -20°C. Também foram retiradas amostras do rim para estudos citogenéticos de acordo com a técnica de Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978) (Anexo 3). Os exemplares foram fixados em solução de formol 10% e preservados em álcool 70%.

A detecção da heterocromatina constitutiva foi realizada de acordo com a técnica descrita por Sumner (1972) (Anexo 4). Esta técnica permite a observação de regiões específicas em que o cromossomo apresenta DNA altamente repetitivo e, por isso, são detectadas regiões mais escuras nos cromossomos correspondentes às regiões condensadas.

3.2.2 Análises citogenéticas moleculares

Nas análises moleculares foram utilizadas sondas de rDNA 18S e 5S para a localização dos seus respectivos sítios cromossômicos nas populações estudadas através da técnica de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) (Anexo 5). A sonda do rDNA 5S foi isolada através do genoma total de *Neoplecostomus yapo* com os primers 5SA_forward: 5' TACGCCCGATCTCGTCCGATC 3' e 5SB_reverse: 5' CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC 3'. Já a sonda do rDNA 18S foi isolada a partir do DNA nuclear de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI JÚNIOR, 2004) clonado em *Escherichia coli* e obtido através da técnica de mini preparação plasmidial (Anexo 6). Ambas as sondas foram marcadas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando nucleotídeos marcados biotina 16-dUTP (Roche) (Anexo 7) e digoxigenina 11-dUTP (Roche) (Anexo 8).

Posteriormente a esse processo, as sondas foram submetidas à FISH. O protocolo geral da FISH sob alta condição de estrigência (2,5 ng/μL sonda, 50% formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 37°C por 16 h) segue o procedimento geral descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos streptavidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Invitrogen) e Anti-

digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector) e analisados no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao *software* ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®) em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels.

3.2.3 Montagem dos cariótipos

Depois de capturadas, as fotografias dos cromossomos foram recortadas e organizadas em cariótipos com uso do software Adobe Photoshop CC 2015, onde os homólogos foram pareados e dispostos em grupos metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a). A classificação cromossômica adotada foi a proposta por Levan, Fredga e Sandberg (1964) onde o limite de relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é: RB= 1,00 - 1,70 / (m); RB= 1,71 - 3,00 / (sm); RB= 3,01 - 7,00/ (st) e RB= maior que 7,00 / (a). Na determinação do NF, os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com dois braços cromossômicos e os cromossomos acrocêntricos com apenas um braço.

3.2.4 Extração de DNA e PCR

Para a extração de DNA genômico, foram utilizadas amostras de fígado armazenadas e preservadas em etanol absoluto seguindo o método CTAB *cetyltrimethylammonium bromide* de Murray e Thompson (1980) (Anexo 9). Após a extração, foi verificada a integridade do DNA em gel de agarose 1% e as amostras quantificadas em um *Nanovue* (GE Healthcare). Foram diluídas amostras de DNA para a utilização na técnica de PCR, onde foram amplificados fragmentos do gene (COI) utilizando-se os primers: *Fish F1* 5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3' e *Fish R1* 5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3' (Anexo 10).

Após a amplificação, o resultado da PCR foi verificado em gel de agarose 1%, onde foram observadas bandas únicas entre 600 e 700 pares de base. As amostras foram então purificadas com kit *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante e enviadas para o sequenciamento nucleotídico realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares (disponibilizado pela empresa Ludwig Biotec), utilizando-se o equipamento ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

3.2.5 Análise dos dados

Todas as sequências obtidas para a espécie foram inicialmente analisadas com o *software Geneious* 8.1.9 (KEARSE et al., 2012). As sequências foram então alinhadas usando o algoritmo *ClustalW* implementado no *Geneious*, onde foram checados possíveis erros no sequenciamento comparando com os dados já depositados no *GenBank* (NCBI) através da ferramenta BLAST. Para o cálculo das distâncias genéticas foi utilizado o *software* MEGA 7.0.14 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), utilizando o modelo de evolução de Kimura-2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). Para a análise de fluxo gênico e diversidade haplotípicas (h) e nucleotídica (π) foi utilizado o *software DnaSP* (LIBRADO; ROZAZ, 2009) e para a análise da estruturação populacional e análise molecular de variância (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) foi utilizado o *software Arlequin* 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISHCER, 2010). Utilizando o programa *PopArt* 1.7 foram geradas redes de haplótipos através do critério de *median joining* (LEIGH; BRYANT, 2015). As análises de estruturação foram feitas através das atribuições de cada indivíduo às populações utilizando inferência Bayesiana, usando os *softwares* *Structure* 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) e *Bayesian Analysis of Population Structure* - BAPS 6 (CORANDER et al., 2004; CORANDER; MARTTINEN, 2006). A árvore de inferência bayesiana for gerada com o programa *MrBayes* 3.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003).

4. RESULTADOS

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

CAPÍTULO I

Estabilidade cariotípica e divergência genética em *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) em afluentes do rio Paraná

Estabilidade cariotípica e divergência genética em *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) em afluentes do rio Paraná

Resumo

O gênero *Neoplecostomus* inclui 16 espécies válidas e distribuição pela bacia do rio Paraná, São Francisco e região Litorânea. No entanto, a diversidade neste grupo de peixes é subestimada. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a diferenciação cariotípica e a diversificação genética em *Neoplecostomus* em diferentes bacias hidrográficas no estado do Paraná. Para isto, foram realizadas coletas de espécimes de *Neoplecostomus* sp. 1 no rio Pinhão (rio Iguaçu), *Neoplecostomus* cf. *botucatu* no rio Samambaias (rio Itararé), *Neoplecostomus* sp. 2 no rio das Pedras (rio das Cinzas) e *N. yapo* no rio São João (rio Tibagi). Foram obtidos valores $2n$ conservados de 54 cromossomos, sendo $18m+20sm+16st$ e NF 108 para as quatro populações amostradas. O bandamento C detectou poucas regiões heterocromáticas. A hibridização *in situ* do gene ribossomal 18S demonstrou a localização do sítio ribossomal 45S em um único par cromossômico e, em dois sítios cromossômicos para o gene ribossomal 5S. Análises moleculares envolvendo fragmentos da subunidade 1 do gene mitocondrial citocromo c oxidase (COI) demonstraram uma distância genética variando de 4,7% a 9,9%, sem sobreposição de haplótipos e ausência de fluxo gênico entre as espécies estudadas. Os resultados citogenéticos deste estudo evidenciam uma alta estabilidade cariotípica para as espécies de *Neoplecostomus*. Em adição, os resultados da distância genética para *Neoplecostomus* do rio Pinhão e do rio das Pedras são comparáveis a de espécies distintas neste gênero de peixes. Diante deste aspecto, é importante ressaltar a estabilidade cromossômica em Neoplecostominae e a importância de integrar os dados morfológicos, citogenéticos e moleculares para a determinação da biodiversidade do gênero.

Introdução

Dados morfológicos, quer anatômicos, morfométrico e merísticos, assim como os de coloração são precursores nas ciências taxonômicas e sistemáticas. Entretanto, nas últimas décadas houve um aumento do número de espécies estudadas e novas formas de análise foram adicionadas aos processos de identificação e classificação das espécies. Atualmente, caracteres fisiológicos, embriológicos, comportamentais, moleculares e citogenéticos auxiliam como ferramentas adicionais aos dados morfológicos clássicos à descrição de espécies (PEREIRA; OLIVEIRA, 2015).

Dados citogenéticos como o número e a morfologia dos cromossomos, o padrão de bandas, número e a posição dos sítios de DNAs ribossomais e a localização de DNAs repetitivos satélites identificam características compartilhadas e derivadas entre espécies próximas, os quais contribuem para o entendimento de espécies divergentes (VICARI et al., 2006; da SILVA et al., 2015; de OLIVEIRA et al., 2016), complexo de espécies (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991) padrões biogeográficos (VICARI et al., 2008; da ROSA et al., 2014) e na resolução de sinonímias (BELLAFRONTÉ; MARGARIDO; MOREIRA-FILHO, 2005). Em adição aos dados citogenéticos e morfológicos, também o uso de marcadores moleculares, os quais se baseiam na história evolutiva de sequências nucleares e organelares são muito utilizados na taxonomia e sistemática (PADIAL et al., 2010; SCHILICK-STEINER et al., 2010; TRAVENZOLI et al., 2015). Isto se deve ao fato de que essas metodologias buscam diretamente a variação ao nível da molécula de DNA, o que faz com que essas abordagens permitam a análise filogenética e de fluxo gênico principalmente (TORRES; MATOSO; ARTONI, 2004).

Um dos genes utilizados para a identificação de espécies é a subunidade 1 do gene mitocondrial citocromo c oxidase (COI ou Cox1), proposto por Herbert e colaboradores no ano de 2003 e descrito como metodologia de DNA *barcode*. O fundamento básico deste método está na busca da variabilidade existente entre as sequências de DNA de um mesmo gene devido ao acúmulo de mutações ao longo da história evolutiva. Sendo assim, uma espécie poderia ser identificada por uma combinação única e exclusiva de nucleotídeos desse fragmento de aproximadamente 650 pares de base (pb) do gene (HERBERT et al., 2003).

Pertencente à família Loricariidae, subfamília Hypoptopomatinae e tribo Neoplecostomini, o gênero *Neoplecostomus* é endêmico da América do Sul e seus representantes estão distribuídos na região sul e sudeste do Brasil. O gênero inclui atualmente 16 espécies descritas para as bacias do rio Paraná, São Francisco e

Litorânea, sendo 8 destas pertencentes à bacia do rio Paraná (LANGEANI, 1990; ANDRADE, 2012). Espécies desse gênero são diagnosticadas por possuir o lábio inferior com duas ou três séries de papilas bem desenvolvidas e proeminentes após o dentário e por possuir a área ventral entre a origem das nadadeiras peitorais e a origem das nadadeiras pélvicas recoberta por um escudo formado por pequenas placas (LANGEANI, 1990). Estas espécies possuem tamanho pequeno, usualmente até 130 mm de comprimento padrão, e habitam riachos de águas claras e rasas, com fundo pedregoso e correntezas fortes a moderadas (LUCENA et al., 2012; ROXO et al., 2012).

As espécies de *Neoplecostomus* são bastante semelhantes entre si e normalmente apresentam algumas poucas e sutis características morfológicas diagnósticas. Enquanto que *Neoplecostomus paranensis* (Langeani, 1990) é caracterizada principalmente pela ausência ou redução da nadadeira adiposa (LANGEANI, 1990), *N. selenae* (Zawadzki, Pavanelli e Langeani, 2008) é diferenciada por odontódeos hipertrofiados nos lados do focinho. Outras populações, como aquelas evidenciadas por caracteres aloenzimáticos por Lucena et al. (2012) e por caracteres moleculares por Roxo et al. (2012) não apresentam caracteres morfológicos diagnósticos evidentes.

Os estudos citogenéticos em exemplares da tribo Neoplecostomini evidenciaram uma estrutura cariotípica conservada e compartilhadas com o grupo irmão Trichomycteridae (ZIEMNICZAK et al., 2012). Dados cariotípicos para as espécies do gênero *Neoplecostomus*, *Neoplecostomus microps*, *N. paranensis* e *N. yapo* demonstraram o número diploide de 54 cromossomos e poucas variações em fórmulas cariotípicas (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005; KAVALCO et al., 2005; ZIEMNICZAK et al., 2012).

Poucos são os estudos citogenéticos e moleculares em Neoplecostomini (ZIEMNICZAK et al., 2012) e existem evidências de espécies ainda não descritas para *Neoplecostomus* provenientes do alto rio Paraná (LUCENA et al., 2012; ROXO et al., 2012). Neste contexto, devido à similaridade morfológica e cariotípica e a presença de poucos e sutis caracteres diagnósticos em *Neoplecostomus*, a adição de metodologias associadas podem contribuir para identificar e caracterizar novas espécies neste grupo. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a diferenciação cariotípica e genética no gênero *Neoplecostomus* provenientes de quatro diferentes bacias hidrográficas no estado do Paraná.

