

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA CONSERVAÇÃO E  
BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG-GCBEv**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Pseudoloricaria laeviuscula* (VALENCIENNES, 1840)  
(LORICARIIDAE, LORICARIINAE, SUBTRIBO LORICARIINA): UM GÊNERO  
MONOTÍPICO**

**ANA JÚLIA ALEGRIA SERRA**

**Manaus, Amazonas  
Março 2024**

**ANA JÚLIA ALEGRIA SERRA**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Pseudoloricaria laeviuscula* (VALENCIENNES, 1840)  
(LORICARIIDAE, LORICARIINAE, SUBTRIBO LORICARIINA): UM GÊNERO  
MONOTÍPICO**

**Orientador: Dr. José Antônio Alves Gomes  
Coorientadora: Dra. Eliana Feldberg**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

**Manaus, Amazonas  
Março 2024**

---

S487a Serra, Ana

Análise citogenética de *Pseudoloricaria laeviuscula* (Valenciennes, 1840) (Loricariidae, Loricariinae, subtribo Loricariina): Um gênero monotípico / Ana Júlia Alegria Serra; orientador José Antônio Alves Gomes; coorientadora Eliana Feldberg. - Manaus : [s.l.], 2024.

1,33 MB  
47p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2024.

1. Citogenética . 2. Caracterização cariotípica. 3. Rearranjos cromossômicos . I. Gomes, José Antônio Alves. II. Feldberg, Eliana. III. Título

CDD 576.5

---

**Sinopse:**

Neste estudo analisamos, por meio de marcadores citogenéticos clássicos e moleculares, a espécie *Pseudoloricaria laeviuscula*, gênero considerado monotípico. Os exemplares foram coletados em sua maioria no rio Cuieiras e uma pequena parte no Parque Nacional de Anavilhanas, Amazonas, Brasil. O objetivo deste estudo foi a caracterização citogenética da espécie, a qual, até então, contava apenas com dados morfológicos, inferindo sobre os possíveis mecanismos de evolução cromossômica da espécie. Os resultados revelaram características cariotípicas consideradas conservadas dentro da família Loricariidae, ou seja,  $2n=54$ , RON simples, intersticial e o padrão da heterocromatina com pequenos e poucos blocos heterocromáticos. Entretanto para o mapeamento dos DNAs ribossomais 18S e 5S a espécie não apresentou sintenia o que para a família é um caráter derivado. Os dados citogenéticos indicam que os principais mecanismos evolutivos ocorreram por meio de rearranjos não-Robertsonianos, como a inversão pericêntrica, padrão já observado em espécies do grupo *Loricariichthys*, do qual *P. laeviuscula* faz parte dentro de Loricariinae. A ampliação dos pontos de coleta é necessária para averiguar a real monotipia do gênero e elucidar incertezas taxonômicas.

**Palavras-chave:** Caracterização cariotípica, Incertezas taxonômicas, Rearranjos cromossômicos.

## ATA DE DEFESA PÚBLICA DO MESTRADO

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

No dia 06 de fevereiro de 2024, às 08h30 (Horário Manaus), reuniu-se a Banca Julgadora da **DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO**, composta pelos seguintes Doutores, membros titulares: Josiane Baccarin Traldi; Lúcia Helena Rapp Py Daniel e Lúcia Giuliano Caetano, tendo como membros suplentes: Milena Ferreira dos Santos e Waldir Heinrichs Caldas, afim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO** da discente **ANA JÚLIA ALEGRIA SERRA**, intitulada: **“Análise citogenética de *Pseudoloricaria laeviuscula* (Valenciennes, 1840) (Loricariidae, Loricariinae, subtribo Loricariina): um gênero monotípico”**. O estudo foi conduzido sob orientação do Prof. Dr. José Antônio Alves Gomes e coorientação da Dra. Eliana Feldberg, ambos do INPA.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

- Aprovado por unanimidade  Reprovado  
 Aprovado por maioria

#### Menção (se mérito)

- Aprovado com “Distinção” (por maioria)  
 Aprovado com “Distinção e Louvor” (por unanimidade)

A ATA Foi lavrada e assinada pelos Professores Doutores, membros presentes da Banca Julgadora.

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURAS
Josiane Baccarin Traldi - UFAM	 Documento assinado digitalmente JOSIANE BACCARIN TRALDI Data: 06/02/2024 12:37:12-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>
Lúcia Helena Rapp Py-Daniel - INPA	 Documento assinado digitalmente LUCIA HELENA RAPP PY DANIEL Data: 08/02/2024 10:41:37-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>
Lúcia Giuliano Caetano - UEL	 Documento assinado digitalmente LUCIA GIULIANO CAETANO Data: 06/02/2024 17:32:07-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>
Milena Ferreira dos Santos - SEDUC	
Waldir Heinrichs Caldas - INPA	



**ELIANA FELDBERG, Dra.**

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética,  
Conservação e Biologia Evolutiva - PPG GCBEV.  
PO. Nº 162 - 23.08.2021 - INPA/MCTI**

Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEV Art. 62 “Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que cumpridas às exigências das Agências de Fomento, dos regulamentos do PPG-INPA e do PPG GCBEV. Para obtenção do título, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 52 ao 55 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 61 e 64 do Regulamento PPG GCBEV.

*“Para Ele sempre e para elas:  
Zilda Colares que não me deixou perder a razão e  
Eliana Feldberg que me guiou até o final.”*

### **A realização deste estudo foi possível devido:**

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), ao Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (DIGEN), ao Laboratório de Genética Animal (LGA) e ao Laboratório de Fisiologia Comportamental e Evolução (LFCE).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste estudo.

O presente trabalho teve o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – Programa Institucional de Apoio à Pós-Graduação Stricto Sensu (FAPEAM- POSGRAD).

Ao projeto INCT/CNPq/FAPEAM (fase II) - Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA II (INCT/CNPq/FAPEAM 573976/2008-2).

À Taxa da bolsa de produtividade de Eliana Feldberg, CNPq - Processo Nº 302421/2014-9. “Citogenética clássica e molecular em peixes da bacia amazônica frente a diferentes desafios ambientais”.

## **Agradecimentos**

Expresso minha profunda gratidão a Deus pela dádiva da vida e por iluminar meu caminho. Durante esta jornada, Sua orientação e luz têm sido minha fonte de inspiração e força. A Ele devo não apenas a luz do sol que iluminou o meu percurso, mas também a presença constante de minha amada família e das pessoas que estiveram ao meu lado, apoiando-me em cada passo desta jornada.

Minha sincera gratidão ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), ao Programa de Pós-Graduação em Genética Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEv) e a todas as partes envolvidas. Meus agradecimentos estendem-se ao Conselho, corpo docente e secretaria do GCBEv, cujo apoio e orientação foram inestimáveis. Também gostaria de reconhecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por seu generoso apoio financeiro e recursos que tornaram este trabalho possível.

Não posso deixar de expressar minha gratidão aos meus orientadores, o Dr. José Antônio Alves Gomes e a Dra. Eliana Feldberg, cuja generosidade e apoio foram fundamentais para minha jornada acadêmica. Eles me receberam de braços abertos, sem julgar os eventos do meu passado, e estiveram ao meu lado durante todo o percurso. Meus orientadores não apenas esclareceram minhas dúvidas, mas também defenderam meu trabalho e me apoiaram incondicionalmente. Eles foram verdadeiros mentores, orientadores e, de certa forma, meus 'pais científicos'. Sou profundamente grata pela oportunidade de caminhar ao lado deles nesta jornada acadêmica. Ao Dr. José Gomes, agradeço por sua confiança em mim durante a realização deste trabalho. Ele não apenas foi um orientador excepcional, mas também um professor incrível, sempre disponível para auxiliar em todas as horas. Sou particularmente grata por ele ter me apresentado um pouco mais do maravilhoso e cativante mundo dos peixes-elétricos. Um agradecimento especial à Dra. Eliana Feldberg, que desempenhou o papel de Virgílio em minha jornada acadêmica. Ela segurou minha mão, não desistiu de mim e me guiou com destemor através dos meus caminhos desconhecidos. Sua presença foi fundamental para que eu prosseguisse nesta jornada, e só posso agradecer a Deus pela oportunidade de compartilharmos juntas parte desta história. Na verdade, durante meu mestrado, tive a honra de ser orientada pelos melhores professores do mundo e por isso só tenho a agradecer.

Minha eterna gratidão à minha querida e amada mãe, Zilda Colares, por ser minha constante companheira e por nunca permitir que eu me perdesse em minha própria mente. Seu apoio incansável às minhas decisões e sua compreensão quando precisei ajustar as velas do barco diversas vezes foram fundamentais. Eu só consegui fazer esses ajustes porque tinha a certeza de que ela estava ao meu lado. Também agradeço a minha tia SÉrgia Colares por sua presença em cada etapa da minha vida e em especial na minha educação, ao meu irmão João Pedro Colares pelo apoio inabalável e ao querido Ricardo César, que compartilhou parte desta jornada comigo, oferecendo seu valioso apoio.

Gostaria de estender meus agradecimentos ao Laboratório de Fisiologia Comportamental e Evolução (LFCE) e ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), que dedicaram seu tempo e conhecimento para o meu desenvolvimento. Acima de tudo, expresso minha imensa gratidão ao Laboratório de Genética Animal (LGA), onde passei a maior parte do tempo e tive a oportunidade de crescer ainda mais como profissional bióloga. Um profundo agradecimento a todos os membros da equipe, com destaque para Alan Gomes, Juliana Moraes, Leandro Marajó, Sandro Tonello, Dr. Patrik Viana e, principalmente, a Dra. Simone Soares, que se destacou como uma mentora amorosa e dedicada, compartilhando seu tempo e paciência para me ensinar as técnicas laboratoriais necessárias, uma excelente professora e principalmente uma grande amiga. Agradeço também ao senhor Arlindo por sua gentileza e disposição constante para ajudar, assim como a todos os outros membros da equipe que estiveram sempre prontos a auxiliar, desde pequenas dúvidas até discussões acadêmicas relevantes que contribuíram para a construção deste trabalho. Minha eterna gratidão, todos foram meus professores.

Minha sincera gratidão a Dona Helita Cardoso, que se mostrou uma pessoa muito prestativa e de confiança na pós-graduação, sempre pronta para auxiliar os alunos da melhor maneira possível. Também estendo meus agradecimentos aos doutores: Isac de Jesus, Josiane Traldi e Marcelo Salles, pelas valiosas contribuições e correções no projeto durante a qualificação. Agradeço à Dra. Lúcia Rapp Py-Daniel pela identificação dos peixes utilizados neste estudo e à Dra. Milena Ferreira por sua ajuda esclarecedora em questões relacionadas à obtenção cromossômica. Além disso, sou grata ao Dr. Fábio Takagui pelas valiosas contribuições que enriqueceram grandemente este projeto e ao Isaac Cabral pela elaboração do mapa utilizado nesse estudo e principalmente por sua amizade. Agradeço também aos pareceristas do projeto que avaliaram e contribuíram imensamente para esta pesquisa. Por fim, expresso minha gratidão à comunidade científica brasileira e aos seus pesquisadores



inspiradores, bem como a todos que colaboraram direta ou indiretamente na construção desta dissertação. Muito obrigada a todos!

“Não chore  
Quem cuida de você não dorme.  
Levanta  
Tem muita gente que te ama.  
Deus mandou te dizer, que vai acontecer  
Deus mandou te falar, que tudo vai passar”  
Filipe Escandurras

## Resumo

*Pseudoloricaria* é um gênero considerado monotípico, que passou por algumas realocações taxonômicas ao longo de sua descoberta, sendo que os estudos existentes são escassos, predominantemente baseados em critérios morfológicos. O presente estudo investigou a espécie *Pseudoloricaria laevisucula* coletada no Rio Cuieiras e no Parque Nacional de Anavilhanas, rio Negro, ambas as localidades no Amazonas, Brasil, utilizando procedimentos citogenéticos convencionais e moleculares. A espécie apresentou um número diploide de 54 cromossomos, com um cariótipo composto por 14 metacêntricos, 10 submetacêntricos, 4 subtelocêntricos e 26 acrocêntricos (14m + 10sm + 4st + 26a), e um Número Fundamental (NF) igual a 82. As Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) estão em um par cromossômico subtelocêntrico, intersticial, enquanto os blocos heterocromáticos foram escassos e predominantemente pericentroméricos. As marcações do DNAr 18S confirmaram a Ag-RON, o DNAr 5S exibiu marcação pericentromérica em um único par cromossômico acrocêntrico e as sondas teloméricas marcaram apenas as extremidades cromossômicas. *P. laevisucula* revelou características consideradas plesiomórficas dentro da família Loricariidae, em relação ao número diploide, às RONs e à heterocromatina constitutiva. Entretanto para o mapeamento dos DNAs ribossomais 18S e 5S a espécie não apresentou sintenia o que para a família é um caráter derivado. Os dados citogenéticos indicaram a ocorrência de rearranjos não-Robertsonianos como inversões, um padrão previamente observado em espécies do grupo *Loricariichthys*, do qual *P. laevisucula* faz parte dentro de Loricariinae. Este estudo ampliou o conhecimento sobre o gênero, contribuindo com dados citogenéticos para a única espécie descrita até o momento e sugere a realização de mais investigações, buscando outras populações em diferentes bacias, para elucidar a verdadeira monotipia do gênero e dissipar incertezas taxonômicas no grupo.

**Palavras-chave:** Caracterização cariotípica, Incertezas taxonômicas, Rearranjos cromossômicos.

## Abstract

*Pseudoloricaria* is a genus considered monotypic, which underwent some taxonomic reallocations throughout its discovery, and existing studies are scarce, predominantly based on morphological criteria. The present study investigated the species *Pseudoloricaria laevisucula* collected in the Cuieiras River and Anavilhanas National Park, Rio Negro, both locations in Amazonas, Brazil, using conventional and molecular cytogenetic procedures. The species had a diploid number of 54 chromosomes, with a karyotype composed of 14 metacentric, 10 submetacentric, 4 subtelocentric and 26 acrocentric (14m + 10sm + 4st + 26a), and a Fundamental Number (NF) equal to 82. The Organizing Regions of Nuclei (NORs) are in a subtelocentric, interstitial chromosome pair, while heterochromatic blocks were scarce and predominantly pericentromeric. The 18S rDNA markings confirmed Ag-RON, the 5S rDNA showed pericentromeric marking in a single acrocentric chromosomal pair and the telomeric probes marked only the chromosomal ends. *P. laevisucula* revealed characteristics considered plesiomorphic within the Loricariidae family, in relation to diploid number, NORs and constitutive heterochromatin. However, for the mapping of 18S and 5S ribosomal DNAs, the species did not show synteny, which for the family is a derived character. The cytogenetic data indicated the occurrence of non-Robertsonian rearrangements such as inversions, a pattern previously observed in species of the *Loricariichthys* group, of which *P. laevisucula* is part within the Loricariinae. This study expanded knowledge about the genus, contributing with cytogenetic data for the only species described to date and suggests further investigations, looking for other situations in different basins, to elucidate the true monotypy of the genus and dispel taxonomic uncertainties in the group.

**Key words:** Karyotypic characterization, Taxonomic uncertainties, Chromosomal rearrangements.

## Sumário

Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Figuras.....	xv
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos gerais de Loricariinae com ênfase no gênero <i>Pseudoloricaria</i> Bleeker 1862.....	2
1.2 Citogenética de Loricariinae com ênfase em Loricariina .....	8
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>18</b>
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
<b>3. Material e Métodos .....</b>	<b>19</b>
3.1 Material .....	19
3.2 Métodos .....	21
3.2.1 Indução de mitoses .....	21
3.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos.....	21
3.3. Coloração convencional (Giemsa).....	22
3.4 Detecção das regiões de heterocromatina.....	22
3.5 Regiões Organizadoras de Nucléolos (Ag-RON) .....	22
3.6 Extração de DNA total .....	23
3.7 Preparação das sondas de DNA ribossômico (DNAr) 18S e 5S e da sonda telomérica ....	23
3.8 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente – FISH .....	24
3.9 Processamento das imagens.....	25
<b>4. Resultados .....</b>	<b>27</b>
<b>5. Discussão .....</b>	<b>29</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>37</b>

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Gêneros da subtribo Loricariina.....	4
Tabela 2. Citogenética de Loricariinae.....	10

## Lista de Figuras

Figura 1. <i>Pseudoloricaria laeviuscula</i> , holótipo em vista dorsal, ventral e lateral.....	6
Figura 2. Espécimes de <i>Pseudoloricaria</i> : a) <i>Pseudoloricaria</i> sp. n. “madeira” com 244,0 mm e b) <i>Pseudoloricaria</i> sp. n. “mucajá” com 179,1 mm.....	7
Figura 3. Espécime de <i>Pseudoloricaria laeviuscula</i> em vista dorsal, ventral (aberta devido os procedimentos citogenéticos) e lateral. Indivíduo fêmea com 210 mm, coloração em álcool....	20
Figura 4. Ponto de coleta dos indivíduos. Em vermelho os 19 indivíduos do Rio Cuieiras e em amarelo o indivíduo do Parque Nacional de Anavilhanas, AM, Brasil.....	20
Figura 5. Cariótipo de <i>Pseudoloricaria laeviuscula</i> : (a e b) Coloração convencional com Giemsa; (c e d) Bandeamento C de fêmea e macho; em destaque Ag-RON no par 13. (e) Mapeamento cromossômico por Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) do DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde); (f) Sequência telomérica (vermelho). Barra igual a 20 µm...	28
Figura 6. Classificação da subfamília Loricariinae proposta por Covain <i>et al.</i> 2016 em destaque o grupo <i>Loricariichthys</i> e os respectivos números diploides encontrados. Fonte: Adaptado de Roxo <i>et al.</i> 2019.....	30

## 1. Introdução

A região neotropical compreende um vasto território que se estende desde a parte central/sul do México englobando toda a América Central, juntamente com o continente sul-americano e Antilhas (Morrone *et al.* 2018). As águas doces desta região incluem cerca de 20%–25% de toda a diversidade de peixes do globo (Malabarba e Malabarba 2020). O centro de dispersão da fauna de peixes neotropicais dulcícolas são as bacias hidrográficas do norte da América do Sul, uma região conhecida como Grande Amazônia, composta pelas bacias do Amazonas, Orinoco e Guianas (Sleen e Albert 2017; Albert *et al.* 2020). Os peixes de água doce da região neotropical são membros de cinco grandes ordens, sendo elas: Siluriformes, Characiformes, Cyprinodontiformes, Cichliformes e Gymnotiformes. Essas ordens taxonômicas representam 87% de todas as espécies da região neotropical e mais de 90% das espécies de peixes da Grande Amazônia (Albert *et al.* 2020; Malabarba e Malabarba 2020).

