
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Biologia Celular e Molecular)

RAFAEL SPLENDORE DE BORBA

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS, FILOGEOGRÁFICAS E DISCRIMINAÇÃO
MOLECULAR DE ESPÉCIES DE PEIXES DO GÊNERO *Ancistrus* KNER, 1854
(SILURIFORMES: LORICARIIDAE).**

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Biológicas. Área de Concentração:
Biologia Celular e Molecular.

Abril
2018

RAFAEL SPLENDORE DE BORBA

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS, FILOGEOGRÁFICAS E DISCRIMINAÇÃO
MOLECULAR DE ESPÉCIES DE PEIXES DO GÊNERO *Ancistrus* KNER, 1854
(SILURIFORMES: LORICARIIDAE).**

Orientadora: Patrícia Pasquali Parise-Maltempi

Co-orientadora: Sandra Mariotto

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Biológicas. Área de Concentração:
Biologia Celular e Molecular.

**RIO CLARO
2018**

597 Borba, Rafael Splendore de
B726r Relações filogenética, filogeográficas e discriminação
 molecular de espécies de peixes do gênero *Ancistrus* Kner,
 1854 (Siluriformes: Loricariidae) / Rafael Splendore de
 Borba. - Rio Claro, 2018
 93 f. : il., figs., tabs., mapas

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientadora: Patricia Pasquali Parise-Maltempi
 Coorientadora: Sandra Mariotto

 1. Peixe. 2. DNA mitocondrial. 3. DNA nuclear. 4.
 Estruturação genética. 5. Taxonomia. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RELAÇÕES FILOGENÉTICAS, FILOGEOGRÁFICAS E DISCRIMINAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Ancistrus* KNER, 1854 (SILURIFORMES: LORICARIIDAE) QUE COMPÕEM TRÊS BACIAS HIDROGRÁFICAS DO ESTADO DO

AUTOR: RAFAEL SPLENDORE DE BORBA

ORIENTADORA: PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

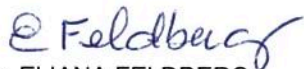
COORDINADORA: SANDRA MARIOTTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

Departamento de Biologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Profa. Dra. ELIANA FELDBERG

Laboratório de Citogenética / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia



Prof. Dr. EDSON LOURENÇO DA SILVA

x / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí



Dra. JOSI MARGARETE PONZETTO DO NASCIMENTO

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade / Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais



Profa. Dra. MARIA RITA DE CASCIA BARRETO NETTO

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade / Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais

Rio Claro, 13 de março de 2018

Título alterado para: “Relações filogenéticas, filogeográficas e discriminação molecular de espécies de peixes do gênero *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae)”

*Dedico este trabalho aos meus pais
que sempre acreditaram em mim e
foram sempre um exemplo de
respeito e tolerância*

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Silvia e Antonio, por todo apoio e confiança que depositaram em mim, por me ensinar o valor da ética, da integridade e da tolerância, e por me mostrar a importância de sempre dar o melhor de si em todas as suas escolhas. Também agradeço a todos meus familiares pelo apoio e por me aceitarem do jeito que sou e sempre serei.

Agradeço à Prof^a Dr^a Patrícia Pasquali Parise-Maltempi e à Prof^a Dr^a Sandra Mariotto pela orientação, conselhos e toda formação intelectual que me ofereceram.

Agradeço a Josi Ponzetto pela amizade e todo suporte técnico e intelectual que ofereceu e que foi essencial para a finalização desse trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2013/17826-9) pelo apoio financeiro cedido para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a todos os amigos do departamento, Luiza, Raquel, Marcelo, Carol, Matraca, Allison e Luís, pela amizade e ótima convivência, que tornou mais agradável todos esses dias de trabalho.

Agradeço as melhores travest* que você pode ter como amigas: Lu Crac*, Yura Lea Toria, LuCélia Regina, Pedrita, Cori e Alliça Boque*. Obrigado pelos roles (que ainda vão ser muitos), carnavais, forró, latic*, estrag* e chap*, amo muito vocês.

Aos amig@s Manu, Parça, Adna, Dae, Pam, Natalia, Danilo, Bia, Cau, pela convivência em quase todos os dias semana e que tornaram mais leve toda essa jornada.

“Algumas pessoas olham o mundo e perguntam: Porque?

Eu penso em coisa que nunca existiram e pergunto: Por que não?”