Material e Métodos

Foram realizadas coletas em quatro rios pertencentes a diferentes bacias hidrográficas no estado do Paraná (Figura 1). No rio Pinhão, município de Pinhão (25°35'49.52" S, 51°40'43.85" O), pertencente à bacia hidrográfica do Iguaçu foram amostrados 14 exemplares de *Neoplecostomus* sp. 1 (6 machos e 8 fêmeas). No rio Samambaias (24°13'16.84" S, 49°39'38.11" O), município de Jaguariaíva, bacia hidrográfica do rio Itararé foram amostrados 10 exemplares de *Neoplecostomus* cf. *botucatu* (6 machos e 4 fêmeas). Já no rio das Pedras (24°07'40.30" S, 50°14'11.55" O), município de Ventania, bacia hidrográfica do rio das Cinzas foram amostrados 21 exemplares de *Neoplecostomus* sp. 2 (11 machos e 10 fêmeas). No rio São João (24°53'46.61" S, 50°12'36.36" O), município de Carambeí, bacia hidrográfica do rio Tibagi, foram amostrados 15 exemplares de *Neoplecostomus yapo* (5 machos e 10 fêmeas) (Figura 2). Os peixes foram coletados na natureza com licença do Ministério do Meio Ambiente e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio/SISBIO: 15117-1).

As preparações citogenéticas seguiram a metodologia de Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978). A detecção da heterocromatina constitutiva foi realizada de acordo com a técnica descrita por Sumner (1972). Para as análises moleculares as lâminas foram submetidas a ensaios de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) de acordo com Pinkel, Straume e Gray (1986) com sondas de DNA ribossômico 18S e 5S. A sonda do rDNA 5S foi isolada através do genoma total de um indivíduo de *Neoplecostomus yapo* com os primers 5SA_forward: 5' TACGCCCCGATCTCGTCCGATC 3' e 5SB_reverse: 5' CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC 3'. Já a sonda do rDNA 18S foi isolada a partir do DNA nuclear de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI JÚNIOR, 2004). Ambas as sondas foram marcadas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando nucleotídeos marcados biotina 16-dUTP (Roche) e digoxigenina 11-dUTP (Roche).

O protocolo geral da FISH utilizado foi sob alta condição de estringência (2,5 ng/μL sonda, 50% formamida, 2xSSC, 10% sulfato dextrano, 37°C por 16 h). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos Streptavidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Invitrogen) e Anti-digoxigenina conjugada com Rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contraincorados com DAPI (0,2 μg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector) e analisados no microscópio de epifluorescência Zeiss

Axio Imager A2 acoplado ao *software* ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®) em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels.

Depois de capturadas, as fotografias dos cromossomos foram recortadas e organizadas em cariótipos com uso do *software* Adobe Photoshop versão CC 2015, onde os homólogos foram pareados e dispostos em grupos metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a). A classificação cromossômica adotada foi a proposta por Levan, Fredga e Sandberg (1964). Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com dois braços cromossômicos e os cromossomos acrocêntricos com apenas um braço.

Para a extração de DNA genômico, foram utilizadas amostras de fígado seguindo o método CTAB *cetyltrimethylammonium bromide* de Murray e Thompson (1980). Após a extração, foi verificada a integridade do DNA em gel de agarose 1% e as amostras quantificadas em um *Nanovue* (GE Healthcare). Foram diluídas amostras de DNA para a utilização na técnica de PCR onde foram amplificados segmentos do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI). A reação de amplificação da sequência COI foi realizada com a utilização dos primers denominados de *Fish F1* e *Fish R1* (WARD et al. 2005). A reação foi composta por 1x *Taq Reaction buffer* (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 µM *primers* e 100 ng/mL de DNA molde. O programa da reação foi: desnaturação inicial por 2 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 52°C por 40 s, 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 10 min.

Após a amplificação, o resultado da PCR foi verificado em gel de agarose 1%, onde foram observadas bandas únicas entre 600 e 700 pares de base. As amostras foram então purificadas com kit *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante e submetidas ao sequenciamento nucleotídico, utilizando-se o equipamento ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Todas as sequências obtidas para a espécie foram inicialmente analisadas com o *software* *Geneious* 8.1.9 (KEARSE et al., 2012). As sequências foram então alinhadas usando o algoritmo *ClustalW* implementado no *Geneious*, onde foram checados possíveis erros no sequenciamento comparando com os dados já depositados no *GenBank* (NCBI) através da ferramenta BLAST. Para o cálculo das distâncias genéticas foi utilizado o *software* MEGA 7.0.14 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016),

utilizando o modelo de evolução de Kimura-2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). Para a análise de fluxo gênico e diversidade haplotípicas (h) e nucleotídica (π) foi utilizado o *software DnaSP* (LIBRADO; ROZAS, 2009) e para a análise da estruturação populacional e análise molecular de variância (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) foi utilizado o *software Arlequin 3.5.2.2* (EXCOFFIER; LISHCER, 2010). Utilizando o programa *PopArt 1.7* foram geradas redes de haplótipos através do critério de *median joining* (LEIGH; BRYANT, 2015). As análises de estruturação foram realizadas através das atribuições de cada indivíduo às populações utilizando inferência bayesiana, usando os *softwares Structure 2.3.4* (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) e *Bayesian Analysis of Population Structure - BAPS 6* (CORANDER et al., 2004; CORANDER; MARTTINEN, 2006). A árvore de inferência bayesiana foi gerada com o programa *MrBayes 3.2* (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003).

Resultados

1. Análises citogenéticas

Foi encontrado o número diploide de 54 cromossomos para as espécies de *Neoplecostomus* analisadas (rios Pinhão, Samambaias, Pedras e São João). A fórmula cariotípica ($18m+20sm+16st$) e número fundamental de 108 também foram os mesmos para as espécies amostradas (Figura 3). O bandamento C detectou poucas regiões heterocromáticas para as quatro populações, entre eles blocos no braço longo do par submetacêntrico 10 e na região pericentromérica do par subtelocêntrico 25, além de bandas menos evidentes em outros cromossomos (Figura 4).

A hibridização *in situ* do gene ribossomal 18S demonstrou a localização do sítio ribossomal 45S no par submetacêntrico 10 em região intersticial do braço longo para as quatro espécies amostradas. Por sua vez, a localização *in situ* do rDNA 5S demonstrou dois sítios cromossômicos: na região subterminal do cromossomo submetacêntrico 11 e na região proximal do par subtelocêntrico 24 (Figura 5).

2. Análises moleculares

Foram amplificadas e sequenciadas vinte e um fragmentos do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) de diferentes indivíduos de *Neoplecostomus*, sendo cinco do rio Pinhão, Samambaias e Pedras e seis do rio São João. As sequências não

mostraram inserções, deleções, códon de parada (*stop codons*) ou erros do sequenciamento. As vinte e uma sequências obtidas apresentaram 653 nucleotídeos com 154 sítios variáveis, diversidade nucleotídica $\pi = 0,06934$. O número de haplótipos considerados foi 21 com diversidade haplotípicas de $h = 1,00000$.

A divergência genética K2P entre *Neoplecostomus* cf. *botucatu* do rio Samambaias e *Neoplecostomus* sp. 2 do rio das Pedras foi de 4,7%, entre *Neoplecostomus* cf. *botucatu* e *Neoplecostomus* sp. 1 do rio Pinhão foi de 8,3% e entre *Neoplecostomus* cf. *botucatu* e *N. yapo* foi de 9,9%. Entre *Neoplecostomus* sp. 2 e 1 a divergência foi de 7,4%, entre *Neoplecostomus* sp. 2 e *N. yapo* de 9,2% e entre *Neoplecostomus* sp. 1 e *N. yapo* 8,3% (Tabela 1). Além disso, foram comparadas as vinte e uma sequências deste estudo com sequências depositadas no BOLD (*The Barcode of Life Data System*) das espécies *N. botucatu*, *N. selenae*, *N. paranensis* e *N. yapo* (Tabela 2). Os resultados demonstram que as sequências das espécies do rio Samambaias e das Pedras apresentam similaridade acima de 95% com *Neoplecostomus botucatu*. Por sua vez, as sequências das espécies do rio São João e Pinhão apresentam similaridade acima de 95% com *Neoplecostomus yapo*.

A análise da árvore de *neighbor joining* (Figura 6) agrupou algumas sequências de espécies diferentes em um mesmo clado, como ocorreu com a sequência Pedras_4664 do rio das Pedras inserida no ramo da espécie do rio Samambaias e as sequências Pinhão_4716 e Pinhão_4718 do rio Pinhão inseridas entre o ramo do rio São João. Os valores de *bootstrap* de clados variaram de 15 a 97%. A análise Bayesiana (Figura 7), considerando o modelo de substituição HKY+G (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985) gerado pelo *Modeltest*, evidenciou quatro ramos consistentes: *Neoplecostomus* sp. 1 do rio Pinhão (bacia do Rio Iguaçu); *Neoplecostomus* cf. *botucatu* do rio Samambaias (Itararé); *Neoplecostomus* sp. 2 do rio das Pedras (Cinzas) e *Neoplecostomus yapo* do rio São João (Tibagi). Os valores de probabilidade posterior variaram de 55 a 100%. *Hemipsilichthys gobio* foi utilizada como *outgroup* para enraizamento da árvore e mostrou possuir um ancestral comum com todas as espécies analisadas, se situando fora do grupo de interesse.

As sequências *barcode* de *Neoplecostomus* obtidas foram utilizadas também para a construção de uma rede de haplótipos. Essa rede evidencia que não há sobreposição de haplótipos entre as espécies e que os haplótipos de uma mesma espécie são mais próximos entre si quando comparados às demais (Figuras 8 e 9). Através dos dados da análise de variância molecular (AMOVA), foi possível verificar o valor de variância

entre dos grupos de 13,30% e dentro dos grupos de 66,55% com um valor de $\Phi_{ST}=0.33450$ (Tabela 3).

Com relação às análises de inferência de estruturação populacional, a análise gerada no BAPS (*Bayesian Analysis of Population Structure*) indicou que não há sobreposição das sequências, indicando dois grupos: Samambaias e Pedras (Vermelho) e Pinhão e São João (Verde) (Figura 10). Apenas a sequência A03 do rio São João não foi incluída em nenhum grupo. Na análise de inferência de estruturação populacional gerada *Structure* considerando $k=2$ (2 grupos) também foram observados dois grupos: Samambaias e Pedras (Vermelho) e Pinhão e São João (Verde) (Figura 11). A probabilidade de atribuição das sequências foi próxima de 90%. Quando considerado $k=3$, também foi observado o grupo Samambaias e Pedras (Verde), São João (Vermelho) e Pinhão (Azul) (Figura 12), sendo que algumas sequências não ficaram definidas em grupos distintos, principalmente entre Pinhão e São João. Sequências do rio Pinhão apresentam 50-60% de atribuição ao grupo São João e sequências do rio São João com até 40% de atribuição ao grupo Pinhão.

Discussão

A citogenética tem auxiliado nos últimos anos a caracterizar geneticamente diversas famílias de peixes e tem demonstrado algumas tendências cariotípicas em cada uma delas (ZIEMNICZAK et al., 2012). Dentro de Loricariidae, algumas subfamílias apresentam tendência ao aumento ou redução do número cromossômico, como é o caso de Hypostominae, onde poucas espécies apresentam o número diploide basal de 54 cromossomos (MARIOTTO et al., 2011; BUENO; ZAWADZKI; MARGARIDO, 2012). Em subfamílias mais diversificadas como, por exemplo, Loricariinae, os dados citogenéticos apontam uma grande diversidade tanto no que se refere ao número de cromossomos quanto à fórmula cariotípica (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005). Na tribo Hypoptopomatini poucas espécies apresentaram variação do número diploide basal (ANDREATA et al., 2000) e em Neoplecostomini, até o momento, todas conservam este valor (ZIEMNICZAK et al., 2012).

Os estudos citogenéticos realizados demonstram que as espécies pertencentes à *Neoplecostomus* apresentam estruturas cariotípicas similares, sugerindo uma aparente conservação cariotípica. Além da organização cariotípica conservada, os exemplares do gênero *Neoplecostomus* são próximos morfologicamente, apesar de formar populações com suposta baixa vagilidade e com tendências ao isolamento em cabeceiras dos rios.

Porém, vale ressaltar que este isolamento deve ser encarado como temporalmente pontual, uma vez que estes organismos acompanham as variações de nível hidrológico dos rios e riachos ao longo dos períodos climáticos (ROXO et al., 2012). Com relação ao número diploide, todas as espécies até então estudadas mantiveram o caráter basal para Loricariidae (KAVALCO et al., 2004a; ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005; RUBERT et al., 2010; ZIEMNICZAK et al., 2012), inclusive as quatro espécies avaliadas neste estudo.