Dentre essas ordens, Siluriformes abrange 37,1% da composição da ictiofauna neotropical, abrigando 871 gêneros e 7.394 espécies válidas, com apenas duas famílias marinhas (Ariidae e Plotosidae); possuem representantes em todos os continentes, exceto na Antártica (Albert *et al.* 2020; Malabarba e Malabarba 2020; Fricke *et al.* 2024). É um grupo reconhecidamente monofilético e intensamente estudado, porém, ainda existem questionamentos a serem elucidados quanto à classificação real do grupo (Montoya-Burgos *et al.* 1998; Lujan *et al.* 2015; Covain *et al.* 2016; Roxo *et al.* 2019; Malabarba e Malabarba 2020; Londoño-Burbano e Reis 2021).

Em aspectos biogeográficos, a Amazônia, com toda a sua diversidade de espécies biológicas, é considerada um museu e um berço de biodiversidade. Um museu é um local onde as espécies se acumulam por dispersão e resistem à extinção; um berço é onde as espécies nascem por meio do processo de especiação. Esse conceito dual de museu/berço para a biodiversidade da Amazônia prevê com sucesso a riqueza de espécies, excepcionalmente alta, na região Amazônica-Orinoco-Guiana (Sleen e Albert 2017; Albert *et al.* 2020). Apesar da grande diversidade na Amazônia, o conhecimento da ictiofauna e sua distribuição ainda não estão sintetizados em um cenário geral, pois a maioria dos dados estão espalhados em diferentes estudos, e as tentativas de unificação das informações sobre os peixes amazônicos estão limitadas pela natureza incompleta dos bancos de dados. É possível verificar essa problemática com os Siluriformes que são amplamente estudados na taxonomia, morfologia, citogenética, análises moleculares, dentre outras áreas (Lujan *et al.* 2020; Silva *et al.* 2021; Takagui *et al.*



2022; Angulo-Olmos *et al.* 2023; Burghausen *et al.* 2023; Dopazo *et al.* 2023; Mejia *et al.* 2023; Nirchio *et al.* 2023). Entretanto essas informações não estão agrupadas em um único cenário geral. Assim, percebe-se que a compreensão sobre as espécies existentes e a evolução dos diversos grupos de peixes da fauna amazônica ainda é limitada por diferentes obstáculos (Vari e Malabarba 1998; Dagosta e Pinna 2019).

### **1.1 Aspectos gerais de Loricariinae com ênfase no gênero *Pseudoloricaria* Bleeker 1862**

Dentre as famílias existentes na ordem Siluriformes, Loricariidae é a família que apresenta mais espécies descritas até este momento, com 1056 espécies válidas (Fricke *et al.* 2024), um número que tende a crescer, visto que novas espécies estão sendo descritas continuamente (Reis e Lehmann 2022; Oliveira *et al.* 2021; Dias e Zawadzki 2021; Caldas *et al.* 2022). Os loricariídeos são facilmente reconhecidos e diferenciados de outros grupos de peixes por uma combinação de características próprias, tais como: armadura dérmica ossificada, que cobre o corpo; dentes externos chamados odontódeos, boca ventral (com ou sem barbilhões visíveis) em forma de ventosa, circundada por lábios expandidos, boca usada para aderir a substratos sólidos e peneirar substratos para forrageamento, intestino relativamente longo e a presença de 23-38 vértebras (Py-Daniel 1997; Nelson *et al.* 2016; Roxo *et al.* 2019). Atualmente, esse grupo apresenta seis subfamílias (Lithogeninae, Delturinae, Rhinelepininae, Loricariinae, Hypoptopomatinae e Hypostominae) (Fricke *et al.* 2024) as quais estão distribuídas na região neotropical, adaptadas a diferentes habitats, desde planícies aluviais até os afluentes e corredeiras de fluxo mais rápido dos escudos das Guianas e do Brasil (Py-Daniel 1997; Artoni e Bertollo 2001; Nelson *et al.* 2016).

Conhecidos como acaris-cachimbo e cascudos-chinelo, os membros da subfamília Loricariinae estão extensamente distribuídos pelos rios da América do Sul, desde as drenagens do rio da Prata, e ao sul, aos rios costeiros do Caribe, ao norte (Ferraris Jr. 2003; Rapp Py-Daniel e Ohara 2013). Os loricariíneos são facilmente distinguidos dos demais Loricariidae por compartilharem um pedúnculo caudal muito deprimido e alongado, ausência de nadadeira adiposa e, frequentemente, focinho deprimido. Esses peixes apresentam uma variação na forma do corpo, morfologia dos lábios e dentição (Covain e Fisch-Muller 2007; Rapp Py-Daniel e Ohara 2013). Alguns grupos possuem dentes numerosos, pedunculados e organizados em forma de pente, enquanto outros apresentam poucos dentes, que podem ser bicúspides retos e grossos, em forma de colher, reduzidos de tamanho ou longos (Isbrücker 1979; Covain e Fisch-Muller 2007; Covain *et al.* 2016). Os lábios podem ser fortemente papilosos, filamentosos ou lisos

(Covain *et al.* 2016). Loricariinae apresenta hábito alimentar detritívoro ou peritívoro, incluindo algas, restos de vegetação e invertebrados aquáticos (Ferraris Jr. 2003; Covain e Fisch-Muller 2007; Rapp Py-Daniel e Ohara 2013).

Apresentam dimorfismo sexual, que se expressa através da hipertrofia de odontódeos nos raios da nadadeira peitoral, na margem do focinho e, às vezes, na região pré-dorsal de machos maduros (Covain e Fisch-Muller 2007; Covain e Sleen 2017). Machos, geralmente são maiores que as fêmeas, mas para várias espécies as fêmeas podem ser maiores que os machos, por exemplo, *Reganella depressa* (Kner, 1853) e *Spatuloricaria taira* Fichberg, Oyakawa & de Pinna, 2014 (Rapp Py-Daniel e Cox-Fernandes 2005; Fichberg *et al.* 2014; Covain e Sleen 2017). Algumas espécies apresentam diferenças sexuais nas estruturas labiais e dentárias, por exemplo, *Hemiodontichthys acipenserinus* (Kner, 1853) e *Pseudoloricaria laeviuscula* (Valenciennes, 1840) (Isbrücker e Nijssen 1974; 1976; Isbrücker 1979; Covain e Sleen 2017).

A sistemática de Loricariinae vem sendo discutida por diversos autores nas últimas décadas. Isbrücker (1979) investigou os loricariíneos apenas por caracteres morfológicos sem inferências filogenéticas e organizou a subfamília em quatro tribos e oito subtribos: 1) Acestridiini, 2) Farlowellini, 3) Harttiini com as subtribos Harttiina e Metaloricarina e 4) Loricariini com as subtribos Loricariina, Planiloricariina, Reganellina, Rineloricariina, Loricariichthyina e Hemiodontichthyina. Posteriormente, Rapp Py-Daniel (1997), analisando caracteres morfológicos com análises filogenéticas, confirmou a monofilia de Loricariinae e dividiu os loricariíneos em duas tribos e quatro subtribos: 1) Loricariini com Hemiodontichthyina e Planiloricariina 2) Harttiini com Harttiina e Farlowellina. No ano seguinte, Montoya-Burgos *et al.* (1998) propuseram a primeira filogenia molecular da família Loricariidae, usando genes mitocondriais, embora suas análises incluíssem apenas nove representantes dos Loricariinae, os autores confirmaram parcialmente sua subdivisão em dois grupos principais, mas com *Harttia* (gênero nominal de Harttiini) formando o gênero irmão de todos os outros Loricariinae (compreendendo Farlowellini, parte de Harttiini e Loricariini) (Montoya-Burgos *et al.* 1998; Covain *et al.* 2016). Dez anos após os estudos de Rapp Py-Daniel, Covain e Fisch-Muller (2007), em investigações baseadas em dados moleculares, confirmaram a divisão em duas linhagens: 1) Harttini e 2) Loricariini, sendo a segunda dividida em duas subtribos Loricariina e Farlowellina (Covain *et al.* 2016; Roxo *et al.* 2019). Dada a extensa e confusa história da organização sistemática de Loricariinae tanto por resultados morfológicos como por moleculares, a validade de vários gêneros é ainda questionada, tornando a taxonomia do grupo

complexa de entendimento (Ferraris Jr. 2003; Covain *et al.* 2016; Londono-Burbano e Reis 2021).

Atualmente essa subfamília apresenta 30 gêneros válidos com 271 espécies, sendo a segunda subfamília, dentro dos Loricariídeos, com mais espécies descritas, perdendo a primeira colocação para Hypostominae que abriga 500 espécies válidas (Fricke *et al.* 2024). Dentro dos loricariíneos, a subtribo Loricariina (Tabela 1) compreende algumas formas particulares e, por conta disso, apresenta três grupos morfológicos, diagnosticados principalmente com base na dentição e estrutura dos lábios, são eles: *Loricaria-Pseudohemiodon*, *Loricariichthys* e *Rineloricaria* (Covain e Fisch- Muller 2007; Covain *et al.* 2016).

O grupo *Loricariichthys* (que abrange *Loricariichthys*, *Furcodontichthys*, *Hemiodontichthys*, *Limatulichthys* e *Pseudoloricaria*) compreende principalmente gêneros monotípicos ou pouco diversificados, sendo que os membros desse grupo compartilham lábios bilobados (lisos ou ligeiramente papilosos), dentes bicúspides frequentemente reduzidos de tamanho e os machos exibem os lábios hipertrofiados, indicando que são carregadores de ovos. Adicionalmente, esses peixes vivem na areia, parcialmente enterrados no substrato, aproveitando uma coloração críptica, que lhes proporciona uma eficaz proteção (Covain e Fisch- Muller 2007; Covain *et al.* 2016). Entretanto, visto que a sistemática do grupo ainda é extensamente investigada, indagações sobre gêneros monotípicos ou pouco diversificados devem ser reavaliadas para estimar a real diversidade dentro desse grupo.

Tabela 1. Gêneros da subtribo Loricariina.

Gêneros de Loricariina	
<i>Brochiloricaria</i> Isbrücker & Nijssen 1979	<i>Paraloricaria</i> Isbrücker 1979
<i>Crossoloricaria</i> Isbrücker 1979	<i>Planiloricaria</i> Isbrücker 1971
<i>Dasylicaria</i> Isbrücker & Nijssen 1979	<i>Proloricaria</i> Isbrücker 2001
<i>Dentectus</i> Martín Salazar, Isbrücker & Nijssen 1982	<i>Pseudohemiodon</i> Bleeker 1862
<i>Fonchiiloricaria</i> Rodriguez, Ortega & Covain 2011	<b><i>Pseudoloricaria</i> Bleeker 1862</b>
<i>Furcodontichthys</i> Rapp Py-Daniel 1981	<i>Pyxiloricaria</i> Isbrücker & Nijssen 1984
<i>Hemiodontichthys</i> Bleeker 1862	<i>Reganella</i> Eigenmann 1905
<i>Limatulichthys</i> Isbrücker & Nijssen 1979	<i>Rhadinoloricaria</i> Isbrücker & Nijssen 1974
<i>Loricaria</i> Linnaeus 1758	<i>Ricola</i> Isbrücker & Nijssen 1978
<i>Loricariichthys</i> Bleeker 1862	<i>Rineloricaria</i> Bleeker 1862
<i>Metaloricaria</i> Isbrücker 1975	<i>Spatuloricaria</i> Schultz 1944

Fonte: Covain *et al.* 2016; Roxo *et al.* 2019.

O grupo *Loricariichthys* compreende gêneros pouco diversificados e como parte dele o gênero monotípico *Pseudoloricaria* foi originalmente classificado como *Loricaria* com a espécie *Loricaria laeviscula* Valenciennes, 1840. *Pseudoloricaria* foi estabelecido por Bleeker em 1862 que distinguiu esse gênero de *Loricaria* pelos caracteres: estrutura labial, tamanho da dentição, desenvolvimento dos dentículos dérmicos, posição das nadadeiras dorsal e pélvicas. Esse gênero ficou em discussão, em relação à classificação de gênero e subgênero, por vários anos. Um aspecto relevante dessa incerteza na classificação reside na descrição original do gênero, que foi feita com base em apenas um exemplar de 27 cm, sem informações de coleta ou localidade específica, apenas sabendo-se que era da América do Sul. (Isbrücker e Nijssen 1976; Ohara 2010).

Isbrücker e Nijssen (1976) em uma revisão do gênero consideraram duas espécies: *Pseudoloricaria laeviscula* (Valenciennes, 1840) e *Pseudoloricaria punctata* (Regan, 1904). De acordo com os autores *P. laeviscula* diferia de *P. punctata* pelo maior número de placas laterais, placas até a coalescência e placas margeando a placa pré-anal. Os autores também restringiram a localidade-tipo de *P. laeviscula* para a foz do rio Tapajós em Santarém, Pará e ampliaram a distribuição para o médio e baixo rio Amazonas. Atualmente o gênero é considerado monotípico, incluindo apenas *P. laeviscula*, pois *P. punctata* foi realocado para o gênero *Limatulichthys*. Entretanto, os gêneros *Pseudoloricaria* e *Limatulichthys* são considerados muito semelhantes, suas relações filogenéticas ainda são incertas e são difíceis de serem diagnosticados, o que tem ocasionado erros de identificação. Parte dos caracteres diagnósticos, de ambos os gêneros, ainda são da revisão de Isbrücker e Nijssen (1976), que consideraram a disposição e contagem das placas corporais, evidenciado assim a necessidade de estudos adicionais em ambos os gêneros (Isbrücker 1979; 1981; Covain e Fisch-Muller 2007; Ohara 2010; Covain *et al.* 2016).

*Pseudoloricaria laeviscula* (Figura 1) é caracterizada por um focinho com uma área horizontal nua estreita, lábio inferior bilobado com sulco mediano (podendo ser liso ou levemente papiloso), dentes retos, bicúspides (não numerosos), machos têm dentes com pontas arredondadas e fêmeas com pontas mais pontiagudas, abdome coberto por pequenas placas, sem organização particular, último raio da nadadeira pélvica mais curto que o espinho da nadadeira pélvica em adultos, juvenis com mancha basicaudal conspícua, dimorfismo sexual refere-se ao desenvolvimento hipertrofiado do lábio inferior nos machos, sugerindo que são carregadores de ovos (Isbrücker e Nijssen 1976; Rapp Py-Daniel e Cox-Fernandes 2005;

Covain e Fisch-Muller 2007; Ohara 2010; Sleen e Covain 2017). Essa espécie costuma ser encontrada em fundos arenosos, em praias rasas ao longo dos rios e em lagoas temporárias adjacentes (Isbrücker e Nijssen 1976; Covain e Fisch-Muller 2007; Covain e Sleen 2017).

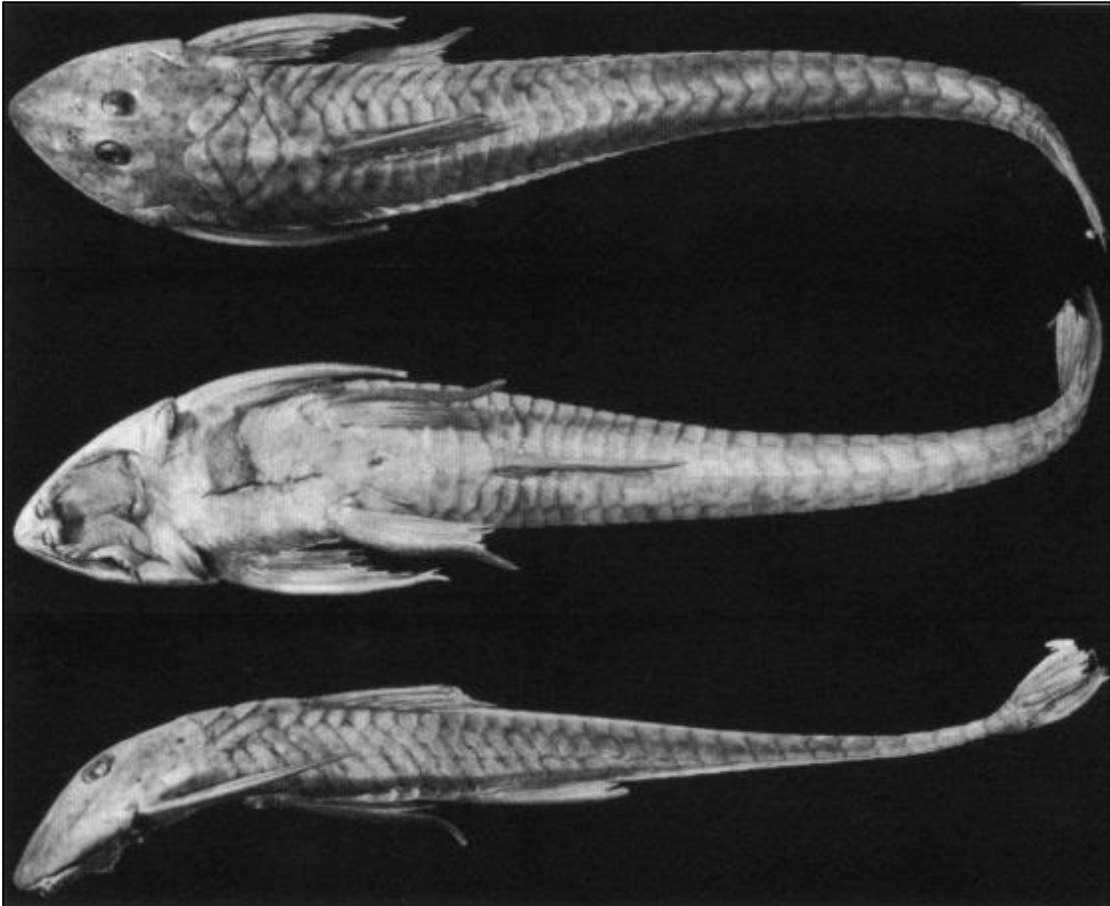


Figura 1. *Pseudoloricaria laeviuscula*, holótipo em vista dorsal, ventral e lateral. Fonte: Isbrücker e Nijssen 1976.