George Bernard Shaw



RESUMO

O gênero *Ancistrus* é um dos mais diversificados da tribo Ancistrini possuindo 64 espécies nominais. Estes peixes diferem dos outros loricariídeos pela ausência de placas e odontódeos na ponta do focinho, onde existem apenas pequenos tentáculos carnudos e odontódeos interoperculares bem desenvolvidos. O gênero é caracterizado por mostrar grande variabilidade citogenética com o número diploide variando de $2n=34$ e $2n=54$ cromossomos. *Ancistrus* também se apresenta amplamente distribuído nas bacias dos rios Uruguai, Paraguai e Amazônica, sendo que as duas últimas apresentam a maior diversidade de espécies e de cariótipos do gênero. Apesar destas características, o grupo ainda é conhecido por apresentar espécies de taxonomia duvidosa e de difícil identificação, de modo que as relações filogenéticas e os padrões filogeográficos, sobretudo na bacia dos rios Paraguai e Amazonas, ainda não foram revelados. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo discriminar as diferentes linhagens de *Ancistrus* provenientes das bacias Amazônica e do Paraguai e utilizando a ferramenta de “DNA barcoding”, bem como identificar as relações filogenéticas e filogeográficas dessas linhagens utilizando múltiplas sequências de DNA. Foram obtidas 146 sequências do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) que foram utilizadas na discriminação das linhagens. A análise de “DNA barcoding” mostrou a ocorrência de sete linhagens de *Ancistrus* na bacia Amazônica e oito na bacia do Paraguai. A técnica também revelou um alto valor de distância genética média entre estas linhagens (8,4%), o que indica um alto grau de isolamento genético entre as mesmas. Nas análises filogenéticas foram utilizadas 93 sequências concatenadas dos genes mitocondriais ATP sintetase subunidades 6 e 8 (ATPase 6/8) e o COI e sequências do gene nuclear Rag2, enquanto na análise filogeográfica foram utilizadas apenas as sequências do gene ATPase 6/8. Na topologia gerada pelo método Bayesiano foram distinguidos 3 clados, subdivididos em 21 grupos. Os clados mostram a ocorrência de uma relação monofilética entre parte das linhagens da bacia do rio Paraguai com as linhagens da bacia amazônica, e os 21 grupos identificados apresentam altos valores de distância genética média entre si (8,4%). Na rede de haplótipos foram observados oito grandes grupos: sete pertencentes a bacia do Paraguai e um correspondendo a bacia Amazônica, não havendo compartilhamento de haplótipos entre as duas bacias. Tais resultados indicam que *Ancistrus* forma uma unidade monofilética nas bacias Amazônica e do rio Paraguai, sendo que estas linhagens possuem alto grau de divergência e isolamento genético entre si. Isso corrobora a existência de espécies crípticas na região e aponta a necessidade de uma revisão taxonômica para o gênero nessas bacias.

Palavras chave: DNA mitocondrial, DNA nuclear, estruturação genética, taxonomia.

ABSTRACT

The *Ancistrus* genus is one of the most diverse of the Ancistrini tribe possessing 64 nominal species. These fishes differ from the other loricariids by the absence of plaques and odontodes at the tip of the muzzle, where there are only small fleshy tentacles and well-developed interopercular odontodes. The genus is characterized by showing great cytogenetic variability with the diploid number ranging from $2n = 34$ and $2n = 54$ chromosomes. *Ancistrus* is also widely distributed in the Uruguay, Paraguay and Amazon basins, with the latter two showing the greatest diversity of species and karyotypes of the genus. Despite these characteristics, the group is still known to present dubious taxonomy species that are difficult to identify, so that the phylogenetic relationships and phylogeographic patterns, especially in the Amazon and Paraguay basins, have not yet been revealed. In this sense, the present work aimed to discriminate the different *Ancistrus* lineages from the Amazon and Paraguay basins using the DNA barcoding tool, as well as to identify the phylogenetic and phylogeographic relationships of these lineages using multiple DNA sequences. 146 sequences of the Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene were obtained, which were used to discriminate the lineages. The analysis of DNA barcoding showed the occurrence of seven lineages of *Ancistrus* in the Amazon basin and eight lineages in the Paraguay basin. The technique also revealed a high average genetic distance among these lineages (8.4%), indicating a high level of genetic isolation among them. In the phylogenetic analyzes, 93 concatenated sequences of the mitochondrial ATP synthase subunits 6 and 8 (ATPase 6/8) and COI and sequences of the Rag2 nuclear gene were used, whereas in the phylogeographic analysis only the ATPase 6/8 gene sequences were used. In the topology generated by the Bayesian method, 3 clades were distinguished, subdivided into 21 groups. The clades show a monophyletic relationship among the lineages from Paraguay and Amazon basins, and the 21 identified groups present high average genetic distance (8.4%). In the haplotype network, eight large groups were observed: seven belonging to the Paraguay basin and one corresponding to the Amazon basin, and there was no haplotype sharing between the two basins. These results indicate that *Ancistrus* forms a monophyletic unit in the Paraguay and Amazon basins, and these lineages have a high level of divergence and genetic isolation among them. This corroborates the existence of cryptic species in these regions and points out the need for a taxonomic revision for the genus in Paraguay and Amazon basins.