Apesar da conservação do $2n$, variações de fórmula cariotípica já foram observadas em estudos de citogenética comparativa de *Neoplecostomus*. Para a bacia do rio Paraíba do Sul, *N. microps* do rio Paraitinga, apresentou $2n=54$ cromossomos e fórmula cariotípica: $24m+20sm+10st$, $NF=108$ (KAVALCO et al., 2004a). Enquanto que, *N. microps* do riacho Grande apresentou $2n=54$ cromossomos e fórmula cariotípica: $20m+20sm+14st$ (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005). *Neoplecostomus paranensis* foi estudada citogeneticamente em duas regiões do Brasil: riacho Sapateiro, região de Barbacena, Minas Gerais e riacho Hortelã, região de Botucatu, São Paulo, embora esta última possa corresponder à *N. botucatu*, descrita posteriormente. Em ambas as localidades, as espécies apresentaram o mesmo número diploide e a mesma fórmula cariotípica: 54 cromossomos e fórmula cariotípica $20m+20sm+14st$ (ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005).

Na bacia do rio Tibagi, dois estudos citogenéticos já foram realizados em *N. yapo*. Um deles, realizado no rio Verde, região de Ponta Grossa (alto Tibagi) demonstrou número diploide de $2n=54$ cromossomos com fórmula cariotípica: $18m+20sm+16st$ e $NF=108$ (ZIEMNICZAK et al., 2012). O outro estudo foi realizado no ribeirão dos Apertados, região de Londrina (baixo Tibagi) demonstrou o mesmo número diploide, porém com variações na fórmula cariotípica: $22m+20sm+12st-a$ (RUBERT et al., 2010).

Outro marcador amplamente utilizado para a diferenciação citogenética, além do número diploide e do número fundamental é a distribuição da heterocromatina nos cromossomos através da técnica de Banda C. Esta ferramenta torna-se um marcador citogenético importante porque permite estimar a diversidade dentro de grupos, através da variabilidade estrutural dos cromossomos. Além disso, pode ser útil na compreensão da organização e diferenciação de genomas (KAVALCO et al., 2004a).

As regiões heterocromáticas de *N. microps* estão restritas a regiões intersticiais dos pares cromossômicos 14 e 25 (KAVALCO et al., 2004a). Para *N. yapo* do baixo

Tibagi, as bandas estão localizadas na região pericentromérica de um par st e no par 12 associado provavelmente às regiões organizadoras do nucléolo (RUBERT et al., 2010). Ziemniczak et al. (2012) observaram em *N. yapo* do alto Tibagi blocos heterocromáticos no braço longo dos pares 10 e 24 e outras bandas menos evidentes em regiões centroméricas de outros cromossomos. Portanto, pode-se notar que de maneira geral, as espécies pertencentes a esse gênero apresentam um cariótipo constituído basicamente de regiões eucromáticas e que as marcações estão restritas a dois pares cromossômicos (KAVALCO et al., 2004a). Isso também pode ser observado nas espécies de *Neoplecostomus* deste estudo, onde foram verificadas poucas regiões de heterocromatina.

Ainda são escassos os estudos de citogenética molecular em *Neoplecostomus*. Em *N. yapo* do rio Tibagi, o rDNA 18S foi localizado na região intersticial do braço longo do par de cromossomos sm 10 e os sítios de rDNA 5S foram localizados em região intersticial do braço longo do par 24 (ZIEMNICZAK et al., 2012). Um estudo realizado por Kavalco et al. (2004b) em *Neoplecostomus microps* utilizando apenas sonda do rDNA 5S, também foi observado apenas um sítio intersticial. Neste trabalho, foram detectados dois sítios para o rDNA 5S um no par cromossômico 11 e outro no par 24. Desta forma, este estudo evidencia pequenas variações cromossômicas entre espécies de *Neoplecostomus*, principalmente em relação ao número de cópias do rDNA 5S.

Assim como na taxonomia tradicional onde caracteres morfológicos são utilizados para reconhecer espécies, no DNA *Barcoding* a variação nucleotídica é utilizada para este princípio (HERBERT et al., 2003; WARD et al., 2005). Contrário aos resultados citogenéticos, o isolamento genético entre as espécies foi demonstrado neste estudo com as análises de DNA *Barcoding*. As populações identificadas neste estudo como *Neoplecostomus* sp. 1, *Neoplecostomus* cf. *botucatu*, *Neoplecostomus* sp.2 e *N. yapo* apresentaram taxas de divergência genética que variaram de 4,7 a 9,9%. Ward et al. (2009) analisaram a distribuição da divergência genética das sequências *barcode* entre 1088 espécies de peixes e, baseados em análises estatísticas, sugeriram se um espécime desconhecido apresentar um valor de divergência genética maior que 2% em relação a um espécime conhecido, esse espécime teria 95% de probabilidade de representar uma espécie diferente (HERBERT et al., 2003; WARD et al., 2005, 2009; PEREIRA, 2011).

Os valores de Φ_{st} indicam quanto ao fluxo gênico e estruturação populacional. Estes valores de Φ_{st} representam estruturação populacional baixa (0 - 0,05), moderada (0,05 - 0,15), alta (0,15 - 0,25) e, acima de 0,25, representa forte estruturação

populacional. Valores próximos a 1 são encontrados entre espécies diferentes (WRIGHT, 1978; HARTL; CLARK, 1997). Os resultados deste estudo apontam para uma forte estruturação das espécies de *Neoplecostomus* (valor obtido de Φ_{st} superior a 0,25). Em adição, os dados da árvore de *neighbor joining* não separaram as sequências das quatro espécies em clados sem sobreposições. Por sua vez, os dados da análise Bayesiana demonstram proximidade entre as espécies do rio Samambaias e Pedras, porém separadas em clados distintos, bem como a espécie do São João. As sequências do rio Pinhão se organizaram em dois ramos, ambos com altos valores de suporte. Esses dados condizem com os valores de divergência genética e de Φ_{st} e indicam estruturação populacional.

O valor de *bootstrap* do ramo que sustenta as sequências do Pinhão e São João (56%) é inferior ao observado no ramo que sustenta Pedras e Samambaias (92,7%). Além do valor de *bootstrap* considerado baixo para o suporte do ramo contendo Pinhão e São João há ainda uma parafilia em relação a alguns indivíduos amostrados no rio Pinhão, que se agrupam em um ramo distinto com alto valor de suporte, indicando um processo de separação de recente desse ramo. Vale ressaltar que os locais de amostragem das populações de *Neoplecostomus* correspondem ao sistema do rio Paraná. *Neoplecostomus* sp.1, pertencente a bacia do rio Iguaçu, sistema do Baixo Rio Paraná é a única que apresenta uma barreira geográfica histórica à aproximadamente 22 milhões de anos, representado pelas Sete Quedas (BONETTO, 1986; BRITSKI; LANGEANI, 1988). Já *Neoplecostomus* cf. *botucatu*, *Neoplecostomus* sp. 2 e *N. yapo* pertencem ao sistema do Alto Rio Paraná e foram amostradas nas cabeceiras de três diferentes sub-bacias iniciais do rio Paranapanema: Itararé, Cinzas e Tibagi, respectivamente. A população de *N. yapo*, da bacia do rio Tibagi, bem como a população do rio Pinhão demonstraram estruturação e ausência de fluxo gênico por um longo período evolutivo. As populações de *Neoplecostomus* cf. *botucatu* e *Neoplecostomus* sp. 2 apresentaram estruturação média e restrição de fluxo gênico recente entre as populações, o que pode ser explicado pela ausência de barreira geográfica e maior proximidade entre as duas sub-bacias da margem esquerda do alto rio Paranapanema.

As análises de estruturação populacional do BAPS e do *Structure* (k=2) mostraram a ocorrência de dois grupos, demonstrando que as espécies do rio das Pedras e Samambaias podem pertencer a um mesmo grupo e São João e Pinhão a outro grupo. Entretanto, quando a análise do *Structure* é considerada com três grupos (k=3), observa-se que algumas sequências do Pinhão apresentam baixa similaridade com os outros dois

grupos, especialmente com o grupo Pedras e Samambaias. Isso indica que as sequências do rio Pinhão compartilham maior similaridade com as sequências do rio São João, mas que a espécie do rio Pinhão pode formar outro grupo.

A análise de identificação de espécies de acordo com o BOLD demonstraram similaridade com duas espécies (*N. botucatu* e *N. yapo*) e está de acordo com a análise do BAPS e do *Structure*. Nesta análise, as espécies dos rios Samambaias e Pedras são correspondentes a *N. botucatu* e as espécies do rio São João e Pinhão correspondentes a *N. yapo*. A princípio a população do rio Pinhão teria identificação molecular para pertencer à *N. yapo* e a população do rio das Pedras à *N. botucatu*. Entretanto, os valores de divergência genética entre as populações de cada grupo, indicam 4,7% de divergência genética entre Samambaias e Pedras e 8,3% entre as populações Pinhão e São João (este último considerado alto). Incertezas taxonômicas e a identificação de novas espécies de Neoplecostominae já foram demonstradas com o emprego de métodos moleculares (ZAWADZKI et al., 2004; LUCENA et al., 2012; ROXO; OLIVEIRA; ZAWADZKI, 2012; ROXO et al., 2014). Vale ressaltar que embora estes dados indiquem duas novas espécies, outros modos de análises devem ser levadas em consideração inclusive a identificação taxonômica dos indivíduos.

Em um estudo recente foi descrito cientificamente *Neoplecostomus paraty* Cherobim, Lazzarotto & Langeani, 2016 com base em dados morfológicos e análises das sequências parciais do gene COI. Os dados de distância genética de *N. paraty* quando comparada à *N. microps* do rio Paraíba do Sul foram entre 2,04 e 3,22%. Embora os valores sejam próximos a 2%, que é considerado o valor limite para peixes, essas duas espécies apresentam diferenças no padrão de coloração e estão separadas por um longo período evolutivo por uma barreira geográfica, a Serra da Bocaina na divisa dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (CHEROBIM; LAZZAROTTO; LANGEANI, 2016). No presente trabalho, os valores de distância genética de *Neoplecostomus* sp. 1 são superiores aos encontrados para a descrição de *N. paraty* e, considerando o isolamento geográfico histórico do rio Iguaçu (BONETTO, 1986; BRITSKI; LANGEANI, 1988), esses dados, juntamente com a análise Bayesiana e a rede haplotípica demonstraram a possibilidade de uma espécie não descrita para o rio Pinhão, a qual é estreitamente relacionada à *N. yapo*. Neste estudo, o emprego de métodos citogenéticos e moleculares foram utilizados no reconhecimento da diversidade de *Neoplecostomus* em populações de afluentes do rio Paranapanema (Cinzas, Itararé e Tibagi) e rio Iguaçu. Os resultados obtidos demonstraram uma grande conservação do

cariótipo, comum a exemplares de Neoplecostominae (KAVALCO et al., 2004a; ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2005; RUBERT et al., 2010; ZIEMNICZAK et al., 2012). Em adição, a metodologia *barcode*, a análise Bayesiana, rede haplotípica e os índices Φ_{st} demonstraram ausência de fluxo gênico e valores compatíveis para a indicação de uma espécie não descrita para o rio Pinhão.

Considerações Finais

Os resultados genéticos deste estudo demonstraram uma alta estabilidade cariotípica para as espécies do gênero *Neoplecostomus*. Esta estabilidade cariotípica é também observada para a subfamília Hypoptopomatinae. Em adição, os resultados da análise molecular indicam para ocorrência de duas espécies ainda não descritas para a *Neoplecostomus* do rio Pinhão e do rio das Cinzas. Diante deste aspecto, é importante ressaltar a estabilidade cromossômica em Neoplecostomini e a importância de integrar os dados morfológicos, citogenéticos e moleculares para a determinação da biodiversidade do gênero.

Tabela 2: Distâncias genéticas baseadas no modelo Kimura-2-Parâmetros entre pares de sequências (matriz inferior), entre as médias interpopulacionais (matriz superior) e médias intrapopulacionais.