A classificação e monotipia de *Pseudoloricaria* foi questionada ao longo dos últimos anos e mais recentemente, Ohara (2010) em sua revisão taxonômica dos gêneros *Pseudoloricaria* e *Limatulichthys* reconheceu, a partir de amostragens de diferentes localidades da bacia Amazônica, duas novas espécies dentro do gênero: *Pseudoloricaria* sp. n. “mucajaí” (para o rio Mucajaí e Tacutu) e *Pseudoloricaria* sp. n. “madeira” (para a drenagem do médio rio Madeira) (Figura 2). Em sua revisão o autor fornece um diagnóstico das três espécies, faz comparações quanto à morfologia e ainda propõe uma chave de identificação para as espécies. Esse estudo foi realizado somente por caracteres morfológicos e o próprio autor enfatizou a demanda de investigações mais minuciosas para o gênero, porém este estudo relata os indícios mais recentes de que a diversidade do gênero *Pseudoloricaria* pode estar subestimada.



Figura 2. Espécimes de *Pseudoloricaria*: a) *Pseudoloricaria* sp. n. “madeira” com 244,0 mm e b) *Pseudoloricaria* sp. n. “mucajai” com 179,1 mm. Fonte: Adaptado de Ohara 2010.

Outra indagação é referente à diversidade do gênero estar subestimada ou não se refere à real distribuição da sua única espécie *P. laeviuscula*, visto que parte dos dados apresentam pontos de distribuição somente na bacia amazônica (Isbrücker e Nijssen 1976; Ohara 2010; ICMBio 2022), enquanto outros destacam a ocorrência da espécie também na bacia Tocantins-Araguaia (Covain e Sleen 2017; SiBBR 2024), demonstrando assim a falta de estudos com esse gênero e refletindo, portanto, dúvidas sobre a sua diversidade e distribuição.

Diante das diversas alterações na classificação taxonômica de *Pseudoloricaria*, os primeiros indícios de possíveis novas espécies dentro do grupo (Ohara 2010) e as divergências quanto aos dados distribuição (Covain e Sleen 2017; ICMBio 2022; SiBBR 2024), está claro que a identificação do gênero somente por caracteres morfológicos não é suficiente para demonstrar a real diversidade e distribuição desse grupo. Considerando que o processo de especiação nem sempre segue as mudanças morfológicas das espécies, é importante que dados moleculares e genéticos sejam incorporados às descobertas e descrições de novas espécies, pois abordagens morfológicas e moleculares combinadas possuem o potencial de resultar em um estudo mais completo para a maioria das pesquisas em biodiversidade (Bickford *et al.* 2006; Karanovick *et al.* 2016). Isto porque, as delimitações de espécies, que dependem exclusivamente de caracteres morfológicos, não são capazes de capturar a diversidade real de espécies existentes no planeta (Cerca *et al.* 2021). O gênero monotípico *Pseudoloricaria* possui apenas dois estudos exclusivos que abordam aspectos morfológicos, o que evidencia a necessidade premente de pesquisas mais detalhadas. Tais estudos podem ser cruciais para auxiliar na elucidação de dúvidas sobre a taxonomia, diversidade e distribuição real do gênero.

A delimitação operacional de espécies continua sendo um desafio, visto que a complexidade da biologia dos organismos exige que os limites das espécies sejam estudados a partir de perspectivas diferentes e complementares. Deste modo, com uma abordagem multidisciplinar, a taxonomia integrativa conta com a colaboração de diversas áreas e deve se tornar uma prática padrão nos estudos da diversidade biológica (Dayrat 2005; Schutze *et al.* 2017). Estudos detalhados, integrando diferentes abordagens, já demonstraram que táxons, considerados originalmente monotípicos, estavam a princípio ofuscados dentro de caracteres morfológicos indistinguíveis para espécies diferentes, evidenciando assim a necessidade de múltiplas perspectivas para descrições de novas espécies (Carvalho *et al.* 2018; Souza *et al.* 2018; Carneiro *et al.* 2020; Paula *et al.* 2022; Sun *et al.* 2023).

Dentre as diferentes ferramentas que auxiliam o estudo da biodiversidade ictífica, a Citogenética tem sido de suma importância para o esclarecimento de características individuais, inter e intrapopulacionais de vários grupos de peixes, representando uma fonte de informação que auxilia em resoluções de questões taxonômicas e evolutivas, mostrando-se assim uma ferramenta útil para auxiliar a desvendar a biodiversidade do planeta (Rab *et al.* 2007; Cardoso *et al.* 2011; Cioffi *et al.* 2018; Venturelli *et al.* 2021).

## 1.2 Citogenética de Loricariinae com ênfase em Loricariina

A citogenética é a ciência que estuda os cromossomos (Guerra 1988), analisando principalmente os cromossomos mitóticos, as técnicas citogenéticas estão separadas em clássicas (Giemsa, Banda C, Região organizadora de nucléolo detectada por nitrato de Prata - Ag-RON) e moleculares, que consistem no mapeamento de sequências específicas de DNA, utilizando a Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (DNAr 18S, 5S e Telômeros) (Kasahara 2009).

Na citogenética de vertebrados é usual o emprego do corante Giemsa para conhecimento das características básicas do conjunto cromossômico de uma espécie, como: número diploide, morfologia cromossômica e número fundamental (número total de braços), favorecendo assim um importante caminho para uma comparação intra e interespecífica (Guerra e Souza 2002; Kasahara 2009). Em Loricariina (Tabela 2) o número diploide pode variar dependendo da espécie, por exemplo, em *Rineloricaria latirostris* (Boulenger, 1900) esse número é diverso, variando de  $2n=38$  a  $2n=48$ , dependendo da população e localidade estudada (Giuliano-Caetano 1998; Glugoski *et al.* 2018). Nas espécies *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835),

*Loricariichthys platymetopon* Isbrücker & Nijssen, 1979 e *Rineloricaria stellata* Ghazzi, 2008 esse número é  $2n=54$ , outras espécies, entretanto, como *Loricaria cataphracta* Linnaeus, 1758 e *Rineloricaria capitonia* Ghazzi, 2008 e outras apresentam  $2n=64$  (Scavone e Júlio 1995; Porto *et al.* 2014a; Takagui *et al.* 2014; Primo *et al.* 2016; 2018; Takagui *et al.* 2020). Uma característica notável dessa subtribo é sua constituição cariotípica com mais pares de cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos em relação às outras morfologias cromossômicas como ocorre, por exemplo, em *Rineloricaria aequalicuspis* Reis & Cardoso, 2001 e *Rineloricaria microlepidogaster* (Regan, 1904) que possuem o cariótipo constituído somente por cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos (Venturelli *et al.* 2021).

Uma outra forma de analisar o conjunto cromossômico é a partir da detecção da heterocromatina constitutiva (material genético que permanece condensada em todas as células de um determinado organismo e é constituída por sequências curtas e repetitivas de DNA), que é relevante na diferenciação de cromossomos ou cariótipos aparentemente similares com a coloração convencional. Essas variações entre bandas podem ser observadas entre indivíduos ou populações de uma mesma espécie (Guerra 1988; Brammer 2003; Kasahara 2009).

Assim como o bandeamento C, a técnica de identificação Ag-RON é outro marcador citotaxômico utilizado, visando uma melhor caracterização dos cariótipos. As Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) são regiões responsáveis pela transcrição de RNA ribossômico e a impregnação do Nitrato de Prata ( $Ag-NO_3$ ) ocorre nas proteínas acídicas que se associam aos RNAr, transcritos pela sequência de DNA ribossômico (Guerra 1988; Kasahara 2009). As RONs possuem variações numéricas inter ou intraindividuais, no tamanho e localização/posição, sendo um marcador citotaxônômico amplamente empregado na citogenética para diagnoses de espécies ou populações (Molina e Jacobina 2013).



Tabela 2. Dados citogenéticos de espécies de Loricariinae (os dados de Harttiini e Farlowellina serão discutidos mais adiante).

2n= Número diploide; FC= Fórmula Cariotípica; RON = Região organizadora de nucléolo; m= Metacêntrico; sm= Submetacêntrico; st= Subtelocêntrico; a= Acrocêntrico; T= terminal; IN= Intersticial; PC= Pericentromérico; ♀=Fêmea; ♂=Macho; DI= Dados indisponíveis.

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	RON/DNAr 18S	DNAr 5S	Referências
<b>Tribo Harttiini</b>						
<i>Harttia absaberi</i>	Rio Passa Cinco (SP)	62	13m + 23sm+ 16st+10a	Par 1 (IN)	Par 8 (IN)	1
<i>Harttia carvalhoi</i>	Rio Paraíba do Sul (SP)	52	18m + 18sm + 8st + 8a ♀	Par 23 (IN)	Par 23 (T) e no par 4 ou 5 (IN)	2
	Rio Paraíba do Sul (SP)	53	17m + 18sm+ 8st +10a ♂	Par 23 (IN)	Par 23 (T) e no par 4 ou 5 (IN)	2
	Rio Paraíba do Sul (SP)	52	16m + 16sm +12st +8a ♀	Par 23 (IN)	Par 3 (PC) e no par 23 (T)	3 e 4
	Rio Paraíba do Sul (SP)	53	15m + 16sm +12st +10 <sup>a</sup> ♂	Par 23 (IN)	Par 3 (PC) e no par 23 (T)	3 e 4
<i>Harttia dissidens</i>	Cachoeira Grim (PA)	54	20m + 26sm + 8a	Par 24 (IN)	Par 19 (IN)	5
<i>Harttia duriventris</i>	Rio Parauapebas (PA)	56	16m + 16sm + 16st + 8a ♀	Par 25 (IN) (X1)	Par 15 (PC)	6
	Rio Parauapebas (PA)	55	17m + 16m + 16st + 6a ♂	X1 e Y (IN)	Par 15 (T)	6
<i>Harttia graciliis</i>	Riacho Machadinho (MG)	58	20m + 22sm +8st +8a	Par 26 (IN)	Par 2 (IN)	4
<i>Harttia guianensis</i>	Córrego Paraís (PA)	58	20m + 26sm + 2st + 10a	Par 25 (PC)	Pares 4 (PC) e 25 (T)	5
<i>Harttia intermontana</i>	Rio Piranga (MG)	52	14m + 12sm + 12st + 14a ♀	Par 2 (IN)	Par 11 (IN)	7
		53	13m + 12sm + 13st + 15a ♂	Par 2 (IN)	Par 11 (IN)	7
<i>Harttia kronei</i>	Rio Betari (SP)	58	40m/sm + 18st	Par 11 (T)	DI	8
	Rio Açungui (PR)	58	14m + 20sm + 14st + 10a	Par 2 (IN)	Par 1 (PC)	3
	Rio Açungui (PR)	58	16m + 16sm +16st +10a	Par 2 (IN)	Par 9 (PC)	4
<i>Harttia longipinna</i>	Rio São Francisco (SP)	58	16m + 12sm +16st +14a (0-2 Cromossomos B)	Par 23 (IN)	Par 11 (T)	4
<i>Harttia loricariformis</i>	Rio Grande (SP)	52	32m/sm + 20st/a	Par 17 (T)	DI	8
	Rio Paraitinga (SP)	56	16m + 22sm +10st +8a	Par 25 (PC)	Par 25 (T)	4
<i>Harttia punctata</i>	Rio Itiquira (GO)	58	16m + 20sm +12st +10a ♀	Par 26 (PC) (x2)	Par 25 (IN) (X1)	9 e 4
		57	16m + 21sm +12st +8a ♂	Par 26 (IN) (X1)	Y e 25	9 e 4
<i>Harttia rondoni</i>	Rio 13 de maio (PA)	54	20m + 26sm + 4st + 4a ♀	Par 11 (IN) (X1)	Par 4 (IN)	6

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	RON/DNAr 18S	DNAr 5S	Referências
		54	20m + 26sm + 4st + 4a (M)	X e Y (IN)	Par 4 (IN)	6
<i>Harttia</i> sp. 1	Córrego Macacos (SP)	56	14m + 14sm + 10st + 18a	Par 20 (IN)	Pares 12 (PC) e 20 (T)	7
		57	13m + 14sm + 10st + 20a	Par 20 (IN)	Pares 12 (PC) e 20 (T)	7
<i>Harttia</i> sp. 2	Rio Barra Grande (PR)	62	16m + 14sm + 12st + 20a	Par 22 (IN)	Par 9 (PC)	7
<i>Harttia</i> sp. 3	Rio do Peixe (PA)	54	16m + 18sm + 14st + 6a	Par 1 (IN)	Par 15 (PC)	5
<i>Harttia torrenticola</i>	Riacho Araras (MG)	56	16m + 10sm + 16st + 14a	Par 22 (IN)	Um par m - sem numeração	3
<i>Harttia torrenticola</i>	Riacho Araras (MG)	56	16m + 10sm + 16st + 14a	Par 22 (IN)	Par 3 (IN)	4
<i>Harttia villasboas</i>	Rio Curuá (PA)	56	18m + 24sm + 6st + 8a ♀	Par 25 (IN) (X1)	Par 15 (T)	6
	Rio Curuá (PA)	55	19m + 24sm + 6st + 6a ♂	X1 e Y (IN)	Par 15 (T)	6
<b>Tribo Loricariini: Subtribo Farlowellina</b>						
<i>Farlowella</i> cf. <i>amazonum</i>	Rio Negro (AM)	58	14m + 30sm + 14st	Par 1 (T)	Par 20 (T)	10
<i>Farlowella hahni</i>	Córrego Dourado (MS)	58	12m + 30sm + 10st + 6a	Par 27 (T)	Pares 24,27 (PC) e 27, 28 (T)	11
<i>Farlowella hahni</i>	Rio Iguaçú (PR)	58	12m + 20sm + 22st + 4a	Par 28 (T)	Par 22 (IN)	11
<i>Farlowella hahni</i> *Publ. como <i>F. amazonum</i>	Rio Iguatemi (MS)	58	12m + 30sm + 10st + 6a	Par 27 (T)	DI	12
<i>Farlowella hahni</i> *Publ. como <i>F. amazonum</i>	Rio Iguatemi (MS)	58	6m + 38sm + 8st + 6a	Par 27 (T)	DI	13
<i>Farlowella schreitmulleri</i>	Igarapé Jundiá (AM)	58	10m + 30sm + 14st + 4a	Par 28 (T)	Pares 16 e 26 (T)	10
<i>Sturisoma barbatum</i>	Rio Miranda (MS)	66	20m + 18sm + 16st + 12a	Par 28 (T)	Pares 20 (T) e 23 (IN)	14
<i>Sturisoma nigrirostrum</i>	Rio Araguaia (MT)	64	10m + 18sm + 36 st/a	Par 24 (T)	DI	15
<b>Tribo Loricariini: Subtribo Loricariina</b>						
<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i>	Igarapé São Francisco (AM)	46	42m/sm + 4st/a	DI	DI	16
	Rio Iquiri (AM)	58	28m/sm + 30st/a	DI	DI	16
<i>Loricaria carinata</i>	Rio Paraná-Prata *(AR)	64	12m/sm + 52st/a	DI	DI	17
<i>Loricaria cataphracta</i>	Córrego da Onça (MS)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Par 12 (IN)	DI	18
	Córrego da Onça (MS)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Par 8 (IN)	DI	18
	Córrego da Onça (MS)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Pares 8 e 12 (IN)	DI	18