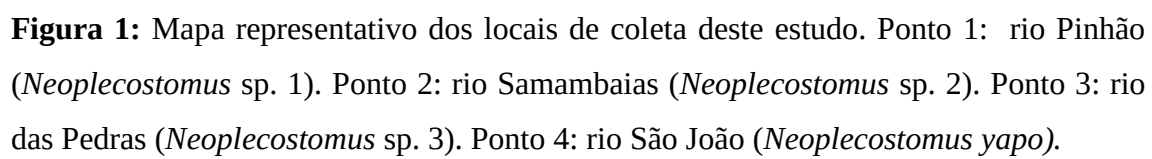
	Samambaias					Pedras					Pinhão					São João								
	a	b	c	D	E	F	G	H	i	J	k	L	M	N	o	p	q	r	s	t	u			
(a) Samambaias_4618						0,047					0,083					0,099								
(b) Samambaias_030																						0,031		
(c) Samambaias_4779																						0,029	0,038	
(d) Samambaias_033																						0,040	0,045	0,043
(e) Samambaias_031																						0,040	0,027	0,044
(f) Pedras_4657	0,051	0,034	0,051	0,055	0,036						0,074					0,092								
(g) Pedras_4659	0,051	0,034	0,047	0,051	0,036																	0,007		
(h) Pedras_4658	0,047	0,038	0,047	0,051	0,036																	0,011	0,014	
(i) Pedras_4660	0,047	0,031	0,047	0,051	0,032																	0,004	0,007	0,007
(j) Pedras_4664	0,068	0,051	0,064	0,057	0,053																	0,042	0,038	0,045
(k) Pinhao_4716	0,092	0,084	0,110	0,100	0,094	0,104	0,104	0,100	0,100	0,106						0,083								
(l) Pinhao_4718	0,082	0,072	0,086	0,082	0,082	0,094	0,086	0,090	0,090	0,092												0,045		
(m) Pinhao_4713	0,088	0,069	0,089	0,094	0,072	0,051	0,055	0,057	0,050	0,086												0,066	0,064	
(n) Pinhao_4717	0,084	0,069	0,079	0,092	0,071	0,053	0,053	0,053	0,050	0,083												0,066	0,057	0,018
(o) Pinhao_4714	0,081	0,069	0,079	0,089	0,071	0,048	0,051	0,050	0,050	0,086												0,062	0,057	0,014
(p) Sao_Joao_4638	0,148	0,137	0,155	0,151	0,135	0,133	0,142	0,138	0,133	0,157	0,126	0,125	0,123	0,119	0,118									
(q) Sao_Joao_4459	0,084	0,088	0,098	0,096	0,098	0,107	0,103	0,100	0,104	0,090	0,063	0,064	0,096	0,094	0,092							0,110		
(r) Sao_Joao_4462	0,092	0,072	0,092	0,098	0,076	0,057	0,061	0,057	0,053	0,094	0,100	0,094	0,047	0,049	0,049							0,108	0,084	
(s) Sao_Joao_4465	0,112	0,098	0,116	0,121	0,100	0,080	0,084	0,084	0,078	0,120	0,126	0,120	0,070	0,070	0,070							0,126	0,112	0,042
(t) Sao_Joao_4639	0,090	0,074	0,092	0,090	0,073	0,078	0,082	0,082	0,074	0,096	0,092	0,078	0,065	0,065	0,068							0,096	0,068	0,047
(u) Sao_Joao_4640	0,078	0,063	0,078	0,080	0,070	0,067	0,071	0,067	0,063	0,092	0,080	0,074	0,053	0,053	0,053	0,088	0,064	0,034	0,060	0,029				
	Samambaias					Pedras					Pinhão					São João								
Distância média intrapopulacional	0,036852131					0,021247631					0,046467943					0,075724								

Tabela 3: Resumo da identificação das espécies de acordo com a similaridade das sequências de *Barcode* obtidas com aquelas depositadas no BOLD Systems.

Sequência consultada	Correspondência máxima	%
Samambaias_030	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus botucatu</i>	97,24
Samambaias_4779	Sem correspondência	-
Samambaias_033	Sem correspondência	-
Samambaias_031	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus botucatu</i>	97,4
Samambaias_4618	Sem correspondência	-
Pedras_4657	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus botucatu</i>	99,81
Pedras_4659	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus botucatu</i>	99,44
Pedras_4658	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus botucatu</i>	99,06
Pedras_4660	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus botucatu</i>	99,81
Pedras_4664	Sem correspondência	-
Pinhão_4716	Sem correspondência	-
Pinhão_4718	Sem correspondência	-
Pinhão_4713	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus yapo</i>	97,44
Pinhão_4717	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus yapo</i>	97,09
Pinhão_4714	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus yapo</i>	97,25
São_João_4638	Sem correspondência	-
São_João_4459	Sem correspondência	-
São_João_4462	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus yapo</i>	99,31
São_João_4465	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus yapo</i>	97,85
São_João_4639	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus yapo</i>	98,23
São_João_4640	Chordata: Siluriformes: <i>Neoplecostomus yapo</i>	97,71

Tabela 4: Resultados da análise molecular de variância (AMOVA) para todas as populações considerando (Samambaias + Pedras) e (Pinhão + São João) ($p < 0,01$).

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	% de variação
Entre os grupos	1	123.000	5.03867 V_a	13.30
Entre populações com os grupos	2	133.761	7.63765 V_b	20.15
Dentro das populações	18	453.967	25.22037 V_c	66.55
Total	21	710.727	3.789.669	
Índice de fixação	$\Phi_{SC} = 0.23244$ $\Phi_{ST} = \mathbf{0.33450}$ $\Phi_{CT} = 0.13296$			



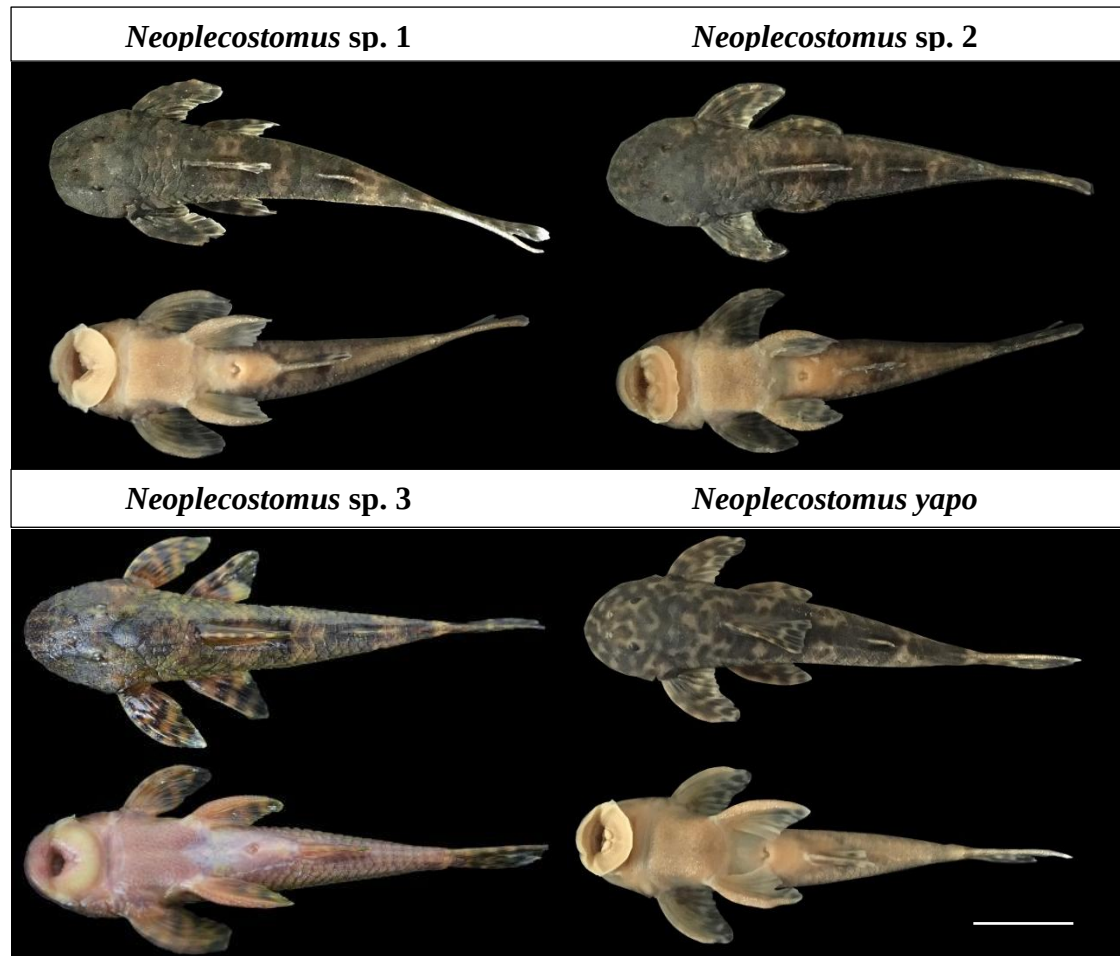


Figura 2: Espécimes de *Neoplecostomus* estudados neste trabalho. *Neoplecostomus* sp. 1 do rio Pinhão, *Neoplecostomus* sp. 2 do rio Samambaias, *Neoplecostomus* sp. 3 do rio das Pedras e *Neoplecostomus yapo* do rio São João. O tamanho da barra corresponde a 2 cm.

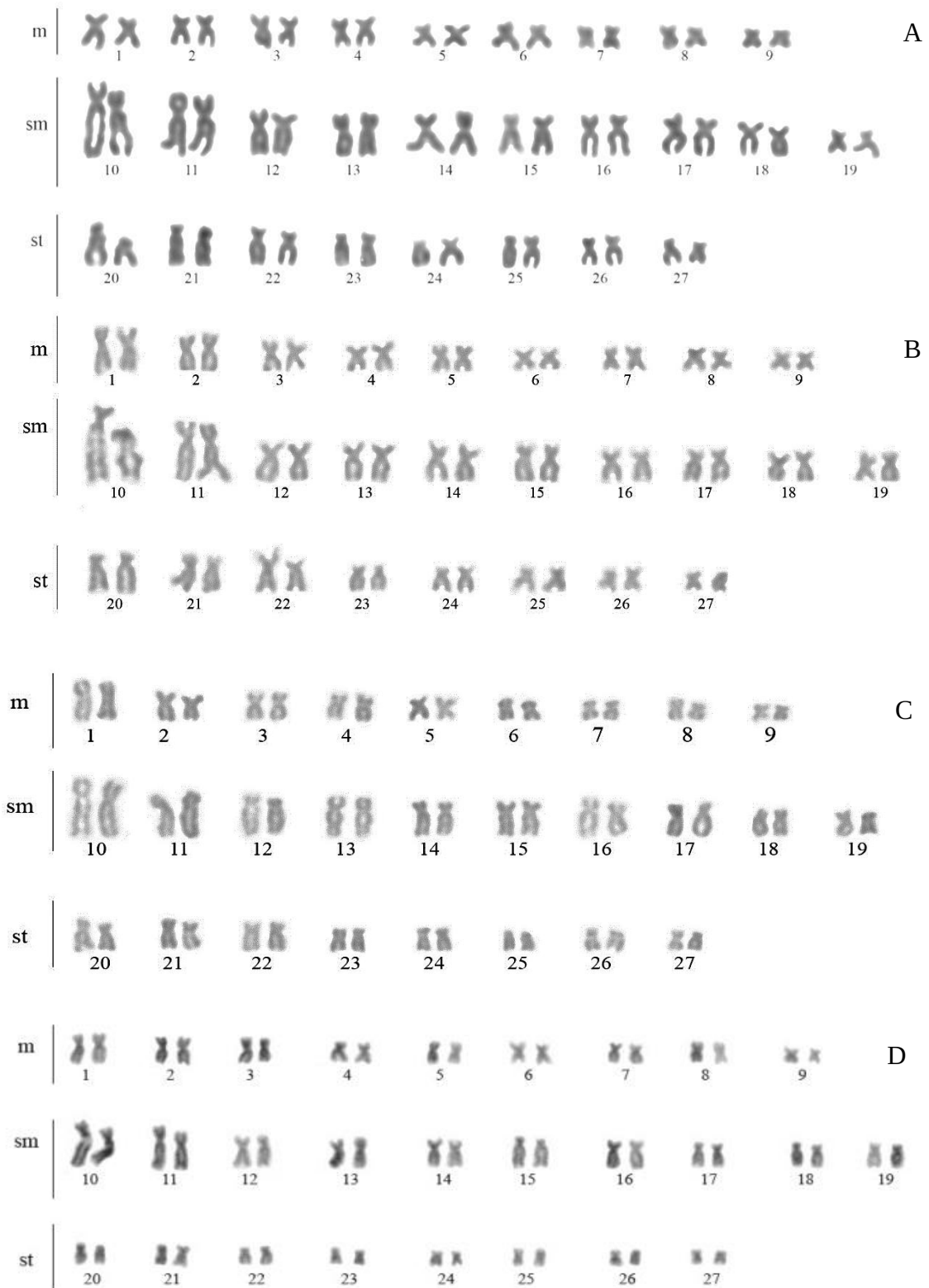


Figura 3: Cariótipos de *Neoplecostomus* submetidos à coloração convencional por Giemsa. A) *Neoplecostomus* sp. 1, rio Pinhão. B) *Neoplecostomus* sp. 2, rio Samambaias. C) *Neoplecostomus* sp. 3, rio das Pedras. D) *Neoplecostomus yapo*, rio São João. Barra = 10 μ m.

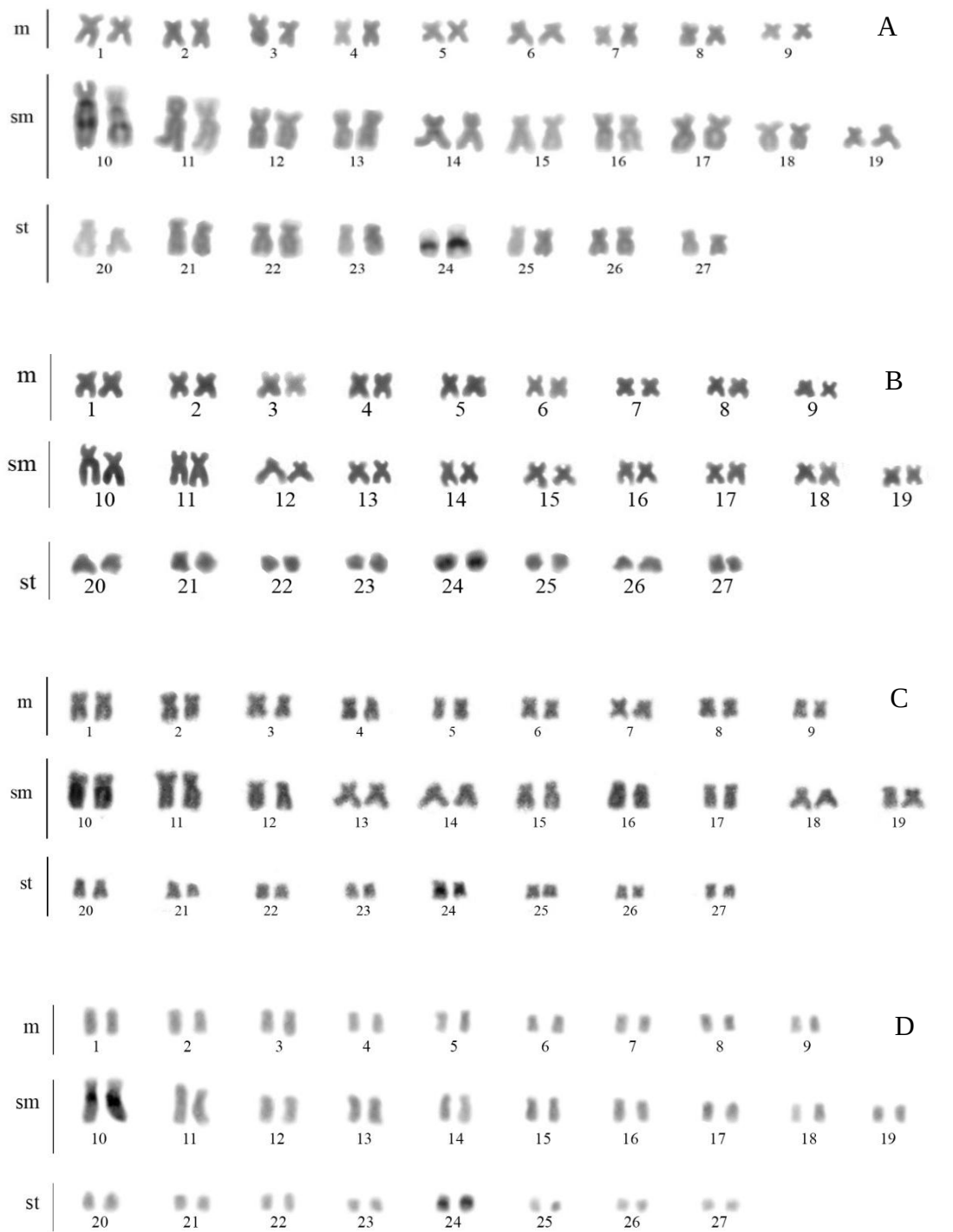


Figura 4: Cariótipos de *Neoplecostomus* submetidos à técnica de bandamento C. A) *Neoplecostomus* sp. 1, rio Pinhão. B) *Neoplecostomus* sp. 2, rio Samambaias. C) *Neoplecostomus* sp. 3, rio das Pedras. D) *Neoplecostomus yapo*, rio São João. Barra = 10 μm.

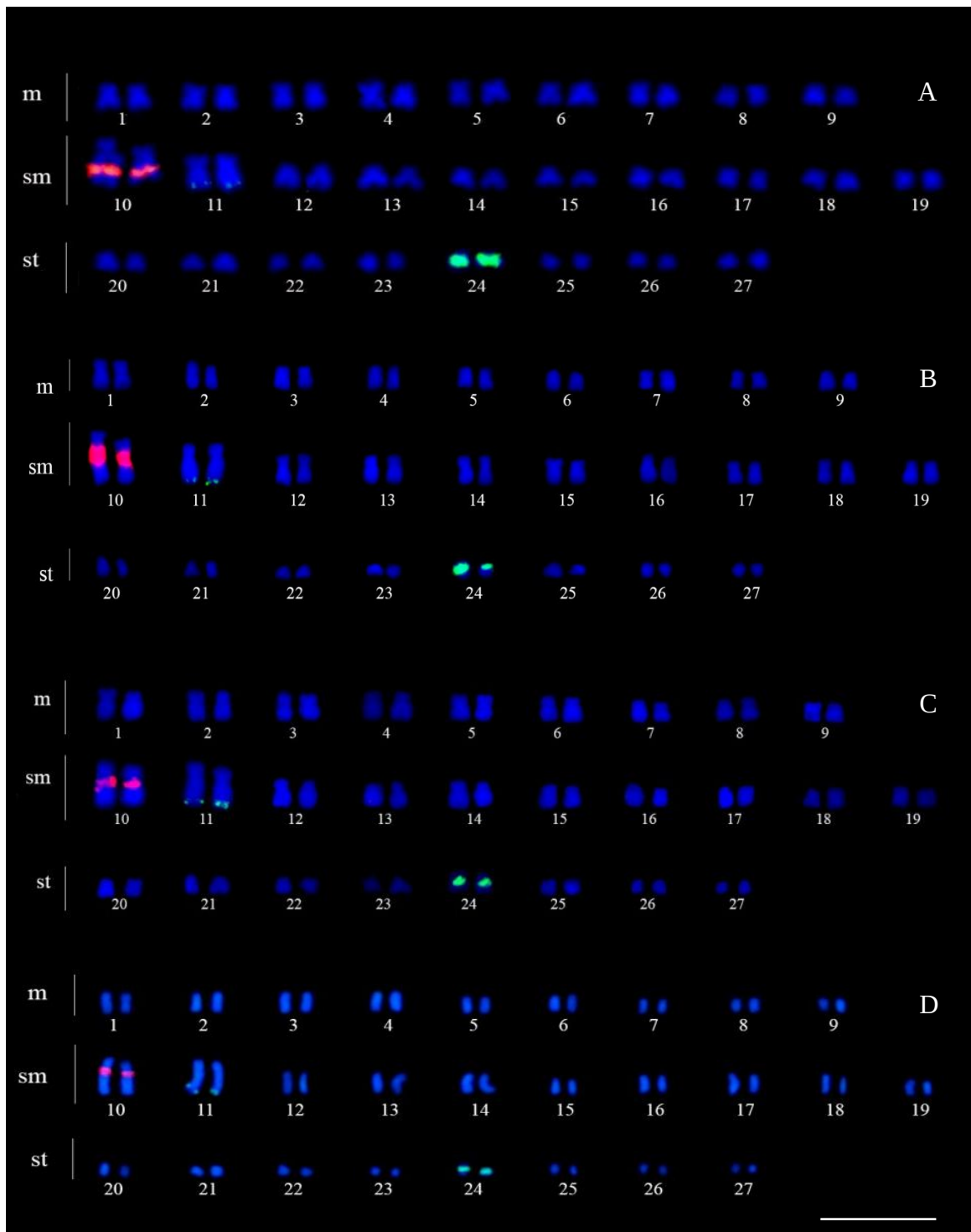


Figura 5: Cariótipos de *Neoplecostomus* submetidos à dupla FISH com sondas de rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde). A) *Neoplecostomus* sp. 1, rio Pinhão. B) *Neoplecostomus* sp. 2, rio Samambaias. C) *Neoplecostomus* sp. 3, rio das Pedras. D) *Neoplecostomus yapo*, rio São João. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI. Barra = 10 μm.

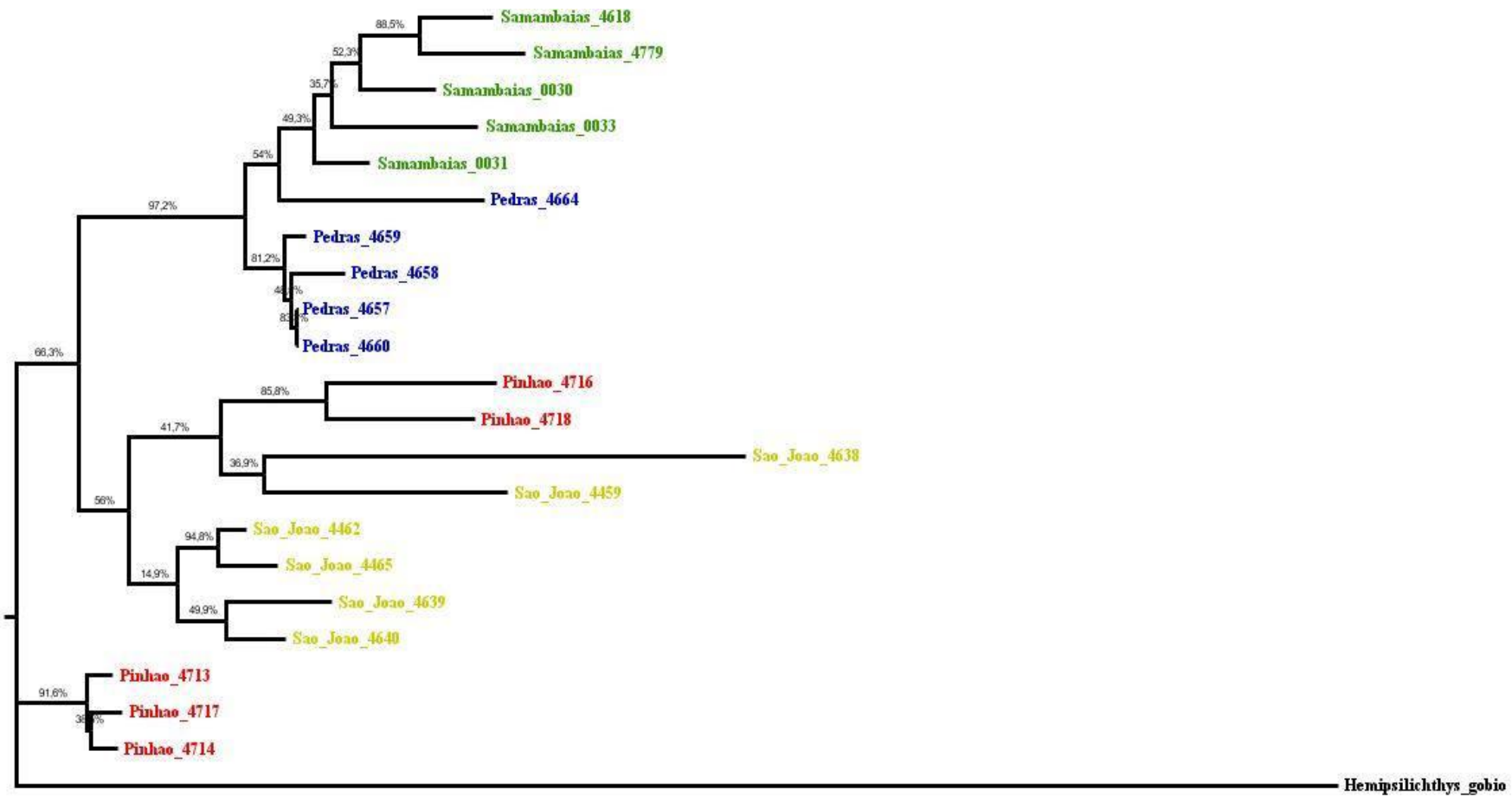


Figura 6: Árvore de *neighbor joining* construída com base nas distâncias genéticas segundo a taxa de substituição Kimura-2-Parâmetros. Números acima dos ramos indicam o valor de suporte de *bootstrap* com 1000 replicações.