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	RON/DNAr 18S	DNAr 5S	Referências
	Córrego da Onça (MS)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Pares 9 e 12 (IN)	DI	18
	Córrego da Onça (MS)	64	12m + 8sm + 2s t+ 42a	Pares 12 e 13 (IN)	DI	18
<i>Loricaria cf. cataphracta</i>	Rio Iguaçu (PR)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Par 8 (T)	DI	14
<i>Loricaria simillima</i>	Rio Paraná *(AR)	64	12m + 12sm + 40st/a	Par 8 (IN)	DI	19
	Rio Miranda (MS)	64	12m + 8sm + 2st + 42a	Par 8 (IN)	25 (PC)	14
<i>Loricaria sp.</i>	Rio Paraná (PR)	64	10m + 6sm + 4st + 44a (0-5 Cromossomos B)	DI	DI	20
<i>Loricariichthys anus</i>	Rios Ijuí, Tramandaí e Córrego Ribeirão	54	14m + 14 sm + 25a	Par 19 (IN)	Par 15 (IN)	21
	Rio Iguaçu (PR)	54	14m + 14sm + 26a	Par 19 (IN)	Par 15 (IN)	21
	Lagoa de Itapeva (RS)	54	10m + 16sm + 28a	Par 20 (IN)	DI	14
	Córrego Capivara (RS) e Rio Chimiray *(AR)	54	10m + 18sm + 26a	Par 21 (IN)	DI	14
<i>Loricariichthys maculatus</i>	Rio Paraná-Prata *(AR)	56	22m/sm + 34 st/a	DI	DI	17
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	Rio Paraná Prata *(AR)	54	6m + 20sm + 4st + 24a ♀	DI	DI	17 e 20
	Rio Paraná Prata *(AR)	54	7m+ 20sm+ 4st+ 23a ♂	DI	DI	17 e 20
	Rio Jacutinga (PR) e rio Paranapanema (SP)	54	10m + 16sm + 28a	Par 14 (T)	DI	21
	Rio Miranda (MS)	54	10m + 16sm + 28a	Par 14 (T)	Par 9 e 14 (IN)	14
	Rio do Peixe (SP)	54	10m+16sm+8st+20a	Par 14 (T)	Par 9 e 14 (IN)	1
	Ribeirão Cambé (PR)	54	8m+18sm+4st+24a	Par 14 (T)	Pares 8 (IN) e 14 (IN)	22
<i>Loricariichthys rostratus</i>	Rio Iguaçu (PR)	54	10m + 16sm + 2st + 26a	Par 19 (IN)	Par 15 (IN)	23
<i>Proloricaria prolixa</i>	Rio Paraná (PR)	62	20m + 4sm + 38a	DI	DI	24
	Córrego Três Bocas (PR)	62	20m + 6 sm+ 36 a	Par 20 (T)	Par 24 (IN)	14
<i>Pyxiloricaria menezesi</i>	Rio Miranda (MS)	68	8m + 6sm + 12st + 52a	Par 30 (PC)	Par 20 (IN)	14
<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	Rio Maquiné (RS)	68	68st-a	Par 8 (T)	Pares 10, 23, 24, 25, 28, 29, 31 e 32 (T)	25
<i>Rineloricaria cadeae</i>	Lago Guaíba (RS)	64	2 m/sm + 62 st/a	Par 9 (T)	DI	8
	Rio Guaíba (RS)	66	2m/sm + 64 st/a	Par 2 (T)	DI	26
	Rio Forquetinha (RS)	64	64st/a	Par 8 (T)	Pares 13 e 21 (T)	25

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	RON/DNAr 18S	DNAr 5S	Referências
<i>Rineloricaria capitonina</i>	Rio Uruguai (RS)	64	4 m + 2sm + 58 st/a	Par 3 (T)	Pares 16, 17, 18 e 19 (T)	27
<i>Rineloricaria kronei</i>	Rio Itapocu (SC)	64	6m/sm + 58st/a	Par 5 (T)	DI	8
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	Córrego da Onça (MS)	45	4m + 2sm + 2st + 37a	Par 13 (IN)	DI	28
	Córrego da Onça (MS)	46	4m + 2sm + 2st + 38a	Par 4 (T)	DI	28
	Córrego da Onça (MS)	47	4m + 1sm + 2st + 40a	Par 4 (T/IN)	DI	28
	Córrego da Onça (MS)	47	3m + 1sm + 2st + 41a	Par 4 (T), 13 (IN)	DI	28
	Córrego da Onça (MS)	48	3m + 2st + 43a	Par 13 (IN)	DI	28
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Rio Laranjinha (PR)	46	10m + 4sm + 32st/a	Par 2 (IN)	Par 3 (IN) e 10, 11, 21, 22, 23 (T)	27
	Rio Barra Grande (PR)	46	10m + 4sm + 32st/a	Par 2 (IN)	Par 3 (IN) e 10, 11, 21 (T)	27
	Rio das Pedras (PR)	46	10m + 4sm + 32st/a	Par 2 (IN)	Par 3 (IN) e 10, 11, 22, 23 (T)	27
	Rio Piumhi (MS)	48	6m + 6sm + 36st/a	Par 7 (T)	Pares 9 e 16 (T)	29
	Rio Três bocas (PR)	43	17m/sm + 26st/a	DI	DI	30
	Rio Três bocas (PR)	44	16m/sm + 28st/a	DI	DI	30
	Rio Três bocas (PR)	46	14m/sm + 32st/a	DI	DI	30
	Rio Três bocas (PR)	47	13m/sm + 34st/a	DI	DI	30
	Rio Três bocas (PR)	48	12 m/sm + 36st/a	DI	DI	30
	Rio Passa-Cinco (SP)	44	16 m/sm + 28st/a	DI	DI	30
	Rio Passa-Cinco (SP)	45	15 m/sm + 30st/a	DI	DI	30
	Rio Passa-Cinco (SP)	46	14 m/sm + 32st/a	DI	DI	30
	Rio Passa-Cinco (SP)	47	13 m/sm + 34st/a	DI	DI	30
	Rio Mogi-Guaçu (SP)	36	24 m/sm + 12st/a	DI	DI	30
	Rio Mogi-Guaçu (SP)	37	23 m/sm + 14st/a	DI	DI	30
	Rio Mogi-Guaçu (SP)	38	22 m/sm + 16st/a	DI	DI	30
	Rio Mogi-Guaçu (SP)	39	21m/sm + 18st/a	DI	DI	30
Rio Mogi-Guaçu (SP)	40	20m/sm + 20st/a	DI	DI	30	

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	RON/DNAr 18S	DNAr 5S	Referências
	Rio Mogi-Guaçu (SP)	40	16m + 4sm + 20st/a	Par 2 (IN)	Pares 6, 9, 10 (IN) e 15, 16, 20 (T)	1
	Rio Passa-Cinco (SP)	46	10m + 4sm + 32st/a	Par 1 (IN)	Pares 6, 7 (IN) e 14, 16 (T)	1
<i>Rineloricaria lima</i> *FC apresentada conforme o artigo.	Rio Açungui (PR)	66	1m <sup>1</sup> + 1m <sup>3</sup> +1m <sup>5</sup> + 1st <sup>1</sup> + 2st + 60a	Par 1st (T)	Pares 1m <sup>3</sup> + 1st <sup>1</sup> + 6a (PC)	31
	Córrego de Areia/Açungui (PR)	66	2m <sup>1</sup> + 1m <sup>3</sup> +1m <sup>5</sup> + 2st + 60a	Par 1st (T)	Pares 1m <sup>3</sup> + 8a (PC)	31
	Córrego de Areia/Açungui (PR)	68	1m <sup>3</sup> + 1m <sup>5</sup> + 2sm <sup>1</sup> + 2st + 62a	Par 1st (T)	Pares 1m <sup>3</sup> + 2sm <sup>1</sup> + 4a(PC)	31
	Córrego de Areia/Açungui (PR)	68	2m <sup>2</sup> + 2st + 64a	Par 1st (T)	Par 10a (PC)	31
	Córrego de Areia/Açungui (PR)	69	1m <sup>5</sup> + 1sm <sup>1</sup> + 2st + 65a	Par 1st (T)	Pares 1sm <sup>1</sup> + 8a (PC)	31
	Córrego de Areia/Açungui (PR)	69	1m <sup>1</sup> + 2st + 66a	Par 1st (T)	Par 10a (PC)	31
	Córrego de Areia/Açungui (PR)	70	2m <sup>4</sup> + 2st + 66a	Par 1st (T)	Pares 2m <sup>4</sup> + 6a (PC)	31
	Córrego de Areia/Açungui (PR)	70	3m + 2st + 43a	Par 1st (T)	Par 10a (PC)	31
<i>Rineloricaria longicauda</i>	Lagoa da Cerquinha (RS)	70	6m/sm + 64st/a	Par 10 (T)	Pares 6, 9, 13 e 14 (T)	25
<i>Rineloricaria malabarbai</i>	Rio Forquetinha (RS)	64	4 m/sm + 60 st/a	Par 10 (T)	Pares 12, 16, 17 e 22 (T)	25
<i>Rineloricaria microlepdogaster</i>	Rio Forquetinha (RS)	68	68st/a	Par 8 (T)	Par 11 (T)	25
<i>Rineloricaria parva</i>	Rio Miranda (MS)	60	6m/sm + 54st/a	Par 1 (T)	Par 5 (T)	14
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	Rio Barra Grande e Rio Juruba (PR)	56	4m + 10sm + 42st/a	Par 3 (T)	Pares 8, 9, 10, 15 e 16 (T)	27
	Rio Barra Grande (PR)	54	6m + 4 sm + 44st/a	Par 4 (T)	Pares 7, 8, 10 e 21 (T)	27
	Córrego Tauá e Rio Keller (PR)	56	8m/sm + 48st/a	Par 5 (T)	DI	32
	Rio Tatupeba (PR)	56	8m/sm + 48st/a	Pares 5 e 8 (T)	DI	32
	Rio Jacucaca (PR)	56	8m/sm + 48st/a	Par 5 (T)	DI	27
	Rio Barra Grande (PR)	54	4m + 4sm + 48st/a	Par 5 (T)	Pares 6,7,8, 15 e 18 (T)	33
	Rio Barra Grande (PR)	55	5m + 4sm + 46st/a	Par 5 (T)	Pares 6,7,8, 15 e 18 (T)	33
	Rio Barra Grande (PR)	56	6m +4sm + 44 st/a	Par 5 (T)	Pares 6,7,8, 15 e 18 (T)	33
<i>Rineloricaria quadrensis</i>	Lagoa Quadros (RS)	70	6m/sm + 64 st/a	Par 9 (T)	Par 1 (IN) e 15, 16, 17, 25 (T)	25

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	RON/DNAr 18S	DNAr 5S	Referências
<i>Rineloricaria reisi</i>	Córrego Chimiray *(AR)	60	60st/a	Par 1 (T)	Pares 6 e 18 (T)	14
<i>Rineloricaria stellata</i>	Rio Uruguai (RS)	54	6m + 14sm + 34st/a	Pares 4, 6, 9 e 10 (T)	DI	27
<i>Rineloricaria strigilata</i>	Rio Forquetinha (RS)	68	6m/sm + 62 st/a	Par 9 (T)	DI	26
<i>Rineloricaria teffeana</i>	Rio Tefé (AM)	34	34a ♀	Par 4 (PC)	Pares 7 e 8 (PC)	34
	Rio Tefé (AM)	33	1sm + 32a ♂	Par 4 (PC)	Pares 7, 8 e 1sm (PC)	34
<i>Spatuloricaria</i> sp.	Rio Xingu (PA)	66	8m + 14sm + 12st + 32a	Par 8 (T)	DI	35
<i>Spatuloricaria</i> sp.	Rios Abaetetuba e Caripetuba (PA)	66	50a + 6sm + 10 sm	DI	DI	36

- (1) Rodrigues 2010  
(2) Centofante *et al.* 2006  
(3) Blanco *et al.* 2013  
(4) Blanco *et al.* 2017  
(5) Sassi *et al.* 2021  
(6) Sassi *et al.* 2020  
(7) Deon *et al.* 2020  
(8) Alves *et al.* 2003

- (9) Blanco *et al.* 2014  
(10) Marajó *et al.* 2018  
(11) Fernandes *et al.* 2021  
(12) Fernandes *et al.* 2012  
(13) Fernandes *et al.* 2015  
(14) Takagui *et al.* 2020  
(15) Artoni e Bertollo 2001  
(16) Carvalho *et al.* 2018

- (17) Fenocho *et al.* 2003  
(18) Porto *et al.* 2014a  
(19) Benitez *et al.* 2016  
(20) Scavone e Júlio 1995  
(21) Takagui *et al.* 2014  
(22) Santos 2022  
(23) Moter 2016  
(24) Scavone e Júlio 1994

- (25) Venturelli *et al.* 2021  
(26) Maia *et al.* 2010  
(27) Primo *et al.* 2016  
(28) Porto *et al.* 2014b  
(29) Glugoski *et al.* 2018  
(30) Giuliano – Caetano 1998  
(31) Rosa *et al.* 2012  
(32) Porto *et al.* 2011

- (33) Glugoski *et al.* 2023  
(34) Marajó *et al.* 2022  
(35) Ferreira *et al.* 2014  
(36) Almeirda *et al.* 2023  
\* (AR) Argentina

Em Loricariina algumas espécies apresentaram blocos heterocromáticos nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos como em *L. anus*, *L. platymetopon*, *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978), mas as regiões heterocromáticas podem também se apresentar intersticialmente ou na posição terminal de outros cromossomos (Takagui *et al.* 2020). Quanto às Regiões Organizadoras de Nucléolos, em geral, são simples, como ocorrem nas espécies *Loricaria simillima* Regan, 1904, *Rineloricaria parva* (Boulenger, 1895) e na maioria das espécies em Loricariina (Benitez *et al.* 2016; Takagui *et al.* 2020). Porém, algumas espécies apresentam RONS múltiplas, porém é algo relativamente raro, sendo pouco descrito no grupo, destacando as espécies *L. cataphracta*, *R. stellata* e *Rineloricaria lanceolata* (Günther, 1868) (Porto *et al.* 2014a e b; Primo *et al.* 2016).

Outro procedimento da citogenética é a hibridização *in situ*, nomeada assim porque promove uma reação de sequências complementares (hibridização) de segmentos de DNA ou RNA, as chamadas sondas, diretamente com o DNA-alvo, presente nos cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos, fixados sobre a superfície de uma lâmina. As sondas de DNA podem ser sequências teloméricas, centroméricas, genes ribossômicos 45S e 5S, DNA altamente repetitivo ou satélites, assim como o genoma total e outros (Kasahara 2009). Em eucariotos superiores, conjuntos *in tandem* de genes de RNA ribossômico são organizados em duas famílias multigênicas. Uma família é representada pelo DNAr 45S que sofre o processo pós-transcricional formando os genes essenciais necessários para a função do ribossomo: os RNAr 5.8S, 18S e 28S, e a outra família é representada pelo DNAr 5S que codifica o RNAr 5S (Martins e Galetti-Jr. 1999; Sochorová *et al.* 2018). Estudos sobre genes ribossômicos têm ganhado destaque em análises citogenéticas e moleculares em uma ampla variedade de organismos, especialmente na caracterização de espécies e/ou populações (Molina e Jacobina 2013), pois as sequências de nucleotídeos dos genes dos DNAr 5S e 45S são muito conservadas evolutivamente (Guerra 2004).

Outra classe de DNA repetitivo investigada em estudos citogenéticos são as sequências teloméricas que são altamente relevantes, pois desempenham um papel crítico na manutenção da estabilidade dos cromossomos (Martins 2007; Junqueira e Carneiro 2012). Esse DNA telomérico ocorre caracteristicamente nas regiões terminais de cada cromossomo, embora excepcionalmente seja encontrado em outras regiões cromossômicas, principalmente próximo aos centrômeros (Guerra 2004). O desenvolvimento e o uso generalizado de técnicas de Hibridização *in situ* Fluorescência (FISH) auxiliam na identificação de cromossomos ou de

segmentos cromossômicos em híbridos interespecíficos, na detecção de alterações cromossômicas e na integração de mapas genéticos, mapas cromossômicos e possibilita inferir relações evolutivas (Pozzobon *et al.* 2010; Sochorová *et al.* 2018). Em conjunto, os dados de DNAs repetitivos parecem ter um papel importante na organização e evolução do genoma, levando a um impacto significativo em estudos de especiação (Martins 2007).

Dentro de Loricariina, no mapeamento por FISH, os sinais com a aplicação da sonda DNAr 18S localizam-se, na maioria dos casos, na região terminal de um único par cromossômico. Entretanto, as espécies de *L. anus*, *L. simillima*, *L. cataphracta*, *R. latirostris* e *Rineloricaria lanceolata* (Günther, 1868) apresentaram marcações em posição intersticial (Rodrigues 2010; Porto *et al.* 2014a; Benitez *et al.* 2016; Primo *et al.* 2016; Glugoski *et al.* 2018; Takagui *et al.* 2020). Quanto ao DNAr 5S a maioria dos estudos abrangem o gênero *Rineloricaria*, sendo que na maioria das espécies ele se apresenta de modo múltiplo como ocorre em *Rineloricaria pentamaculata* Langeani & de Araujo, 1994, *R. latirostris*, *R. stellata*, *R. capitonia* (Primo *et al.* 2016; 2018), enquanto outras espécies possuem marcações simples como em *Pyxiloricaria menezesi* Isbrücker & Nijssen, 1984, *R. parva* e *R. reisi* Ghazzi, 2008 (Takagui *et al.* 2020). Quanto às sondas teloméricas, os estudos citogenéticos são escassos (Rodrigues 2010; Rosa *et al.* 2012; Porto *et al.* 2014b; Primo *et al.* 2016). Entretanto, a ocorrência de sítios teloméricos intersticiais (ITs) em Loricariina é algo frequente, visto que foram evidenciados principalmente em *Rineloricaria* (Rosa *et al.* 2012; Porto *et al.* 2014b; Primo *et al.* 2016; Glugoski *et al.* 2018; 2023).

De modo geral, as técnicas citogenéticas (clássicas e moleculares) contribuem para o entendimento da evolução, auxiliando assim a citotaxonomia, que associada a dados morfológicos, biogeográficos, comportamentais pode detectar espécies crípticas, sendo uma excelente ferramenta em estudos da biodiversidade ictiíca (Artoni *et al.* 2000; Kasahara 2009; Molina e Jacobina 2013). Visto os escassos estudos puramente morfológicos com o gênero *Pseudoloricaria*, as reformulações e incertezas quanto à taxonomia da subfamília e os questionamentos quanto à diversidade e distribuição do gênero, esta investigação teve como objetivo colaborar com os futuros estudos integrativos apresentando a primeira caracterização cromossômica de *Pseudoloricaria laeviuscula* por meio de uma abordagem citogenética convencional e molecular.



## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Caracterizar, citogeneticamente, a espécie *Pseudoloricaria laeviuscula* (Valenciennes, 1840), inferindo sobre suas relações evolutivas dentro da subfamília Loricariinae.