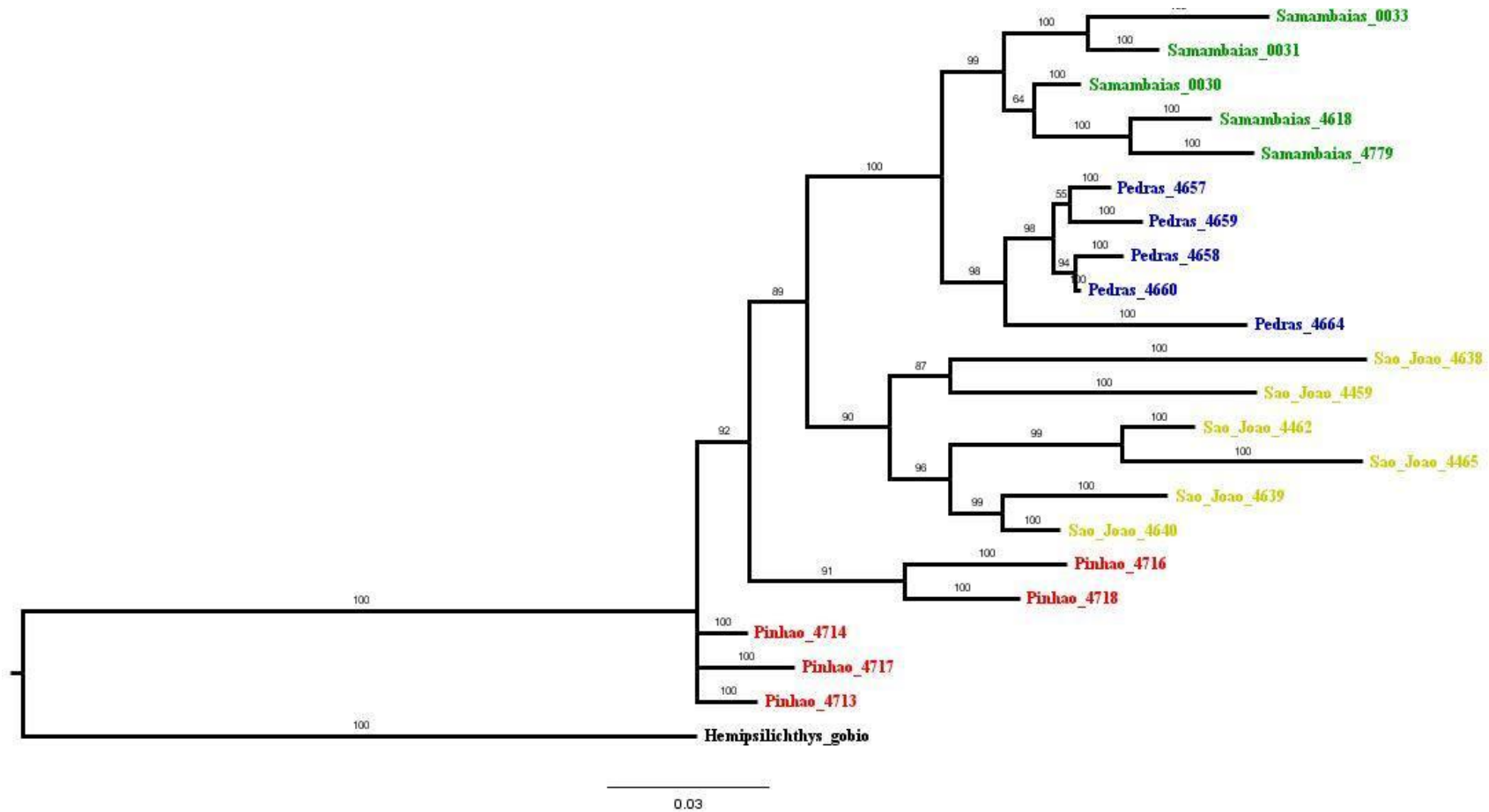


Figura 7: Análise Bayesiana construída com o software *MrBayes*. A árvore foi gerada com 1.500.000 gerações utilizando o modelo de substituição evolutiva HKY+G indicado pelo programa Modeltest.

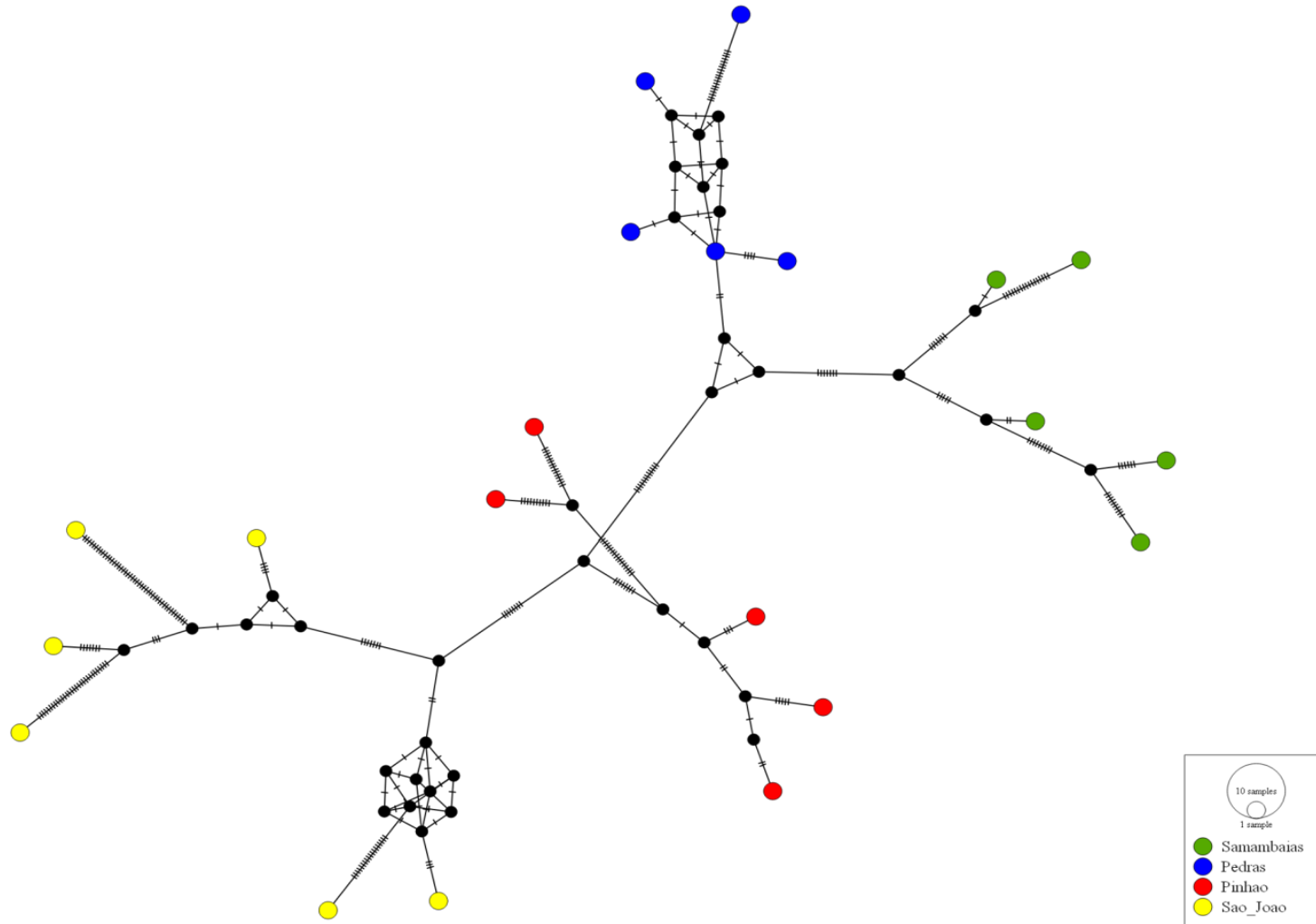


Figura 8: Rede de haplótipos construída através de *median joining* realizada no software *PopArt*. Cada círculo representa um haplótipo e é proporcional ao número de indivíduos que o compartilham.

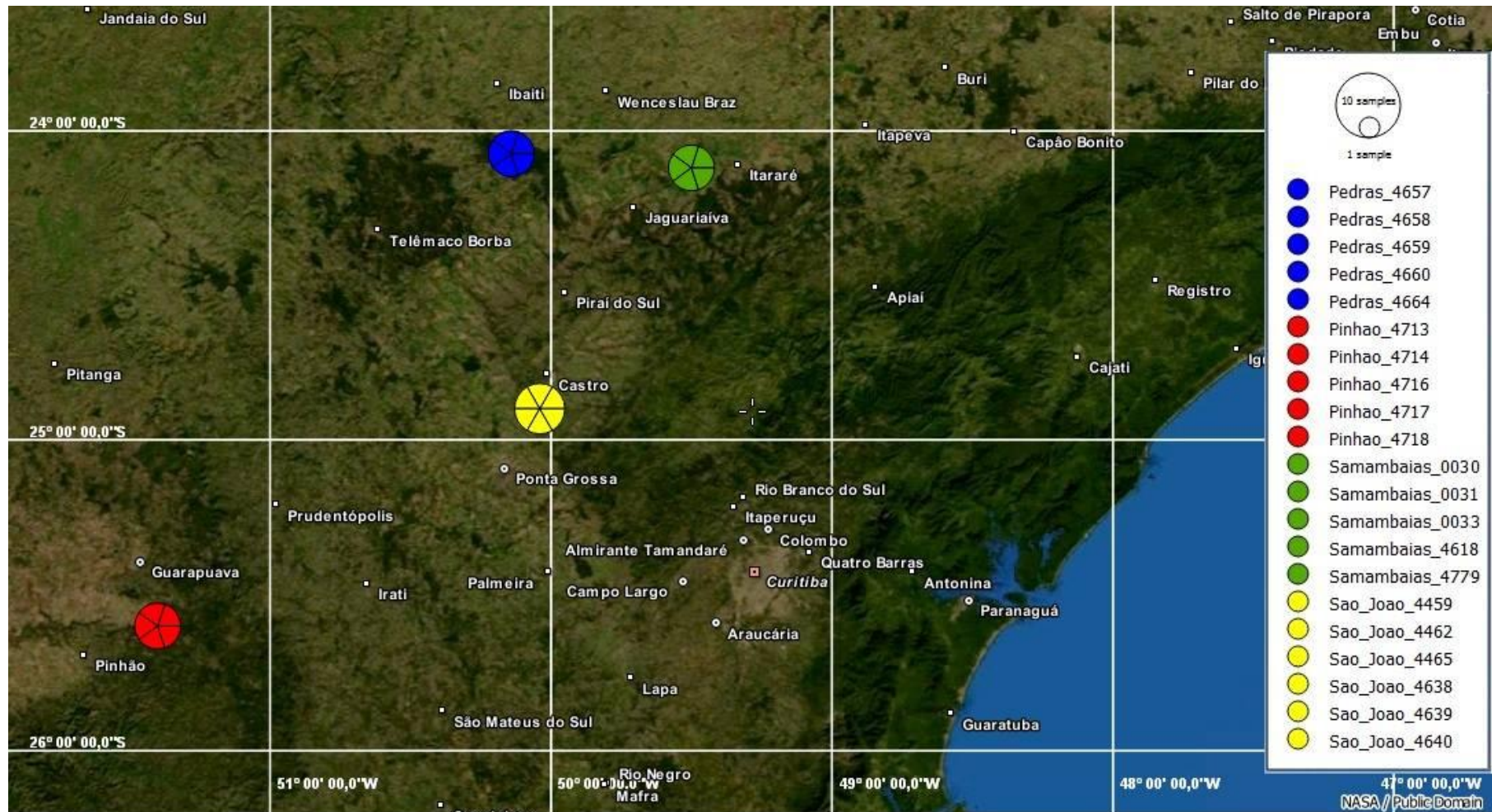


Figura 9: Disposição gráfica dos haplótipos realizada no software *PopArt* das quatro populações deste estudo de acordo com as coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

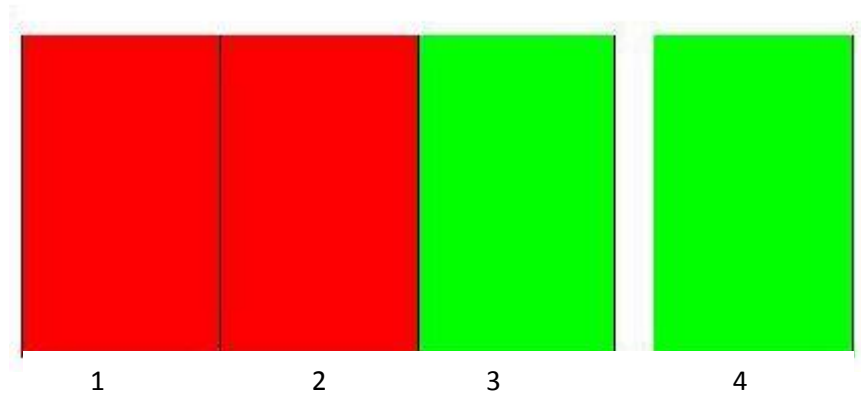


Figura 10: Análise de inferência de estruturação populacional do BAPS considerando as quatro populações, 1) Samambaias, 2) Pedras, 3) Pinhão e 4) São João.

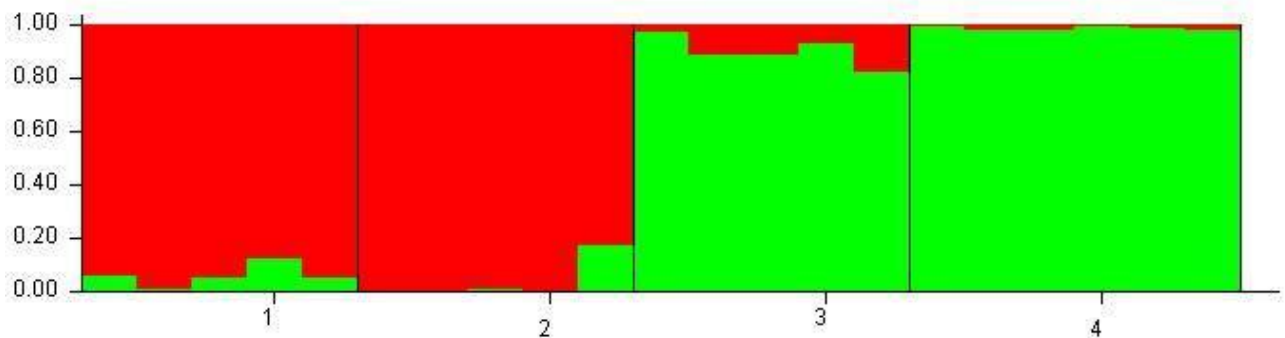


Figura 11: Análise de inferência de estruturação populacional Bayesiana do *Structure* considerando $k=2$. No eixo x estão as quatro populações deste estudo, 1) Samambaias, 2) Pedras, 3) Pinhão e 4) São João. No eixo y, encontram-se as probabilidades de atribuição.

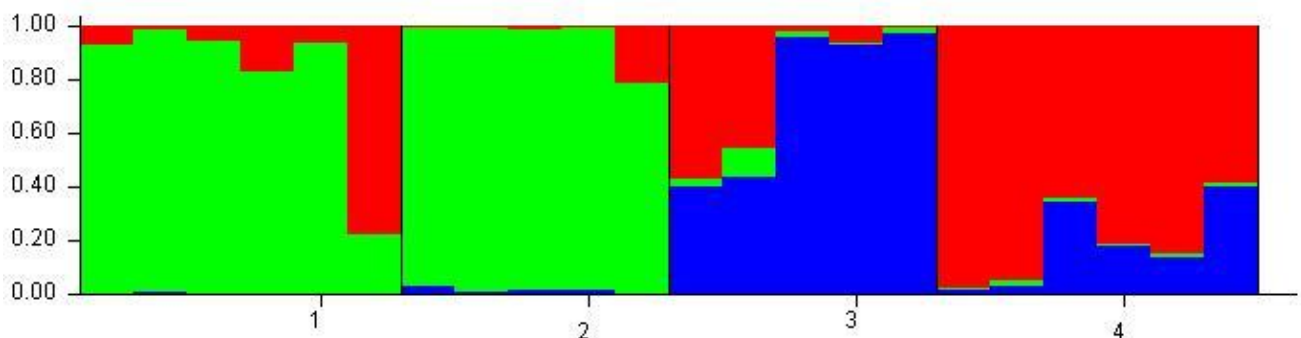


Figura 12: Análise de inferência de estruturação populacional Bayesiana do *Structure* considerando $k=3$. No eixo x estão as quatro populações deste estudo, 1) Samambaias, 2) Pedras, 3) Pinhão e 4) São João. No eixo y, encontram-se as probabilidades de atribuição.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes, Loricariidae). **Genetica**, v. 124, p. 127-136, 2005.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, p. 1-9, 2006.
- ANDRADE, B. N. **Uma espécie nova de *Neoplecostomus* Eigenmann & Eigenmann, 1888 (Siluriformes: Loricariidae: Neoplecostominae) do sistema do alto rio Paraná, com uma descrição osteológica completa de *Neoplecostomus microps* (Steindachner, 1876).** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, São José do rio Preto, 2012.
- ANDRADE, B. N.; LANGEANI, F. A new species of *Neoplecostomus* Eigenmann & Eigenmann, 1888 (Siluriformes: Loricariidae: Neoplecostominae) from the upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 4, p. 675-681, 2014.
- ANDREATA, A. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Analysis of seven species. **Caryologia**, v. 47, n. 1, p. 27-37, 1994.
- ANDREATA, A. A.; ALVES, A. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. *Hisonotus gibbosus* (Teleostei, Loricariidae) segundo Hypoptopomatíneo com número diploide diferente de 54 cromossomos. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 57, 2000.
- ANGELESCU, V.; GNERI, F. S. Adaptaciones del aparato digestivo al régimen alimenticio en algunos peces del Río Uruguay y del Río de La Plata. **Instituto Nacional de Investigacion de las Ciencias Naturales**, v. 6, p. 162-265, 1949.
- ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 1-80, 2004.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**, v. 49, n. 1, p. 81-90, 1996.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, p. 201-210, 2001.
- BELLAFRONTE, E.; MARGARIDO, V. P.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetics analyses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 710-716, 2005.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces; Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 2, n. 1, p. 17-37, 1978.

BIFI, A. G.; PAVANELLI, C. S.; ZAWADKI, C. H. Three new species of *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Iguaçu basin, Paraná State, Brazil. **Zootaxa**, v. 2275, p. 41-59, 2009.

BILLINGTON, N.; HERBERT, P. D. N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, p. 80-94, 1991.

BONETTO, A. A. The Paraná river system. In: Davies, B. R.; Walker, K. F. **The Ecology of River Systems**. Editora Springer, 1ª edição, p. 541-545, 1986.

BRITSKI, H. A.; LANGEANI, F. *Pimelodus paranaensis* sp. n, um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.5, n.3, p. 409-417, 1988.

BROWN, W. M.; GEORGE JÚNIOR, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1967-1971, 1979.

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

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

CAMILO, F. M. **Estudos citogenéticos em algumas espécies de peixes da família Loricariidae pertencentes à bacia do rio Piracicaba**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2004.

CAVALLINI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C. **Indução de Mitoses em *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae)**. In: II Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada a Peixes Neotropicais, Maringá, 1988.

CEREALI, S. S.; POMINI, E.; ROSA, R.; ZAWADZKI, C. H.; FROEHLICH, O.; GIULIANO-CAETANO, L. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetics and molecular research**, v. 7, n. 3, p. 583-591, 2008.

CHEROBIM, A. M.; LAZZAROTTO, H.; LANGEANI, F. A new species of the catfish *Neoplecostomus* (Loricariidae: Neoplecostominae) from a coastal drainage in southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 14, n. 4, p. 815-826, 2016.

CHIACHIO, M. C.; OLIVEIRA, C.; MONTOYA-BURGOS, J. I. Molecular systematic and historical biogeography of the armored neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 606-617, 2008.

CORANDER, J.; WALDMANN, P.; MARTTINEN, P.; SILLANPÄÄ, M. J. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2363-2369, 2004.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P. Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 2833-2843, 2006.

COVAIN, R.; FISCH-MULLER, S. The genera of the Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae): a practical key and synopsis. **Zootaxa**, v. 1462, p. 1-40, 2007.

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

CRAMER, C. A.; LIEDKE, A. M. R.; BONATTO, S. L.; REIS, R. E. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. **Bulletin of Fish Biology**, v. 9, p. 51-59, 2008.

de OLIVEIRA, C.; GOSZTONYI, A. E. A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriformes. **Caryologia**, v. 53, n. 1, p. 31-37, 2000.

de OLIVEIRA, M. L. M.; UTSUMONIA, R.; PANSONATO-ALVES, J. C.; SCACCHETTI, P. C.; PRIMO, C. C.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; CENTOFANTE, L.; MOREIRA-FILHO, O.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Microstructural chromosome reorganization in the genus *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 2, 2016.

de OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosomes heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, 301-306, 2007.

da ROSA, R.; VICARI, M. R.; DIAS, A. L.; GIULIANO-CAETANO, L. New Insights into the Biogeographic and Karyotypic Evolution of *Hoplias Malabaricus*. **Zebrafish**, v. 11, n. 3, 2014.

da SILVA, L. L. L.; SANTOS, A. R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Chromosomal characterization in two species of an *Astyanax bimaculatus* complex (Characidae, Characiformes) using different techniques of chromosome banding. **Cytotechnology**, 2015.

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

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Species of Fishes by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em 28/08/2015.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Species of Fishes by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em 14/11/2016.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, 1992.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite yer 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FERRARIS JÚNIOR, C. J. Subfamily Loricariinae. In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Júnior, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EdIPUCRS, 729 p., 2003.

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

GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae)**. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 1998.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the Human-Ape splitting by a molecular clock of Mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v. 22, p. 160-174, 1985.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. Editora Sinauer Associates, 3ª edição, 510 p., 1997.

HATANAKA, T.; GALETTI JÚNIOR, P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 122, p. 239- 244, 2004.

HERBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; deWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 270, p. 313-321, 2003.

HERBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, p. 1657-1663, 2004.

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

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

KAVALCO, K. F. **Contribuição citogenética à análise da biodiversidade da ictiofauna das nascentes do rio Paraitinga**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2003.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Hereditas**, v. 141, p. 237-242, 2004a.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 107-110, 2004b.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, v. 94, p. 180-186, 2005.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KIMURA, M. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Mega7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LANGEANI, F. **Revisão do gênero *Neoplecostomus*, com a descrição de quatro espécies novas do sudeste brasileiro (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae)**. Comunicações do Museu de Ciências - PUCRS, Sér. Zool, v. 3. n. 1, 1990.

LARA-KAMEI, M. C. **Aspectos citogenéticos de quatro espécies de peixes da subfamília Ancistrinae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do rio Paraná**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 1998.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. Application POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 1110-1116, 2015.

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

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LUCENA, A. L. M. ; RENESTO, E.; OLIVEIRA, C.; MATEUS, R. P.; ZAWADZKI, C. H. Genetic differentiation among ten populations of the genus *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper Paraná River basin. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 325-332, 2012.

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

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, C. S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA FILHO, O. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n.4, p. 595-600, 2009.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 4, p. 289-300, 2011.

MAURUTTO, F. A. M. **Contribuição à citogenética de peixes do gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Teleostei, Loricariidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

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

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 331-357, 1991.

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

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, 1980.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 4ª edição, p. 162-170, 2006.

PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; de La RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v. 7, n. 16, 2010.

PEREIRA, L. H. G. **Identificação molecular dos peixes da bacia do alto rio Iguaçu**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, 2011.

PEREIRA, L. H. G.; OLIVEIRA, C. Genômica e o código de barras da vida. In: Moreira, M. M. **Ciências Genômicas: Fundamentos e Aplicações**, Sociedade brasileira de Genética, p. 403, Ribeirão Preto, 2015.

PEREIRA, E. H. L.; OYAKAWA, O. T. *Isbrueckerichthys epakmos*, a new species of loricariid catfish from the Rio Ribeira do Iguape basin, Brazil (Teleostei: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**, v.1, n. 1, p. 3-9, 2003.

PEREIRA, E. H. L.; R. E. REIS. Revision of the loricariid genera *Hemipsilichthys* and *Isbrueckerichthys* (Teleostei: Siluriformes), with description of five new species of *Hemipsilichthys*. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 13, n. 2, p. 97-146, 2002.

PHILIPPSEN, J. S.; RENESTO, E.; GEALH, A. M.; ARTONI, R. F.; SHIBATTA, O. A.; ZAWADZKI, C. H. Genetic variability in four samples of *Neoplecostomus yapo* (Teleostei: Loricariidae) from the rio Paranapanema basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 1, p. 25-30, 2009.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. J. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JÚNIOR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of south and central America**. EdiPUCRS, p. 729, Porto Alegre, 2003.

REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L.; ARMBRUSTER, J. W. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 147, p. 277-299, 2006.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

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

ROXO, F. F.; OLIVEIRA, C.; ZAWADZKI, C. H. Three new species of *Neoplecostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) from upper Rio Paraná Basin of southeastern of Brazil. **Zootaxa**, v. 3233, p. 1-21, 2012.