### **2.2 Específicos**

- Identificar a macroestrutura cariotípica de *Pseudoloricaria laeviuscula* por meio de marcadores clássicos (número diploide, número fundamental, fórmula cariotípica, banda C e Ag-RON).
- Mapear sequências repetitivas de DNA ribossomal 18S, DNAr 5S e teloméricas.
- Comparar a estrutura cromossômica de *Pseudoloricaria laeviuscula* com a de espécies da subfamília Loricariinae e sugerir os possíveis processos evolutivos que estão ocorrendo no gênero.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Material

No presente estudo foram analisadas as preparações cromossômicas de *Pseudoloricaria laeviuscula* (Figura 4), que estavam depositadas no banco de suspensões cromossômicas do Laboratório de Genética Animal (LGA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Dessas suspensões, 20 (sete machos e 13 fêmeas) apresentaram cromossomos mitóticos satisfatórios para análises. Dessas preparações cromossômicas, 19 exemplares foram coletados no rio Cuieiras, em frente à comunidade São Sebastião (2°49'03.6"S, 60°29'09.6"W) em novembro de 2018 e, posteriormente, apenas um indivíduo foi coletado no Parque Nacional de Anavilhanas (2°40'27.6"S 60°39'18.4"W), ambas as localidades no Rio Negro, Amazonas, Brasil. (Figura 5).

As coletas desse material foram realizadas pelo Dr. Patrik Viana e pelo doutorando Leandro Marajó, sob licença permanente de N° 28095-1, concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Este trabalho seguiu os Padrões Éticos para Pesquisa Animal de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, de acordo com a Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais (número do protocolo 030/2020, SEI 01280.001063/2020-07).

Os espécimes foram identificados pela especialista em sistemática e filogenética de peixes Dra. Lúcia Helena Rapp Py-Daniel e depositados na Coleção de peixes do INPA (INPA-ICT 059686 e INPA- ICT 060695).



Figura 3. Espécime de *Pseudoloricaria laeviuscula*: a) vista dorsal, b) ventral (aberta devido os procedimentos citogenéticos), c) lateral. Indivíduo fêmea com 210 mm, coloração em álcool.

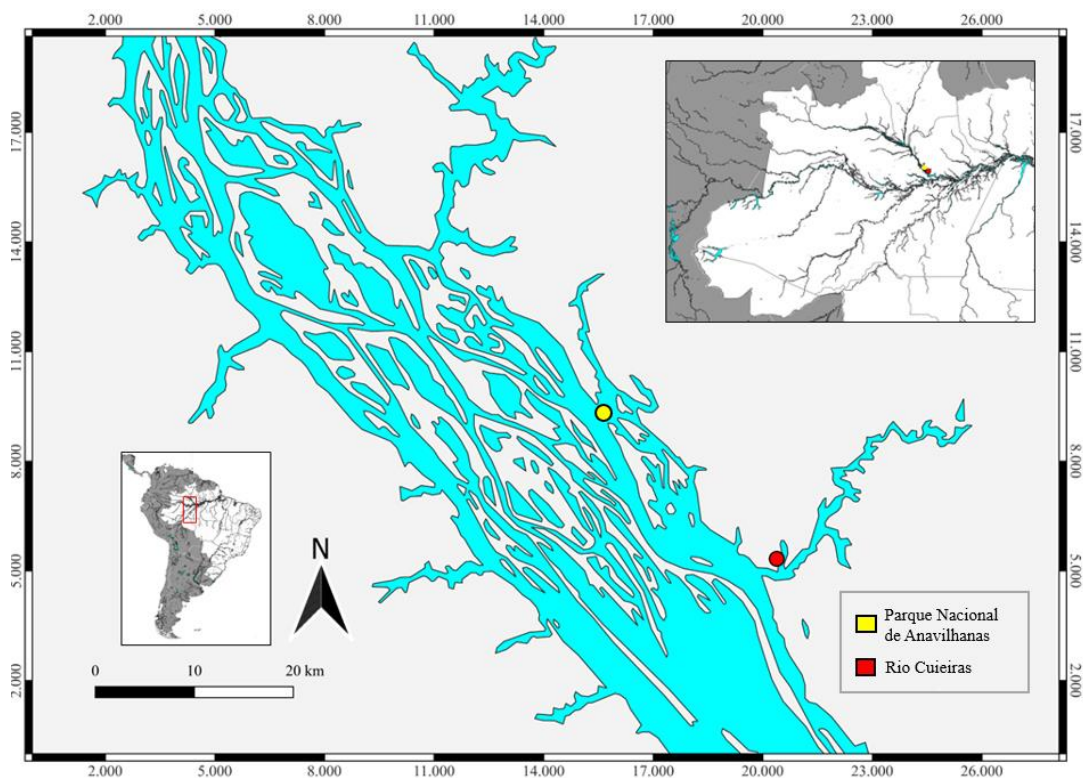


Figura 4. Ponto de coleta dos indivíduos. Em vermelho os 19 indivíduos do Rio Cuieiras e em amarelo o indivíduo do Parque Nacional de Anavilhanas, AM, Brasil.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Indução de mitoses**

Para a obtenção de um maior número de células em metáfase foi utilizada a técnica de indução de mitoses descrita por Oliveira *et al.* (1988), onde foi preparada uma solução de fermento biológico na proporção de 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 20 ml de água destilada. Em seguida, esta solução foi incubada em estufa a 40 °C por cerca de 20 minutos e, posteriormente, injetada na região intraperitoneal do animal vivo, na proporção de 1 mL para cada 100 g de peso. Os peixes foram mantidos em aquários aerados por um período de 24 horas antes da coleta dos tecidos para análise citogenética.

### **3.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos**

As preparações para obtenção dos cromossomos mitóticos seguiram o protocolo descrito por Gold *et al.* (1990), que consiste em: 24 horas após a aplicação da solução de fermento, os peixes foram eutanasiados utilizando Eugenol, procedendo-se a retirada do rim, que é o órgão hematopoiético dos peixes. O material foi transferido para uma cubeta de vidro contendo 15 mL de meio RPMI e o tecido foi dissociado com auxílio de uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, com movimentos leves de aspiração e expiração, onde foi obtida uma suspensão homogênea de células. Posteriormente, foram adicionadas 3 a 4 gotas (ou 150 µL para cada 2 mL de meio de cultura) de colchicina 0,0125% e o material foi ressuspenso, cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur e incubado em estufa a 37 °C por 30 minutos.

Após esse período, o material foi transferido para um tubo de centrífuga e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm; em seguida foi retirado o sobrenadante tomando cuidado para não ressuspenso o material e foi acrescentado 10 mL de solução de KCl 0,075M; o material foi ressuspenso novamente e deixado em estufa a 37 °C por 40 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de fixador *carnoy* gelado (3 metanol: 1 ácido acético) e uma nova centrifugação por 10 minutos a 900 rpm.

O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur, tomando cuidado para não ressuspenso o material, sendo acrescentados novamente 10 mL de fixador gelado. O material foi centrifugado por 10 minutos, sendo que este passo foi repetido mais duas vezes. Após a eliminação do sobrenadante da última centrifugação foi adicionado 1,5 mL de fixador e o material foi transferido para um tubo de 2 mL e armazenado em freezer (-20 °C).

### **3.3. Coloração convencional (Giemsa)**

Para determinação do cariótipo, as lâminas limpas foram aquecidas a 60 °C em banho-maria e em seguida a suspensão celular foi gotejada sobre a lâmina. Estas foram secas no ambiente e posteriormente foram coradas com Giemsa diluída a 10% em tampão fosfato, pH 6,8 por 10 minutos e secas ao ar novamente, sendo observadas ao microscópio óptico após estarem secas.

### **3.4 Detecção das regiões de heterocromatina**

Para a detecção da heterocromatina utilizamos a técnica de bandeamento C descrita por Sumner (1972), com modificações. As lâminas, já contendo as preparações cromossômicas, foram tratadas durante 2 minutos com ácido clorídrico (HCl 0,2N) a 42 °C, lavadas rapidamente em água destilada à temperatura ambiente e secas ao ar. Em seguida foram incubadas a 42 °C em solução de hidróxido de bário a 5% por cerca de 50 segundos. A ação do hidróxido de bário foi interrompida imergindo as lâminas rapidamente em solução de HCl 0,2N (em temperatura ambiente) e posteriormente lavadas em água destilada. Em seguida, foram secas novamente ao ar e incubadas em solução 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trissódico 0,03M, pH 6,8), em banho-maria a 60 °C, por um período de 30 minutos, sendo novamente lavadas em água destilada e secas ao ar. Posteriormente, as lâminas foram coradas de acordo com Lui *et al.* (2012), utilizando uma solução contendo 0,5 µL de iodeto de propídio em 20 µL de Vectashield®, coberta com uma lamínula e mantida em recipiente escuro por 20 minutos. Após a montagem as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência.

### **3.5 Regiões Organizadoras de Nucléolos (Ag-RON)**

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RON) foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980). Esta técnica consiste em gotejar sobre a lâmina, contendo a preparação cromossômica, três gotas de uma solução coloidal, obtida com 1 g de gelatina comercial sem sabor dissolvida em 50 mL de água destilada, acrescida de 0,5 mL de ácido fórmico. Posteriormente, foi adicionado sobre cada gota da solução coloidal duas gotas de solução aquosa de Ag-NO<sub>3</sub> (nitrato de prata) a 50%, sendo coberta com uma lamínula. As lâminas foram incubadas em câmara úmida e levadas à estufa a 60 °C por um período de 5 a 10 minutos até atingirem uma coloração dourada ou marrom escura e, posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada até remoção da lamínula e deixadas secar diretamente ao ar.

### 3.6 Extração de DNA total

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido muscular dos peixes, preservado em etanol 100%, utilizando o Kit de extração Wizard® (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

Em um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL foi adicionado o tecido, juntamente com 310 µL de solução de EDTA + *Nuclei Lysis Solution* (60 µL de EDTA 0,5M + 250 µL de *Nuclei Lysis Solution*) e 8 µL de proteinase K. Esta mistura foi incubada por aproximadamente 3 horas à 55 °C, para dissociar o tecido. Foi adicionado RNase à mistura por 30 minutos à 37 °C. Posteriormente o material foi mantido em freezer por 5 minutos e então centrifugado por 10 minutos à 13000 rpm, o sobrenadante foi transferido para tubos novos e adicionado 300 µL de isopropanol gelado, centrifugando-os por 10 minutos à 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 300 µL de álcool 70% gelado foram adicionados e centrifugado por 10 minutos à 13000 rpm. O álcool 70% foi descartado e 300 µL de álcool 100% adicionados, centrifugado por 10 minutos à 13000 rpm. O álcool foi descartado e os tubos mantidos à 37 °C para secagem. Foram adicionados 50 µL de DNA *Rehydration Solution* e deixado *overnight*. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% (com tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X e corrida a 70 V por 60 minutos), corado com GelRed Acid Gel Stain Biotium (1:500). A visualização e análise do DNA no gel foram observadas no transluminador de luz ultravioleta (Loccos Biotechnology) e quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

### 3.7 Preparação das sondas de DNA ribossômico (DNAr) 18S e 5S e da sonda telomérica

As sequências repetitivas, utilizadas como sonda, foram isoladas por PCR. O isolamento dos genes ribossomais 18S e 5S foi realizado, utilizando os seguintes primers: Para o 18S: 18Sf (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT-3') e 18Sr (5'-CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA-3'). Esses primers foram usados para amplificar um segmento de DNA de 1400 pares de bases (pb) (Gross *et al.* 2010). Para o 5S: 5Sf (5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC3') e 5Sr (5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC 3') um segmento com aproximadamente 500 pb (Martins e Galetti Jr.1999). A amplificação enzimática destes elementos foi realizada a partir do DNA celular total previamente isolado, sendo a amplificação realizada através da técnica de PCR. Os produtos de PCR fita dupla foram obtidos em um volume total de 25 µL (~100 ng de DNA genômico; Tampão 1X; 0,5 unidade de Taq DNA Polimerase; 0,2 mM de cada dNTP – dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (primer); 2,0 mM de cloreto de magnésio e água mili-Q para completar o volume). As reações foram processadas em

termociclador (*Eppendorf - Mastercycler Gradient*). O programa de PCR foi utilizado seguindo as seguintes etapas: DNAr 18S: 1 minuto a 95 °C (para desnaturação da fita de DNA); 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (amplificação) e 5 minutos a 72 °C (extensão final). DNAr 5S: 1 minuto a 94 °C (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (amplificação) e 5 minutos a 72 °C (extensão final). Depois de amplificado, os produtos de PCR foram verificados e quantificados em gel de agarose 1% e quantificados em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

Para a detecção de sequências teloméricas foram utilizadas sondas amplificadas via PCR, usando os primers (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub> (Ijdo *et al.* 1991), seguindo os parâmetros: 1µl do primer F, 1µl do primer R, 12,5µl de Go Taq e 9,5µl de água destilada com um volume final de 24µl. O programa de PCR seguiu as seguintes condições: 1 minuto a 95 °C (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (amplificação) e 5 minutos a 72 °C (extensão final). Em seguida, o produto da PCR foi verificado em eletroforese e quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

### **3.8 Hibridização *in situ* fluorescente – FISH**

Os produtos de PCR (DNA ribossomal 18S, 5S e a sequência telomérica) foram marcados seguindo o método de Atto *nick translation* Kit (Jena Bioscience). Especialmente otimizados para incorporação em DNA por tradução de nick usando DNA Polimerase I, seguindo as instruções do fabricante. 5-Propargilamino-dUTP-ATTO-550 – fluoróforo vermelho e 5-Propargilamino-dUTP-ATTO-488 – fluoróforo verde seguindo as instruções do fabricante. A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) adotada foi a descrita por Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações.

#### **Tratamento das lâminas e fixação:**

As lâminas foram lavadas em tampão PBS 1x duas vezes durante 5 minutos em temperatura ambiente no “*termoshaker*”, sendo posteriormente fixadas em uma solução de formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl<sub>2</sub> durante 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida lavadas em PBS 1x por 5 minutos, sendo então desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85%, 100%) por 5 minutos cada e secas ao ar. O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 5 minutos e em seguida desidratado em série alcoólica gelada (70%, 85%, 100%) minutos cada, secas ao ar em temperatura ambiente.

### **Solução de hibridização:**

Simultaneamente à desidratação da lâmina em série alcoólica, a solução de hibridização, contendo formamida 100% (concentração final 50%), sulfato de dextrano 50%, 20xSSC (concentração final de 2xSSC), sondas (previamente marcadas usando o método *nick translation* Kit (Jena Bioscience)) e água milli-Q, foi preparada e posteriormente desnaturada a 95 °C por um período de 10 minutos, sendo passada imediatamente ao gelo.

### **Hibridização:**

Foram colocados 50 µL da solução de hibridização sobre cada lamínula, em seguida invertida a lâmina (com os cromossomos desnaturados) sobre a lamínula e incubada em câmara úmida (H<sub>2</sub>O destilada) a 37 °C por aproximadamente 18 horas (*overnight*).

### **Lavagens:**

Após o tempo de hibridização, as lâminas foram lavadas uma vez com 2xSSC a 42 °C por 5 minutos e posteriormente lavadas com Tween 0,5%, por 5 minutos. Depois lavadas uma última vez com água destilada para remover os excessos e colocadas para secarem ao ar.

### **Montagem das lâminas:**

As lâminas foram montadas com 20 µL de *antifading* (Vectashield®) mais 1 µL de DAPI (0,2 mg/mL), coberta com uma lamínula e mantida em recipiente escuro. Após a preparação, as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus Bx-51.

## **3.9 Processamento das imagens**

Após a análise e contagem dos cromossomos ao microscópio óptico foi estabelecido o número diploide modal e suas frequências relativas para cada indivíduo. As lâminas submetidas à coloração convencional (Giemsa) e Ag-RON foram analisadas em microscópio óptico com a objetiva de imersão, num aumento de 1.000 vezes. As lâminas que utilizaram fluorocromos (Bandeamento C e FISH) foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência Olympus Bx-51, sob filtro apropriado. Pelo menos 30 metáfases por indivíduo foram analisadas, sendo que as melhores tiveram sua imagem capturada, utilizando sistema de captura de imagens DPController e processadas pelo programa DPManager.

Para a montagem dos cariótipos foi utilizado o programa Adobe Photoshop 7.0, versão CS6, onde os cromossomos metafásicos mitóticos foram recortados, emparelhados, medidos no



programa DPManager e colocados em ordem decrescente de tamanho. A morfologia e classificação dos cromossomos foi determinada de acordo com a posição do centrômero segundo Levan *et al.* (1964), com base no índice de relação de braços (RB= comprimento do braço maior/comprimento do braço menor), podendo ser metacêntricos (RB= 1,0-1,7), submetacêntricos (RB= 1,71-3,0), subtelocêntricos (RB= 3,01-7,0) e acrocêntricos (RB > 7,00). Na determinação do número de braços (NF) foram considerados os cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como tendo dois braços e os acrocêntricos (a) como tendo apenas um braço.

#### 4. Resultados

Foram analisadas cerca de 30 metáfases por indivíduo da espécie *Pseudoloricaria laeviuscula*, onde determinou-se o número diploide igual a 54 cromossomos para machos e fêmeas, sem heteromorfismo sexual cromossômico e sem diferenças entre os locais de coleta. O cariótipo de *P. laeviuscula* está constituído por 14 metacêntricos + 10 submetacêntricos + 4 subtelocêntricos + 26 acrocêntricos (14m + 10sm + 4st + 26a) e o Número Fundamental foi igual a 82 braços cromossômicos (Figuras 6 a e b).

O padrão de Bandeamento C para machos e fêmeas se apresentou em poucos blocos e não estão presentes em todos os cromossomos (Figura 6 c e d). Entre os cromossomos metacêntricos, apenas os pares 1 e 4 apresentaram um bloco centromérico; entre os submetacêntricos, o par 8 apresentou os braços curtos heterocromáticos; nos subtelocêntricos, o par 13 (par nucleolar) apresentou um bloco intersticial no braço longo e o par 14 apresentou a região centromérica heterocromática; todos os cromossomos acrocêntricos apresentaram blocos centroméricos, sendo que o par 18 apresentou bloco heterocromático intersticial e este par junto com o 19 e 26 apresentaram também blocos terminais nos braços longos.