ROXO, F. F.; ZAWADZKI, C. H.; ALEXANDROU, M. A. COSTA SILVA, G. J.; CHIACHIO, M. C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Evolutionary and biogeographic history of the subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Ecology and Evolution**, 2012.

ROXO, F. F.; SILVA, G. S. C.; ZAWADZKI, C. H.; OLIVEIRA, C. *Neoplecostomus doceensis*: a new loricariid species (Teleostei, Siluriformes) from the rio Doce basin and comments about its putative origin. **ZooKeys**, v. 440, p. 115-127, 2014.

RUBERT, M.; ROSA, R.; GIULIANO-CAETANO, L.; MOREIRA-FILHO, O. **Estudos citogenéticos preliminares em *Neoplecostomus yapo* e *Pareiorhaphis hypselurus* (Loricariidae, Neoplecostominae)**. In: Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética, p. 148, 2010.

SANTOS, M. R.; RENESTO, E. Genetic variability in *Oligosarcus paranensis* (Teleostei: Characiformes) from the São Francisco river, Ivaí river basin – Paraná State, Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 35, n. 3, p. 389-394, 2013.

SCHLICK-STEINER, B.; STEINER, F. M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E.; CROZIER, R. H. Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 421-438, 2010.

TRAVENZOLI, N. M.; SILVA, P. C.; SANTOS, U.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, C.; DERGAM, J. A. Cytogenetic and Molecular data demonstrate that the Bryconinae (Ostariophysi, Bryconidae) species from Southeastern Brazil form a phylogenetic and phylogeographic unit. **Plos One**, v. 10, 2015.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TORRES, R. A.; MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F. Genética de peixes neotropicais II. Biologia Molecular de peixes neotropicais. **Biological and Health Sciences**, v. 10, n. 2, p. 27-37, 2004.

VICARI, M. R.; NOLETO, R. B.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, 2008.

VICARI, M. R.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes: Parodontidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 114, p. 163-168, 2006.

WARD, R. D. DNA Barcode divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1077-1085, 2009.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. DNA Barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions of the Royal Society B**, v. 360, p. 1847-1857, 2005.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations**. University of Chicago Press, v. 4, 590 p., 1978.

ZAWADZKI, C. H.; ALVES, A. L.; RENESTO, E.; OLIVEIRA, C. Biochemical evidence of a possible new species of *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper Rio Parana basin, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 573-582, 2004.

ZAWADZKI, C. H.; PAVANELLI, C. S.; LANGEANI, F. *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the Upper Rio Paraná basin, Brazil, with description of three new species. **Zootaxa**, v. 1757, p. 31–48, 2008.

ZAWADZKI, C. H.; WEBER, C.; PAVANELLI, C. S. A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 4, p. 719-725, 2010.

ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A.V.; ROSA, K. O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; CESTARI, M. M.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Italian Journal of Zoology**, v. 79, p. 492-501, 2012.

ANEXOS

Anexo 1: Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/ IBAMA/ SISBIO: 15117-1



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15117-1	Data da Emissão: 26/03/2008 18:25
Dados do titular	
Registro no Ibama: 2537361	Nome: Marcelo Ricardo Vicari
CPF: 952.846.480-72	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exige o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Taxons autorizados

#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Cypriniformes, Synbranchiformes, Perciformes, Siluriformes, Gymnotiformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Citogenética de Peixes
2	Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro	colecção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61434795



Página 1/2

Anexo 2: Carta de aprovação da Comissão de ética do uso de animal

UEPG

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 029/2016

Protocolo UEPG – 8782/2016

Título – Prorrogação do projeto de pesquisa "Caracterização de genes relacionados a diferenciação gonadal e elementos transponíveis: modelo em peixes neotropicais. Processo aprovado sob o protocolo UEPG 2855/2014 e carta de aprovação CEUA 13/2014

Interessado: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Data de Entrada – 03/06/2016

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 03/06/2016 a 31/08/2017

Considerações

Prezado Professor Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Em relação à utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de aprovada a utilização de 30 peixes.

Ponta Grossa, 03 de junho de 2016.

Atenciosamente,


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROPP - CEEA - Comissão de Ética do Uso de Animais
Prof.ª Dr.ª Maria Marta Lodi
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84 030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa - Paraná
Bloco da Retora - anexo a PROPPSP
Fone: (042) 3220-3264

Anexo 3: Obtenção de Cromossomos Mitóticos (BERTOLLO et al., 1978)

1. Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução de colchicina 0,025%, na proporção de 1 mL/100g de peso.
2. Manter o peixe em aquário aerado durante 50 minutos.
3. Anestesiá-lo colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida.
4. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0.075M), dissociando as células com uma seringa desprovida de agulha.
5. Incubar em estufa a 37°C durante 30 minutos.
6. Re-suspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur, colocando-o em um tubo de centrifuga, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos.
7. Acrescentar algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, re-suspendendo o material repetidas vezes.
8. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm.
9. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Adicionar 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspender bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 900 rpm.
10. Repetir novamente o item 9.
11. Descartar o material sobrenadante e adicionar quantidade suficiente de fixador para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e re-suspender bem o material.
12. Acondicionar em frascos microtubos. Nesta etapa, o material poderá ser armazenado em freezer, para posterior utilização.
13. Pingar 1-2 gotas da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur, sobre uma lâmina bem limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorra e permita que o material fique aderido sobre a lâmina.
14. Deixar o material secar ao ar.
15. Corar com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

Anexo 4: Detecção da heterocromatina constitutiva (SUMNER, 1972)

1. Tratar as lâminas contendo o material celular em ácido clorídrico (HCl) 0,2M à 37°C, durante 10 minutos e lavar com água destilada.
2. Incubar a preparação em hidróxido de Bário (Ba(OH)_2) a 5%, recém preparada e filtrada, a 42°C, durante 1 a 2 minutos.
3. Submergir a lâmina em solução de ácido clorídrico 0,2M e lavar com água destilada.
4. Imergir a lâmina em solução salina 2xSSC, a 60°C, durante 40 minutos.
5. Lavar bem, com água destilada e secar ao ar.
6. Corar com solução de Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

Anexo 5: Hibridização *in situ* fluorescente (PINKEL; SATRAUME; GRAY, 1986)

1. Lavar as lâminas com tampão PBS 1x durante 3 minutos em temperatura ambiente no shaker.
2. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100% por 3 minutos. Deixar secar.
3. Colocar 100µL de RNase em cada lâmina e incubar a 37°C por 1 hora em câmara úmida.
4. Retirar a lamínula e lavar por 3 vezes em 2xSSC por 3 minutos cada no shaker.
5. Lavar em PBS 1x por 3 minutos no shaker.
6. Incubar as lâminas por 10 minutos em solução de pepsina a temperatura ambiente.
7. Lavar em PBS 1x por 3 minutos no shaker.
8. Fixar em formaldeído durante 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavar em PBS 1x por 3 minutos no shaker.
10. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100% por 3 minutos. Deixar secar.
11. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% a 70°C por 5 minutos.
12. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100% por 3 minutos. Deixar secar.
13. Montar cada lâmina com 50µL da solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar overnight a 37°C.
14. Lavar as lâminas com Triton 0,3% por 10 minutos no shaker.
15. Lavar as lâminas com Triton 0,1% por 10 minutos no shaker.
16. Lavar as lâminas com Triton 0,1% por 3 minutos no shaker.
17. Incubar as lâminas com tampão NFDm 5% por 15 minutos.
18. Lavar duas vezes com Triton 0,1% por 3 minutos.
19. Incubar as lâminas com 100µL do mix de anticorpos durante 1 hora em câmara úmida e escura a 37°C.
20. Lavar 3 vezes com Triton 0,1% por 3 minutos no shaker.
21. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100% por 3 minutos. Deixar secar.
22. Colocar 50µL da mistura de antifading + DAPI na lâmina e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

Anexo 6: Mini preparação plasmidial

1. Depois da cultura bacteriana ter crescido overnight, centrifugá-la em um microtubo por 1 minuto em velocidade máxima (descartar o meio de cultura e repetir este processo até que toda a cultura seja peletada).
2. Adicionar 400µL da Solução I (60µL de RNase, 300µL de Tris-HCl 1M, 60µL de EDTA 0,5 M e 2580µL de água) e vortexar bem.
3. Adicionar 400µL da Solução II (600µL de NaOH 1M, 300 µL de SDS 10% e 2100µL de água) e inverter o tubo até ficar viscoso.
4. Adicionar 400µL da solução III (1800µL de acetato de potássio 5M, 345µL de ácido acético e 855µL de água) e inverter o tubo.
5. Centrifugar por 5 minutos em velocidade máxima.
6. Transferir o sobrenadante para um tubo novo e centrifugar por 5 minutos em velocidade máxima.
7. Transferir o sobrenadante para um tubo que contenha 200µL de isopropanol 100% gelado e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar por 10 minutos em velocidade máxima e descartar o sobrenadante.
9. Adicionar 200µL de etanol 70% gelado, centrifugar por 5 minutos e descartar o sobrenadante.
10. Adicionar 200µL de etanol 100% gelado e centrifugar por 5 minutos e descartar o sobrenadante.
11. Deixar secar na estufa a 37°C.
12. Adicionar 20µL de água milli-Q e ressuspender.

Anexo 7: Marcação de sonda do gene 5S

5S

2,0µL de DNA (20 ng/µL)
27,8µL de água milli-Q
5,0µL de Tampão 10X
2,5µL de MgCl ₂
1,0µL de dATP
1,0µL de dCTP
1,0µL de dGTP
0,7µL de dTTP
0,6µL de dUTP (biotina)
4,0µL de primer 5SA
4,0µL de primer 5SB
0,4µL de Taq DNA polimerase

Condições para amplificação

	94°C	5 minutos
35 X {	94°C	1 minuto
	60°C	45 segundos
	72°C	1 minuto e 30 segundos
	72°C	5 minutos

Anexo 8: Marcação de sonda do gene 18S

18S

18S Inicial	18S Final
3,0µL de DNA (20 ng/µL)	3,0µL de DNA (20 ng/µL)
26,8µL de água milli-Q	26,8µL de água milli-Q
5,0µL de Tampão 10X	5,0µL de Tampão 10X
2,5µL de MgCl ₂	2,5µL de MgCl ₂
1,0µL de dATP	1,0µL de dATP
1,0µL de dCTP	1,0µL de dCTP
1,0µL de dGTP	1,0µL de dGTP
0,7µL de dTTP	0,7µL de dTTP
0,6µL de dUTP (digoxigenina)	0,6µL de dUTP (digoxigenina)
4,0µL de primer T7 Fw	4,0µL de primer 18S Fw
4,0µL de primer 18S Rv	4,0µL de primer SP6 Rv
0,4µL de Taq DNA polimerase	0,4µL de Taq DNA polimerase

Condições para amplificação

	94°C	5 minutos
35 X {	94°C	1 minuto
	56°C	45 segundos
	72°C	2 minutos e 20 segundos
	72°C	5 minutos

Anexo 9: Extração de DNA pelo método CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980)

1. Picotar o tecido com auxílio de pinça e tesoura e transferir para um microtubo com uma solução de 360µL de tampão sem CTAB, 13µL de proteinase K, 5µL de β-mercaptoetanol e 240µL de CTAB.
2. Colocar a 55°C por 10 horas ou até que o tecido esteja totalmente digerido.
3. Adicionar 600µL de clorofórmio.
4. Agitar durante 5 minutos e centrifugar a 4°C, 8.000 rpm por 5 minutos.
5. Retirar o sobrenadante e transferir para um novo tubo.
6. Adicionar 600µL de álcool absoluto e deixar a -20°C por 1 hora.
7. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos. Descartar o sobrenadante.
8. Lavar o pellet com 500µL de etanol 70% e centrifugar por 2 minutos a 14.000 rpm.
9. Descartar o sobrenadante e deixar secando na estufa a 37°C.
10. Depois de totalmente seco, adicionar 15µL de água destilada autoclavada e re-suspender.
11. Adicionar 5µL de RNase e deixar por 2 horas a 37°C. Após esse tempo, deixar a 65°C durante 15 minutos.
12. Armazenar a -20°C.

Anexo 10: Amplificação do gene COI

COI

5,0µL de DNA (20 ng/µL)
29,5µL de água milli-Q
5,0µL de Tampão 10X
2,5µL de MgCl ₂
0,7µL de dNTP (mix)
2,5µL de primer Fish F1
2,5µL de primer Fish R1
0,5µL de Taq DNA polimerase

Condições para amplificação

	94°C	2 minutos
35 X {	94°C	1 minuto
	52°C	40 segundos
	72°C	1 minuto
	72°C	10 minutos