Quanto à Região Organizadora de Nucléolo (Ag-RON), esta foi evidenciada nos braços longos, em posição intersticial do par 13, subtelocêntrico, coincidente com a constrição secundária e banda C<sup>+</sup> (Figura 6, em destaque). A RON foi confirmada por Hibridização *in situ* fluorescência (FISH) com a sonda de DNAr 18S (Figura 6 e), enquanto o sítio de DNAr 5S encontra-se no par 18 um acrocêntrico médio, em posição pericentromérica (Figura 6 e).

Sequências teloméricas foram evidenciadas nas porções terminais de todos os cromossomos dos machos e nas fêmeas (Figura 6 f) e não foi verificada a presença de Sítios Teloméricos Intersticiais (ITS).

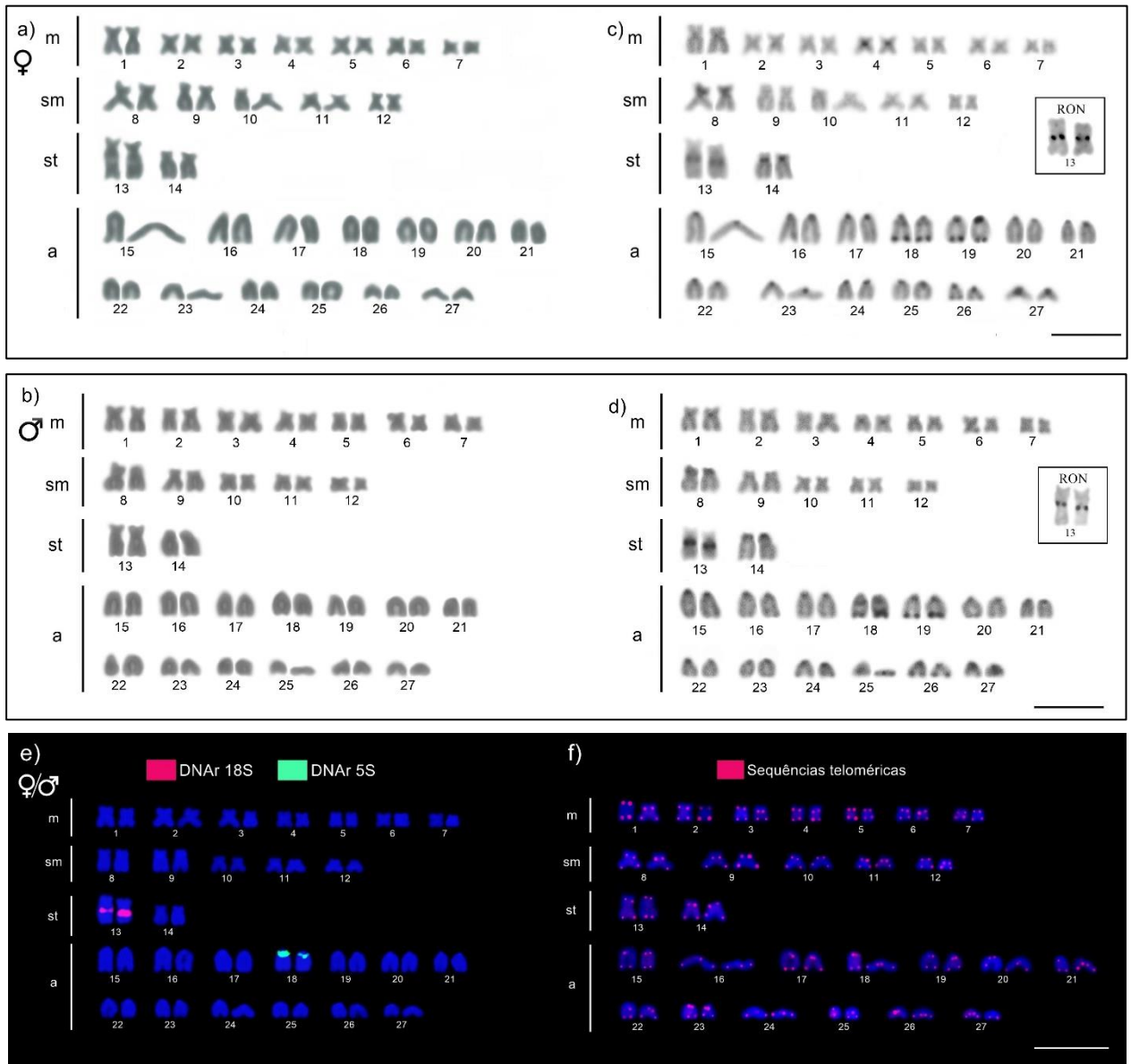


Figura 5. Cariótipo de *Pseudoloricaria laeviuscula*: (a e b) Coloração convencional com Giemsa; (c e d) Bandeamento C de fêmea e macho; em destaque Ag-RON no par 13. (e) Mapeamento cromossômico por Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) do DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde); (f) Sequência telomérica (vermelho). Barra igual a 20  $\mu$ m.

## 5. Discussão

Loricariidae é uma família de peixes que apresenta grande diversidade e complexidade taxonômica (Benitez *et al.* 2016; Covain *et al.* 2016; Roxo *et al.* 2019; Londoño-Burbano e Reis 2021) e, quanto aos estudos citogenéticos, é possível também perceber uma acentuada diversidade do número diploide e fórmulas cariotípicas, por exemplo, em *Rineloricaria teffeana*  $2n=33/34$  (Marajó *et al.* 2020), enquanto em *Hemipsilichthys gobio* (Lütken, 1874)  $2n$  é igual a 96 (publicado como *Upsilodus* sp. em Kavalco *et al.* 2005). Dentro dessa diversidade, *Pseudoloricaria laeviuscula*, aqui estudada, apresenta o número diploide igual a 54 cromossomos.

Para a família Loricariidae são descritos três padrões cariotípicos: o primeiro diz respeito a espécies com o número diploide inferior a 48 cromossomos; o segundo engloba espécies dentro da faixa considerada plesiomórfica para o grupo, com número diploide entre 52 e 58 cromossomos; e o terceiro inclui espécies com número diploide superior a 58 cromossomos (Blanco *et al.* 2012; Rosa *et al.* 2012; Takagui *et al.* 2020; Marajó *et al.* 2022). *P. laeviuscula* encontra-se no padrão considerado plesiomórfico para a família, padrão também encontrado dentro da subfamília Loricariinae, por exemplo, em espécies do gênero *Harttia* Steindachner 1877 e *Loricariichthys* Bleeker 1862 (Tabela 2). Os demais gêneros de Loricariinae apresentam macroestruturas cariotípicas diversificadas, por exemplo, em *Rineloricaria* o número diploide varia de 33 a 70, em *Loricaria* e *Spatuloricaria* o  $2n=64$  e 66, respectivamente. Essa diversidade de número diploide e fórmulas cariotípicas nessa subfamília são resultantes de rearranjos Robertsonianos e não Robertsonianos, principalmente as inversões (Rosa *et al.* 2012; Ferreira *et al.* 2014; Primo *et al.* 2016; Marajó *et al.* 2022; Glugoski *et al.* 2023). Contudo, o número diploide ancestral da família ainda é uma incógnita, mas  $2n=54$  é considerado, por muitos autores, como o número ancestral, ou seja, plesiomórfico de Loricariidae. Essa hipótese é estabelecida pelo fato desse número ocorrer com frequência nas espécies do grupo irmão, Trichomycteridae, e nas subfamílias Hypostominae, Hypoptopomatinae e Loricariidae (Loricariinae) (Artoni e Bertollo 2001; Kavalco *et al.* 2005; Alves *et al.* 2012; Rosa *et al.* 2012; Ziemniczak *et al.* 2012; Ferreira *et al.* 2014; Takagui *et al.* 2014; 2020; Benitez *et al.* 2016; Venturelli *et al.* 2021; Marajó *et al.* 2022).

Dentro de Loricariinae, as espécies dos gêneros pertencentes ao grupo morfológico *Loricariichthys* (no qual *P. laeviuscula* está inserido), um dos clados da tribo Loricariini proposto por Covain *et al.* 2016 (Figura 6) e corroborado por Roxo *et al.* (2019) apresentam

uma predominância de  $2n=54$ , com exceção de *Hemiodontichthys acipenserinus*, para a qual foram encontrados dois números diploides ( $2n=46$  e  $58$ ) (Carvalho *et al.* 2018) e *Loricariichthys maculatus* (Bloch 1794) com  $2n=56$  (Fenocchio *et al.* 2003). *P. laeviscula* ( $2n=54$ ) tem o mesmo número diploide encontrado nas espécies *Loricariichthys anus*, *Loricariichthys platymetopon* e *Loricariichthys rostratus* Reis & Pereira, 2000, porém, as fórmulas cariotípicas são distintas, indicando a presença de rearranjos não robertsonianos. Uma diferença marcante é a presença de cromossomos subtelocêntrico (st) em *P. laeviscula*, que não é vista em *L. anus* e em algumas populações de *L. platymetopon* (Tabela 2), prevalecendo um maior número de cromossomos acrocêntricos em todas as espécies deste grupo.

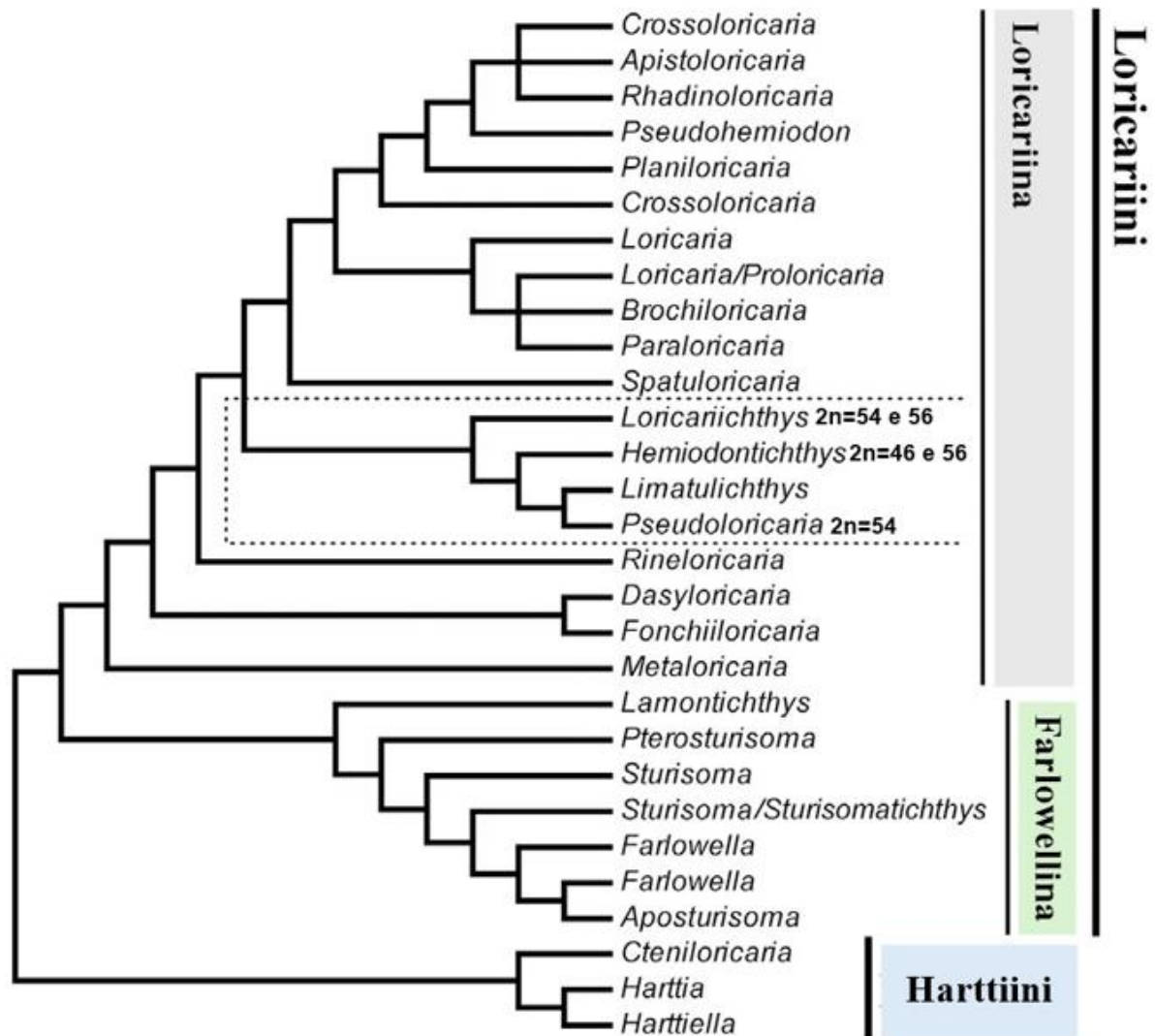


Figura 6. Classificação da subfamília Loricariinae proposta por Covain *et al.* 2016 em destaque o grupo *Loricariichthys* e os respectivos números diploides encontrados. Fonte: Adaptado de Roxo *et al.* 2019.

Considerando que  $2n=54$  seja o número diploide ancestral para Loricariidae e que *P. laeviuscula* possui essa característica, acredita-se que as inversões pericêntricas tenham sido o principal rearranjo na diversidade cariotípica interespecífica, originando diferentes fórmulas cariotípicas e mantendo esse número diploide no grupo *Loricariichthys*, por exemplo, em *L. anus*, *L. platymetopon*, *L. rostratus* e *P. laeviuscula*. Enquanto, as fissões cêntricas teriam originado os cariótipos com  $2n=56$  e  $2n=58$  em *L. maculatus* e *H. acipenserinus*, respectivamente; e que eventos de fusão teriam originado o cariótipo com  $2n<54$  em *H. acipenserinus* com  $2n=46$  (Fenocchio *et al.* 2003, Takagui *et al.* 2014; 2020; Motter 2016; Carvalho *et al.* 2018).

Entretanto, no presente trabalho não foi possível a coleta de exemplares de *P. laeviuscula* em toda a sua distribuição (Figura 3), o que ainda poderá nos trazer surpresas, pois um gênero monotípico, amplamente distribuído, pode ter na verdade a sua diversidade subestimada, como observado em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes) que, apesar da uniformidade morfológica e distribuição geográfica abrangente, os dados citogenéticos indicam a existência de sete cariomorfos, diferindo no número diploide, na morfologia cromossômica e em sistemas de cromossomos sexuais (Bertollo *et al.* 2000; Vicari *et al.* 2005; Cioffi *et al.* 2009; Sember *et al.* 2018; Ibagón *et al.* 2020). Analisando essa possibilidade com um grupo mais relacionado ao gênero *Pseudoloricaria*, pode-se destacar a espécie *Hemiodontichthys acipenserinus*, um gênero monotípico, Carvalho *et al.* (2018) verificaram a existência de quatro Unidades Evolutivas Independentes (*Hemiodontichthys* do Rio Madeira, *Hemiodontichthys* sp. 1 do Igarapé São Francisco no Rio Purus, *Hemiodontichthys* sp. 2 do Rio Iquiri no Rio Purus e *Hemiodontichthys* sp. 3 dos rios Araguaia, Tapajós e Guamá), detectadas por DNA *barcoding* e *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC), evidenciando que o gênero abriga um “complexo de espécies”. Este complexo proposto pelos autores foi corroborado pelos diferentes padrões citogenéticos, encontrados entre duas populações do Rio Purus, enfatizando o *status* não monotípico do gênero. Ambos os casos apresentados de *H. malabaricus* e *H. acipenserinus* nos levam a não descartar a possibilidade do gênero *Pseudoloricaria* não ser monotípico e abrigar mais espécies além de *P. laeviuscula*.

Um outro aspecto analisado em *P. laeviuscula* foi o padrão da heterocromatina, que em Loricariinae é bem característico, com a presença de poucos e pequenos blocos heterocromáticos, distribuídos aleatoriamente, sendo considerado um caráter plesiomórfico para o grupo, visto em diversos gêneros, tais como *Harttia*, *Farlowella*, *Loricaria*,

*Rineloricaria*, *Loricariichthys*, dentre outros (Kavalco *et al.* 2005; Maia *et al.* 2010; Fernandes *et al.* 2012; 2015; Ziemniczak *et al.* 2012; Blanco *et al.* 2017; Takagui *et al.* 2014; 2020; Sassi *et al.* 2020; Venturelli *et al.* 2021). Porém, apesar dos poucos blocos e da distribuição aleatória, a heterocromatina dessas espécies evidencia características cromossômicas particulares, onde cada espécie apresenta um padrão único e exclusivo, por exemplo, em *Loricaria simillima* o bandejamento C revelou bandas pericentroméricas geralmente fracas, com marcação forte e conspícua somente em dois pares cromossômicos (Benitez *et al.* 2016); enquanto em *P. laeviuscula* alguns pares se destacam por apresentarem heterocromatinização completa dos braços curtos (par 8sm) e marcações nas regiões terminais dos braços longos (pares 18, 19 e 26 acrocêntricos).

Em *P. laeviuscula*, a presença de um par com braços curtos totalmente heterocromáticos (8sm) pode ser atribuída à duplicação *in tandem*, sendo significativa, uma vez que a heterocromatina desempenha um papel relevante na evolução cromossômica das espécies (Guerra 1988; Kavalco *et al.* 2005). Em relação à presença de marcações nas regiões terminais dos braços longos (18, 19 e 26 acrocêntricos), tal padrão também foi verificado em algumas espécies da tribo Harttiini e subtribo Farlowellina, os clados basais da subfamília Loricariinae (Kavalco *et al.* 2004; Fernandes *et al.* 2015; 2021; Blanco *et al.* 2014; 2017; Marajó *et al.* 2018; Sassi *et al.* 2021), sugerindo assim, que *P. laeviuscula*, embora esteja num clado considerado derivado (Figura 6), ainda guarda caracteres cariotípicos dos grupos basais.

Um outro caráter considerado plesiomórfico em Loricariidae é a Região Organizadora de Nucléolo (RON) simples e intersticial, também encontrada em *P. laeviuscula* (Oliveira e Gosztonyi 2000; Kavalco *et al.* 2005; Alves *et al.* 2012; Ziemniczak *et al.* 2012). Porém, existe uma variação quanto à localização no cromossomo e sua posição no cariótipo, em relação às demais espécies do grupo *Loricariichthys*, pois em *P. laeviuscula*, a RON está localizada em um cromossomo ST e nas espécies *L. anus*, *L. platymetopon* e *L. rostratus* está em cromossomos acrocêntricos, semelhante ao encontrado em espécies de Harttiini. A localização/posição da RON, como já sabido, pode trazer muitas informações que podem ser utilizadas como características citotaxonômicas diagnose de espécies ou populações (Martins *et al.* 2004; Kasahara 2009; Molina e Jacobina 2013).

Ao compararmos a RON de *P. laeviuscula* com o padrão descrito para as espécies do gênero *Loricariichthys* pode-se sugerir que a RON intersticial em um ST pode ser resultado de uma inversão pericêntrica a partir de uma RON situada em um par acrocêntrico, levando em

consideração que em algumas espécies do gênero *Harttia*, a RON encontra-se na região proximal do primeiro par de acrocêntricos, como em *Harttia longipinna* Langeani, Oyakawa & Montoya-Burgos, 2001, *Harttia gracilis* Oyakawa, 1993, *Harttia punctata* Rapp Py-Daniel & Oliveira, 2001, *Harttia torrenticola* Oyakawa, 1993 e *Harttia carvalhoi* Miranda Ribeiro, 1939, sendo esse padrão considerado conservado para este grupo de espécies, enquanto que a RON situada em cromossomos metacêntricos, como em *Harttia kronei* Miranda Ribeiro, 1908 e *Harttia absaberi* Oyakawa, Fichberg & Langeani, 2013, são sugeridas como resultado de inversões pericêntricas (Centofante *et al.* 2006; Rodrigues 2010; Blanco *et al.* 2012; 2014; 2017).

Diferente do padrão sintênico de DNAr 18S e 5S, considerado plesiomórfico em Loricariidae (Mariotto *et al.* 2011; Ziemniczak *et al.* 2012; Blanco *et al.* 2017; Takagui *et al.* 2020) e observado em espécies de *Harttia* e *Farlowella* (Centofante *et al.* 2006; Blanco *et al.* 2013; 2017; Deon *et al.* 2020; Fernandes *et al.* 2021), *P. laeviuscula* apresenta os sítios de DNAr 18S e 5S em pares cromossômicos distintos, como um caráter derivado. A não sintenia dos genes ribossômicos em peixes é tida como uma vantagem evolutiva, pois evita a ocorrência de possíveis rearranjos desvantajosos entre estes sítios, que poderiam ser mais suscetíveis em regiões de sintenia (Martins e Galetti Jr. 1999; 2001; Martins 2007).

O sítio de DNAr 5S em *P. laeviuscula* também é simples, localizado num par acrocêntrico médio em região pericentromérica, padrão diferente daquele encontrado nos demais gêneros de Loricariinae (Tabela 2), visto que a maioria está em posição terminal ou intersticial. O gene ribossomal 5S possui grande variabilidade, tanto em número de sítios quanto na posição que ocupam nos cromossomos, em Loricariinae, pode ser simples como em *P. laeviuscula*, *L. rostratus*, *H. kronei* (Motter 2016; Blanco *et al.* 2017) quanto múltiplos como em *L. platymetopon*, *Rineloricaria cadeae* (Hensel, 1868), *Rineloricaria pentamaculata* Langeani & de Araujo, 1994 e *Farlowella hahni* Meinken, 1937 (Porto *et al.* 2011; Fernandes *et al.* 2021; Takagui *et al.* 2020; Venturelli *et al.* 2021). Considerando Loricariinae, onde o DNAr 5S é muito mais variável e instável do que o DNAr 18S, o qual apresenta relativa conservação em número de sítios, é possível que o DNAr 5S seja um excelente marcador citotaxômico, tanto para *P. laevisucula* quanto para as outras espécies de Loricariinae, como já vem sendo para algumas espécies de *Rineloricaria*, um gênero que apresenta grande diversidade cariotípica (Primo *et al.* 2016; Venturelli *et al.* 2021).



Outro marcador utilizado na descrição cariotípica de *P. laeviuscula* foi a sequência telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub>, que foi detectada apenas nas porções terminais de todos os cromossomos, assim como em *H. longipinna*, *H. punctata*, *H. gracillis*, *L. platymetopon*, *L. rostratus*, *R. capitonia*, *R. latirostris* (somente uma população) e *Spatuloricaria* sp. (Rodrigues 2010; Rosa *et al.* 2012; Blanco *et al.* 2012; 2014; 2017; Ferreira *et al.* 2014; Motter 2016; Primo *et al.* 2016). De modo geral, os estudos com a sequência telomérica são escassos e quando ocorrem destacam particularmente a ocorrência dos Sítios Teloméricos Intersticiais (ITS). Em *P. laeviuscula*, não foram detectadas ITS, o que pode indicar que possíveis repetições teloméricas situadas em locais de rearranjos cromossômicos tenham sido perdidas ao longo da evolução cromossômica (Ocalewicz 2013; Glugoski *et al.* 2018; Ferreira *et al.* 2021).

A análise citogenética, convencional e molecular, revela que *P. laeviuscula* é uma espécie com características cromossômicas consideradas conservadas em seu cariótipo, e, apesar das realocações taxonômicas e incertezas quanto a estar no gênero *Loricaria* ou *Pseudoloricaria*, o resultado aqui apresentado reforça a sua colocação no gênero *Pseudoloricaria*. Ainda, é mais relacionada com o grupo *Loricariichthys* do que com o grupo *Loricaria-Pseudohemiodon*, corroborando assim as análises filogenéticas de Rapp Py-Daniel (1997), Covain *et al.* (2016) e Roxo *et al.* (2019). O número diploide encontrado, até o presente momento, para *Loricaria* é  $2n=64$  (Porto *et al.* 2014a; Benitez *et al.* 2016; Takagui *et al.* 2020) e para o grupo *Loricariichthys* é predominantemente  $2n=54$  (Rodrigues 2010; Motter 2016; Takagui *et al.* 2014; 2020), fato que deve ser levado em conta, quando discutida a posição taxonômica de *P. laeviuscula* em Loricariinae, comparando dados moleculares e morfológicos.

Em relação à posição taxonômica de *Pseudoloricaria* ainda existem algumas incertezas quanto a ser basal ou derivada no grupo *Loricariichthys*. Rapp Py-Daniel (1997) em sua análise filogenética, baseada em caracteres morfológicos, propôs os gêneros *Pseudoloricaria* e *Limatulichthys* como grupo irmão de *Hemiodontichthyina* (no qual está inserido o grupo *Loricariichthys*), onde a espécie *P. laeviuscula* ocupa uma posição basal. Enquanto nas análises filogenéticas moleculares de Covain *et al.* (2016) (Figura 6) e Roxo *et al.* (2019) as espécies pertencentes ao gênero *Loricariichthys* compõem o clado basal e *Pseudoloricaria* e *Limatulichthys* (irmãos), os clado derivados dentro do grupo *Loricariichthys*. Entretanto, ambos os estudos não inseriram o gênero *Furcodontichthys*, que foi inserido na análise de Rapp Py-Daniel (1997).

Estudos adicionais são necessários para elucidar as incertezas filogenéticas deste grupo, porém os dados citogenéticos aqui apresentados corroboram que *P. laeviuscula* esteja situado em uma posição basal dentro do grupo *Loricariichthys* como proposto por Rapp Py-Daniel (1997). Todavia, investigações adicionais são necessárias para confirmar se o gênero *Loricariichthys* é basal ou se *Pseudoloricaria* ocupa de fato essa posição.

A primeira caracterização citogenética de *P. laeviuscula* aqui apresentada amplia os dados sobre a espécie em questão, colaborando quanto à apresentação de caracteres adicionais para o conhecimento de um táxon monotípico e contribui com informações citogenéticas para a subfamília Loricariinae. Ainda, os dados citogenéticos deste estudo têm o potencial de auxiliar na identificação de outras populações de *P. laeviuscula*, quando a ampliação das coletas for possível, e confirmar se *P. laeviuscula* compõe um gênero monotípico ou se a diversidade de *Pseudoloricaria* está subestimada.

## 6. Conclusões

O presente estudo buscou atingir seus objetivos, os quais foram delineados para uma compreensão mais profunda do gênero monotípico *Pseudoloricaria* (*P. laeviuscula*) e suas implicações na taxonomia evolutiva. A análise da macroestrutura cariotípica de *P. laeviuscula* revelou a conservação do número diploide ( $2n=54$ ), do padrão de bandejamento C e da Região Organizadora de Nucléolos (RON), situando a espécie em um contexto plesiomórfico dentro da família Loricariidae. Porém, pelos marcadores do DNAr 18S e 5S esta espécie não apresentou sintenia destes sítios, o que para a família é um caráter derivado.

Os dados citogenéticos indicam que os principais mecanismos evolutivos ocorreram por meio de rearranjos não-Robertsonianos, como a inversão pericêntrica, padrão já observado em espécies do grupo *Loricariichthys*, do qual *P. laeviuscula* faz parte dentro de Loricariinae.

A abordagem citogenética em exemplares de *P. laeviuscula* de uma localidade do Rio Negro na Amazônia oferece uma base para investigações futuras, sublinhando a necessidade de uma revisão taxonômica profunda no gênero, principalmente com a ampliação das coletas em toda sua distribuição, uma vez que um gênero monotípico, amplamente distribuído, pode tratar-se de um gênero com a biodiversidade subestimada.

## 7. Referências

- Albert, J.S.; Tagliacollo, V.A.; Dagosta, F. 2020. Diversification of Neotropical freshwater fishes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 51: 27-53.
- Almeida, B.R.R.; Souza, L.F.; Alves, T.A.; Cardoso, A.L.; Oliveira, J.A.; Ribas, T.F.A.; et al. 2023. Chromosomal organization of multigene families and meiotic analysis in species of Loricariidae (Siluriformes) from Brazilian Amazon, with description of a new cytotype for genus *Spatuloricaria*. *Biology Open* bio-060029.
- Alves, A.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2003. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia* 1: 57-63.
- Alves, A.L.; Borba, R.S.; Pozzobon, A.P.B.; Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado, A.; et al. 2012. Localization of 18S ribosomal genes in suckermouth armoured catfishes Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) with discussion on the Ag-NOR evolution. *Comparative Cytogenetics* 6(3): 315–321.
- Angulo-Olmos, G.; Álvarez-Pliego, N.; Sánchez, A. J.; Florido, R.; Salcedo, M.A.; Garrido-Mora, A.; Cruz-Rámirez, A.K. 2023. Microfibers in the gut of invasive armored catfish (*Pterygoplichthys* spp.) (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae) in an urban lake in the floodplain of the Grijalva River basin, Mexico. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 53: 81–88.
- Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Bertollo, L.A.C. 2000. Citogenética de Peixes Neotropicais: Métodos, Resultados e Perspectivas. *Publicatio UEPG- Biological and Health Sciences* 6(1)43-60.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 2001. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134: 201-210.
- Benitez, M.F.; Pastori, M.C.; Garrido, G.G.; Takagui, F.H.; Giuliano-Caetano, L.; Fenocchio, A.S. 2016. First cytogenetic characterization of *Loricaria simillima* (Loricariidae, Siluriformes) from Parana River (Argentina) with emphasis in cytotaxonomy of *Loricaria*. *Caryologia* 70: 29-33.
- Bertollo, L.A.C.; Born, G.G.; Dergam, J.A.; Fenocchio, A.S.; Moreira-Filho, O. 2000. A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research* 8: 603-613.
- Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.L.; Meier, R.; Winker, K.; et al. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecology Evolution* 22: 148–155.
- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Traldi, J.B.; Moreira-Filho, O. 2012. Chromosomal characterization of armored catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): First report of B chromosomes in the genus. *Zoological Science* 29(9): 604-609.

- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Lui, R.L.; Bertollo, L.A.C.; Traldi, J.B.;Moreira-Filho, O. 2013. The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX<sub>1</sub>XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 23:127–134
- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Lui, R.L.; Artoni, R.F.; de Almeida, M.C.; Traldi, J.B.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. 2014. Origin of the X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetic* 142(2): 119-12.
- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Lui, R.L.; Traldi, J.B.; Bueno, V.; Martinez, J.D.F.; Moreira-Filho, O. 2017. Karyotype diversity and evolutionary trends in armored catfish species of the genus *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish* 14(2): 169-176.
- Brammer, S.P. 2003. *A citogenética na caracterização genômica do trigo*. 1ª ed. Embrapa Trigo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, RS. 8p.
- Burghausen, J.H.; Rodrigues, G.Z.P.; Staudt, L.B.M.; Kayser, J.M.; Souza, M.S.; Borba, D. J.; et al. 2023. Evaluation of the use of *Ancistrus brevipinnis* (Loricariidae) as a bioindicator of water quality in the Ilha River, RS, Brazil. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 45(1): e62305.
- Caldas, L.; Cherobim, A.M.; Langeani, F. 2022. A new species of *Harttia* from the rio São Francisco basin (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology* 20(4): e220051.
- Cardoso, A.; Pieczarka, J.; Feldberg, E.; Milhomem, S.; Moreira-Almeida, T.; Silva, D.; Silva, P.; et al. 2011. Chromosomal characterization of two species of genus *Steatogenys* (Gymnotiformes: Rhamphichthyoidea: Steatogenini) from the Amazon basin: Sex chromosomes and correlations with Gymnotiformes phylogeny. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21: 613–621
- Carneiro, J.; Dutra, G.M.; Nobre, R.M.; Pinheiro, L.M.L. 2020. Evidence of cryptic speciation in South American lungfish. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 00: 1–12.
- Carvalho, M.L.C.; Silva, G.J.C.; Melo, S.; Ashikaga, F.Y.; Shimabukuro-Dias, C.K.; Scacchetti, P.C.; et al. 2018. The non-monotypic status of the Neotropical fish genus *Hemiodontichthys* (Siluriformes, Loricariidae) evidenced by genetic approaches. *Mitochondrial DNA Part A* 29: 1-7.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C. Moreira-Filho, O. 2006. Cytogenetic characterization and description of an XX<sub>1</sub>XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Research* 112: 320–324
- Cerca, J.; Rivera-Colón A.G.; Ferreira, M.S.; Ravinet, M.; Nowak, M.D.; Catchen, J.M.; et al. 2021. Incomplete lineage sorting and ancient admixture, and speciation without morphological change in ghost-worm cryptic species. *PeerJ* 9: e10896.

- Cioffi, MB; Centofante, L.; Jacobina, U.; Bertollo, L.A.C. 2009. Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenet Genome Research* 125: 132–141.
- Cioffi, M.B.; Moreira-Filho, O.; Ráb, P.; Sember, A.; Molina, W.F.; Bertollo, L.A.C. 2018. Conventional cytogenetic approaches—useful and indispensable tools in discovering fish biodiversity. *Current Genetic Medicine Reports* 6: 176-186.
- Covain, R.; Fisch-Muller, S. 2007. The genera of Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae): a practical key and synopsis. *Zootaxa* 1462: 1-40.
- Covain, R.; Fisch-Muller, S.; Oliveira, C.; Mol, J.H.; Montoya-Burgos, J.I.; Dray, S. 2016. Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveal sin congruences with morphological classification. *Molecular phylogenetics and evolution* 94: 492- 517.
- Covain, R.; Sleen, P.V.D. 2017. Subfamily Loricariinae – Loricariine armored catfishes. In: Sleen, P.V.D.; Alberts, J.S. (Ed.1). *Field guide to the fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas*. Princeton University Press. Princeton. p. 290-299.
- Dagosta, F.C.; Pinna, M. 2019. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 431: 1-163.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- Deon, G.A.; Glogoski, L.; Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Sassi, F.M.C.; Cioffi, M.B.; et al. 2020. Highly rearranged karyotypes and multiple sex chromosome systems in armored catfishes from the genus *Harttia* (Teleostei, Siluriformes). *Genes* 11: 1366
- Dias, A.C.; Zawadzki, C.H. 2021. *Hypostomus hermannire* description and a new species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from Upper Paraná River basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 19(2): e200093.
- Dopazo, M.; Wosiacki, W.B.; Britto, M. 2023. New species of *Farlowella* (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Tapajós basin, Pará, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 21(1): e22009.
- Fenocchio, A.S.; Pastori, M.C.; Roncati, H.A.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. 2003. A cytogenetic survey of the fish fauna from Argentina. *Caryologia* 2: 197–204.
- Fernandes, C.A; Damásio, J.F; Martins-Santos, I.C. 2012. Cytogenetic studies in species of family Loricariidae (Osteichthyes, Siluriformes) from Iguatemi River basin, Brazil. First cytogenetic report in *Farlowella amazonum* (Günther, 1864). *Caryologia* 65(4): 276–280.
- Fernandes, C.A.; Alves, D.S.; Guterres, Z.R.; Martins-Santos, I.C. 2015. Cytogenetic analysis of two locariid species (Teleostei, Siluriformes) from Iguatemi River (Paraná River drainage) in Brazil. *Comparative cytogenetics* 9(1): 67-78.

- Fernandes, C.A.; Paiz, L.M.; Piscor, D. Gavazzoni, M. Carvalho, L.A.B.; Portela-Castro, A.L.; et al. 2021. Chromosomal diversity in two allopatric populations of *Farlowella hahni* Meinken 1937 (Teleostei: Siluriformes): cytogenetics and cytochrome b analyses. *Zebrafish* 18 (1): 66-72
- Ferraris Jr, C.J. 2003. Subfamily Loricariinae (armored catfishes). In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Eds). *Checklis to the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 330-350.
- Ferreira, R.O.; Pereira, A.L.; Nagamachi, C.Y.; Pieczarka, J.C.; de Sousa, L.M.; Noronha, R.C.R. 2014. Caracterização citogenética de uma espécie de *Spatuloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Xingu (Pará, Amazônia, Brasil). *Biota Amazônia* 4(1): 30-36.
- Ferreira, A.M.V.; Viana, P.F.; Zuanon, J.; Ezaz, T.; Cioffi, M. B.; Takagui, F. H.; et al. 2021. Cytogenetic analysis of *Panaqolus tankei* Cramer & Sousa, 2016 (Siluriformes, Loricariidae), an ornamental fish endemic to Xingu River, Brazil. *Cytogenetics Genome Research* 161:187–194.
- Fichberg, I.; Oyakawa; O.T.; Pinna, M. 2014. The endofan almost 70-year wait: A new species of *Spatuloricaria* (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Xingu and Rio Tapajós basins. *Copeia* 2: 317–324.
- Fricke, R.; Eschmeyer, W.N.; Fong, J.D. 2023. Eschmeyer’s Catalog of Fishes: Genera, Species, References. (<http://researcharchie.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Acessado em 18 de setembro de 2023.
- Fricke, R.; Eschmeyer, W.N.; Fong, J.D. 2024. Eschmeyer’s Catalog of Fishes: Genera, Species, References. (<http://researcharchie.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Acessado em 04 de janeiro de 2024.
- Giuliano-Caetano, L. 1998. *Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae). Tese, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), Brasil, 78p.
- Glugoski, L.; Giuliano-Caetano, L.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R.; Nogaroto, V. 2018. Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. *Gene* 650: 49–54.
- Glugoski, L.; Deon, G.A.; Nogaroto, V.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. 2023. Robertsonian fusion site in *Rineloricaria pentamaculata* (Siluriformes: Loricariidae): involvement of 5S rDNA and satellite sequences. *Cytogenet Genome Research* 162(11-12): 657–664.
- Gold, J.R.; Li, C.; Shipley, N.S.; Powers, P.K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology* 37: 563-575.

- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology* 76: 1117-1127.
- Guerra, M.S. 1988. *Introdução à Citogenética geral*. 2ª ed. Editora Guanabara, Rio de Janeiro. 142p.
- Guerra, M. 2004. *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. 1ª ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto. 184p.
- Guerra, M.; Souza, M.J. 2002. *Como observar cromossomos: Um guia de técnicas*. 1ª ed. Funpec, 131p.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014–1015.
- Ibagón, N.; Maldonado-Ocampo, J.A.; Cioffi, M.d.B.; Dergam, J.A. 2020. Chromosomal diversity of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) along the Magdalena River (Colombia—Northern South America) and its significance for the Neotropical region. *Zebrafish* 17: 211–219.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19(17): 4780.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). 2022. *Pseudoloricaria laeviuscula*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2022* (<https://www.iucnredlist.org/species/140707816/140707826#bibliography>). Acessado em 12 janeiro de 2024.
- Isbrücker, I.J.H.; Nijssen, H. 1974. On *Hemiodontichthys acipenserinus* and *Reganella depressa*, two remarkable mailed catfishes from South America (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Beaufortia* 25(325):107-129.
- Isbrücker, I.J.H.; Nijssen, H. 1976. The South American mailed catfishes of the genus *Pseudoloricaria* Bleeker, 1862 (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Beaufortia* 25: 107–129.
- Isbrücker, I.J.H. 1979. Description préliminaire de nouveaux taxa de la famille des Loricariidae, poissons-chats cuirassés néotropicaux, avec un catalogue critique de lasous-famille nominale (Pisces, Siluriformes). *Revue Française d'Aquariologie et Herpetologie* 5: 86-116.
- Isbrücker, I.J.H. 1981. Revision of *Loricaria* Linnaeus, 1758 (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Beaufortia* 31(3): 51–96.
- Junqueira, L.C.; Carneiro, J. 2012. *Biologia Celular e Molecular*. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 376p.



- Karanovic, T.; Djurakic, M.; Eberhard, S.M. 2016. Cryptic species or inadequate taxonomy? Implementation of 2D geometric morphometrics based on integumental organs as landmarks for delimitation and description of copepod taxa. *Systematic Biology* 65: 304–327.
- Kasahara, S. 2009. *Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. 1ªed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 160p.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 2004. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas* 141(3): 237-242.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94: 180- 186.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Londoño-Burbano, A.; Reis, R.E. 2021. A combined molecular and morphological phylogeny of the Loricariidae (Siluriformes: Loricariidae), with emphasis on the Harttiini and Farlowellini. *Plos One* 16(3): e0247747.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. 2012. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87(7): 433-438.
- Lujan, N.K.; Armbruster, J.W.; Lovejoy, N.R.; López-Fernández, H. 2015. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82: 269-288.
- Lujan, N.K.; Armbruster, J.W.; Werneke, D.C.; Teixeira, T.F.; Lovejoy, N.R. 2020. Phylogeny and biogeography of the Brazilian–Guiana Shield endemic Corymbophanes clade of armoured catfishes (Loricariidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 188: 1213–1235.
- Maia, T.P.A.; Giuliano-Caetano, L.; Rodrigues, M.; Rubert, M.; Takagui, F.H.; Dias, A.L. 2010. Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). *Ichthyological Research* 57: 209-213.
- Malabarba, L. R.; Malabarba, M. C. 2020. Phylogeny and classification of Neotropical fish. In: Baldissarroto, B.; Urbinati, E. C.; Cyrino, J. E. P. (Eds.). *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Academic Press, Cambridge. p.1-19.
- Marajó, L.; Viana, P. F.; Ferreira, M.; Py-Daniel, L. H.R.; Feldberg, E. 2018. Cytogenetics of two *Farlowella* species (Loricariidae: Loricariinae): implications on the taxonomic status of the species. *Neotropical Ichthyology* 16: 1–8
- Marajó, L.; Viana, P.F.; Ferreira, A.M.V.; Py-Daniel, L.H.R.; Cioffi, M.B.; Sember, A. et al. 2022. Chromosomal rearrangements and the first indication of an ♀X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/♂X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y

- sex chromosome system in *Rineloricaria* fishes (Teleostei: Siluriformes). *Journal of Fish Biology* 102: 443-454.
- Mariotto, S.; Centofante, L.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. 2011. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comparative Cytogenetics* 5: 289–300.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* Fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7: 363-367.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: Two different genomic locations are characterized by distinct non transcribed spacers. *Genome* 44: 903-910.
- Martins, C.; Oliveira, C.; Wasko, A.P.; Wright, J.M. 2004. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - a review. *Aquaculture* 231(1): 37-49.
- Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (Eds). *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, Enfield. p.421–453.
- Mejia, E.; Ferraro, G.A.; Buckup, P.A. 2023. A new species of *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae) from coastal drainages of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 21(1): e220083.
- Molina, W.F.; Jacobina, U.P. 2013. Protocolos citogenéticos e perspectivas biotecnológicas voltadas à piscicultura marinha e conservação. *Biota Amazônica* 6: 70-75.
- Montoya-Burgos, J.I.; Fisch-Muller, S.; Weber, C.; Pawlowski, J. 1998. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre. p. 363-375.
- Morrone, J.J. 2018. *Evolutionary biogeography of the Andean region*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton. 250p.
- Motter, S.P.B. 2016. *Estudos comparativos entre populações de Loricariichthys rostratus (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae) coletadas à montante e à jusante das Cataratas do Iguaçu: aspectos citogenéticos, genético-moleculares e reprodutivos*. Dissertação, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Brasil, 39. (<https://tede.unioeste.br/handle/tede/6588>).
- Nelson, J.S.; Grande, T.C.; Wilson, M.V.H. 2016. *Fishes of the world*. (5<sup>a</sup> ed). Wiley, New York. 130p.
- Nirchio, M.; Oliveira, C.; Cioffi, M. B.; Sassi, F.M.C.; Valdiviezo, J.; Paim, F.G.; et al. 2023. Occurrence of sex chromosomes in fish of the genus *Ancistrus* with a new description of

- multiple sex chromosomes in the Ecuadorian endemic *Ancistrus clementinae* (Loricariidae) *Genes* 14: 306- 318.
- Ocalewicz, K. 2013. Telomeres in fishes. *Cytogenetic and Genome Research* 141(2- 3): 114-125.
- Ohara, W.M. 2010. *Revisão Taxonômica dos Gêneros Pseudoloricaria Bleeker, 1862 e Limatulichthys Isbrücker & Nijssen, 1979 (Siluriformes: Loricariidae)*. Dissertação, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Brasil, 129p.
- Oliveira, C.; Gosztonyi, A.E. 2000. A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriformes. *Caryologia* 53(1): 31–37.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A. 1988. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia* 41: 227-236.
- Oliveira, R.R.; Zuanon, J.; Py-Daniel, L.H.R.; Birindelli, J.L.O.; Sousa, L.M. 2021. Taxonomic revision of *Hopliancistrus* Isbrücker & Nijssen, 1989 (Siluriformes, Loricariidae) with redescription of *Hopliancistrus tricornis* and description of four new species. *Plos One* 16(1): e0244894.
- Paula, G.B.N.; Gavazzoni, M.; Zawadzki, C.H.; Fernandes, C.A.; Portela-Castro, A.L.B.; Lui, R.L.; et al. 2022. Identification of cryptic species in allopatric populations of *Hypostomus tietensis* (Siluriformes: Loricariidae) through cytogenetics analyses. *Neotropical Ichthyology* 20(2): e210158.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the Natural Academy of Science* 83: 2934-2938.
- Porto, F.E.; Portela-Castro, A.L.B.; Martins-Santos, I.C. 2011. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná River Basin. *Ichthyological Research* 58(3): 225-231.
- Porto, F.E.; Gindri, B.S.; Vieira, M.M.R.; Borin, L.A.; Portela-Castro, A.L.B.; Santos, I.C.M. 2014a. Polymorphisms of the nucleolus organizing regions in *Loricaria cataphracta* (Siluriformes, Loricariidae) of the upper Paraguay River basin indicate an association with transposable elements. *Genetics and Molecular Research* 13(1): 1627-1634.
- Porto, F.E.; de Rossi Vieira, M.M.; Barbosa, L.M.; Borin-Carvalho, L.A.; Vicari, M.R.; de Brito Portela-Castro, A.L.; Martins-Santos, I.C. 2014b. Chromosomal polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of fusions and their consequences in the population. *Zebrafish* 11(4): 318-324.
- Pozzobon, M.T.; Peñaloza, A.P.S.; Santos, S. 2010. *Manual de curadores de Germnoplasmata - Vegetal: Caracterização Citogenética e Reprodutiva*. Embrapa, Documentos 313, Brasília. 14p.

- Primo, C.C.; Glugoski, L.; Almeida, M.C.; Zawadzki, C.H.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R.; Nogaroto, V. 2016. Mechanisms of chromosomal diversification in species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish* 14: 161–168.
- Primo, C.C.; Glugoski, L.; Vicari, M.R.; Nogaroto, V. 2018. Chromosome mapping and molecular characterization of the Tc1/Mariner element in *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae). *Brazil Archives Biology Technology* 61: e18170623.
- Ráb, p.; Bohlen, J.; Rabová, M.; Flajshans, M.; Kalous, L. 2007. Cytogenetics as a tool box in fish conservation: The current situation in Europe. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (Eds.) *Fish Cytogenetics*. Enfield, p. 215-241.
- Rapp Py-Daniel, L.H.R. 1997. Phylogeny of the Neotropical armored catfishes of the subfamily Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae). Doctoral thesis. Arizona University, U.S.A., 280p.
- Rapp Py-Daniel, L.H.R.; Cox-Fernandes, C. 2005. Dimorfismo sexual em Siluriformes e Gymnotiformes (Ostariophysi) da Amazônia. *Acta Amazonica* 35: 97-110.
- Rapp Py-Daniel, L.H.R.; Ohara, W.M. 2013. Loricariinae. In: Queiroz, L.J.; Vilara, G.T.; Ohara, W.M.; Pires, T.H.S.; Zuanon, J.; Doria, C.R.C. (Eds). *Peixes do Rio Madeira*. São Paulo, p.224-301
- Reis, R.E.; Lehmann, A. P. 2022. A new genus of armored catfish (Siluriformes: Loricariidae) from the Greater Amazon, with a review of the species and description of five new species. *Neotropical Ichthyology* 20(2): e220002.
- Rodrigues, R.M. 2010. *Estudos cromossômicos em Loricariinae com ênfase em espécies de Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma abordagem evolutiva. Dissertação, Universidade de São Paulo (USP), Brasil, 241p. (<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-17122010-104716/pt-br.php>).
- Rosa, K.O.; Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Nogaroto V.; Almeida, M.C.; et al. 2012. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusions points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Reviews Fish Biology and Fisheries* 22(3): 739-749.
- Roxo, F.F.; Zawadzki, C.H.; Alexandrou, M.A.; Costa Silva, G.J.; Chiachio, M.C. 2019. Evolutionary and biogeographic history of the subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Ecology and Evolution* 2: 2438-2449.
- Santos, K.F. 2022. *Estudo citogenético de quatro espécies de peixes da família Loricariidae, coletados em diferentes localidades da Bacia do Paranapanema*. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Brasil, 88p.
- Sassi, F.M.C.; Deon, G.A.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R.; Bertollo, L.A.C.; Liehr, T.; et al. 2020. Multiple sex chromosomes and evolutionary relationships in Amazonian catfishes: The outstanding model of the genus *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae). *Genes* 11: 1179.

- Sassi, F.M.C.; Moreira-Filho, O.; Deon, G.A. Sember, A.; Bertollo, L.A.C.; Liehr, T. et al. 2021. Adding new pieces to the puzzle of karyotype evolution in *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae): Investigation of Amazonian species. *Biology* 10: 922. <https://doi.org/10.3390/biology10090922>.
- Scavone, M.D.P.; Júlio Jr., H.F. 1994. Cytogenetic analysis and probable supernumerary chromosomes of *Loricaria prolixa* and *Loricaria* sp. females (Loricariidae-Siluriformes) from the Paraná River basin. *Rev Ictiol.* 2: 41–47.
- Scavone, M.D.P.; Júlio Jr., H.F. 1995. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). *Revista Brasileira de Genética* 18: 31–35.
- Schutze, M.K.; Massimiliano, V.; Norrbom, A.; Clarke, R. 2017. Tephritid integrative taxonomy: where we are now, with a focus on the resolution of three tropical fruit fly species complexes. *Annual Review of Entomology* 62: 147–64.
- Sember, A.; Bertollo, L.A.C.; Ráb, P.; Yano, C.F.; Hatanaka, T.; de Oliveira, E.A.; Cioffi, M.B. 2018. Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Frontiers in Genetics* 9: 71.
- SiBBr. 2024. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. Informações sobre *Pseudoloricaria laeviuscula*. (<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/172788>). Acessado em 12 janeiro de 2024.
- Silva, K.S.; Souza, A.C.P.; Pety, A.M.; Noronha, R.C.; Vicari, M.R. Pieczarka, J.C.; et al. 2021. Comparative Cytogenetics analysis among *Peckoltia* species (Siluriformes, Loricariidae): Insights on karyotype evolution and biogeography in the Amazon Region. *Frontiers in Genetics* 12: 779464.
- Sleen, P.V.D.; Albert, J.S. 2017. *Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco & Guianas*. Princeton University Press, New Jersey. 464p.
- Sleen, P.V.D.; Covain, R. 2017. Subfamily Loricariinae- Loricariine Armored Catfishes. In: Sleen, P.V.; Albert, J.S. (Eds.). *Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco & Guianas*. Princeton University Press, New Jersey. 288-299p.
- Sochorová, S.; Garcia, S.; Gálvez, F.; Symonová, R.; Kovařík, A. 2018. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma* 127: 141-150.
- Souza, C.S.; Costa-Silva, J.G.; Roxo, F.F.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2018. Genetic and Morphological Analyses Demonstrate That *Schizolecis guntheri* (Siluriformes: Loricariidae) Is Likely to Be a Species Complex. *Frontiers in Genetic* 9:69.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating Centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Sun, Z.; Wang, S.; Zhang, M. Jiang, H.; Li, M.; 2023. Chronic toxicity study of ammonia exposure in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 567: 739266.

- Takagui, F.H.; Venturelli, N.B.; Dias, A.L.; Swarca, A.C.; Vicari, M.R.; Fenocchio, A.S.; Giuliano-Caetano, L. 2014. The importance of pericentric inversions in the karyotypic diversification of the species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys platymetopon*. *Zebrafish* 11(4): 300-305.
- Takagui, F.H.; Baumgartner, L.; Venturelli, N.B.; Paiz, L.M.; Viana, P.F.; Dionísio, J.F. et al. 2020. Unrevealing the karyotypic evolution and cytotaxonomy of armored catfishes (Loricariinae) with emphasis in *Sturisoma*, *Loricariichthys*, *Loricaria*, *Proloricaria*, *Pyxiloricaria*, and *Rineloricaria*. *Zebrafish* 17: 319-332.
- Takagui, F.H.; Baumgärtner, L.; Viana, P.F.; Lima, M.C.C.; Bitencourt, J.A.; Verene, P.C.; et al. 2022. Karyotype evolution of talking thorny catfishes *Anadoras* (Doradidae, Astrodoradinae): A process mediated by structural rearrangements and intense reorganization of repetitive DNAs. *Cytogenet Genome Reserch* 162: 64–75.
- Vari, R.P.; Malabarba, L.R. 1998. Neotropical Ichthyology: an overview. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre. p.1-11.
- Venturelli, N.B.; Takagui, F.H.; Pompeo, L.R.S.; Rodriguez, M.S.; Rosa, R.; Giuliano-Caetano, L. 2021. Cytogenetic markers to understand chromosome diversification and conflicting taxonomic issues in *Rineloricaria* (Loricariidae: Loricariinae) from Rio Grande do Sul coastal drainages. *Biologia* 76: 2561–2572.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 2005. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genetics and Molecular Biology* 28(1): 103-110.
- 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. 2012. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Italian Journal of Zoology* 79: 1-10.