Keywords: mitochondrial DNA, nuclear DNA, genetic structure, taxonomy.

SUMÁRIO

1.0- INTRODUÇÃO	7
1.1- FILOGEOGRAFIA E FILOGENIA DE PEIXES	7
1.2- IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES	10
1.3- BACIA AMAZÔNICA E BACIA DO PARAGUAI	12
1.4- ORDEM SILURIFORMES	15
1.5- FAMÍLIA LORICARIIDAE	16
1.6- TRIBO ANCISTRINI E GÊNERO <i>ANCISTRUS</i>	18
2.0- OBJETIVOS	24
2.1- OBJETIVO GERAL.....	24
2.2- METAS ESPECÍFICAS	24
3.0- MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1- MATERIAL.....	22
3.2- MÉTODOS.....	25
3.2.1- EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	28
3.2.2- AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO.....	30
3.2.3- ANÁLISES DE DISTÂNCIA GENÉTICA PARA O GENE COI	32
3.2.4- ANÁLISES FILOGENÉTICAS	32
3.2.5- ANÁLISES FILOGEOGRÁFICAS E POPULACIONAIS	33
4.0- RESULTADOS	34
4.1- CAPÍTULO I	35
4.2- CAPÍTULO II	57
5.0- CONCLUSÕES FINAIS	85
6.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Filogeografia e Filogenia de Peixes

A diversidade genética pode ser explicada pela existência de diferentes genótipos, o que garante um alto grau de variabilidade genética de uma população. Estes elementos conferem à espécie a habilidade para adaptação a um determinado ambiente (VILA et al., 1997; REYNOLDS et al., 2012). O conhecimento sobre o fluxo gênico e da estrutura genética, entre as populações naturais, tem importantes implicações não apenas na ecologia e biologia evolutiva, mas também para a conservação e gestão da biodiversidade (COWEN E SPONAUGLE, 2009).

A ictiofauna dulcícola da região Neotropical é a mais rica do mundo com mais de 5000 espécies descritas (REIS et al., 2016). O desenvolvimento dos sistemas de drenagens modernos foi o principal mecanismo que influenciou o aumento dos níveis de diversidade nesta região (LUNDERG et al., 1998). Estudos indicam que os eventos de diversificação de espécies Neotropicais ocorreram antes do período Pleistoceno, tais eventos seriam os responsáveis pela ocorrência de 80% das unidades evolutivas significativas de peixes neotropicais (RULL 2008). Eventos como a captura de cabeceiras (Hipótese hidrogeográfica) são os responsáveis pela diversificação da ictiofauna (TAGLIACOLLO et al., 2015). Estes eventos de captura são comumente observados em áreas geológicas estáveis (escudos cristalinos), que estão cobertas de fraturas e falhas geológicas. As contínuas reativações tectônicas dessas áreas (datadas desde o Paleogeno, 66 Ma) promoveram rearranjos entre as bacias, resultando em eventos de captura de cabeceira e geodispersão da ictiofauna (RIBEIRO, 2006; ROXO et al., 2014)

Com o advento de dados moleculares e métodos de bioinformática para analisar as diferenças genéticas em nível populacional, novos conhecimentos sobre a ictiofauna dulcícola neotropical foram adicionados. O DNA mitocondrial tem sido o foco de estudo de vários grupos de pesquisa que se dedicam a elucidar problemas relativos à genética de populações, conservação de recursos, estabelecimento de relações filogenéticas e filogeográficas entre diferentes espécies, resolução de incertezas taxonômicas e diferenciação de espécies crípticas. Entre os marcadores mais comumente utilizados nestes estudos estão os genes mitocondriais. Estudos realizados com o genoma mitocondrial de peixes mostram que ele é formado por cerca de 17.000 pares de bases (pb), sendo que nesse genoma encontram-se os genes 12S e 16S do rRNA, 22 genes de tRNA, Citocromo Oxidase (I, II, III e IV), ATP sintetase (subunidades 6 e 8), Citocromo b, genes para seis subunidades da NADH e a região “D-loop” (*displacement loop*) conhecida como região controle com importante papel no início da replicação do mtDNA e da transcrição do RNA (MEYER, 1993; GARESSE et al., 1997; MIYA et al., 2003; BALLARD E WITHLOCK, 2004 VILLELA et al. 2017).

O gene ATP sintetase (ATPase) de subunidades 6 e 8 é responsável pela codificação de uma enzima que hidrolisa o ATP e funciona como um transportador de energia em todas as atividades básicas das células que requerem energia. Estes genes são mais conservados em relação a outros genes mitocondriais, por isso são ferramentas utilizadas para determinar relações filogenéticas, filogeográficas (PERDICES et al., 2004; HABIB et al., 2012; BORBA et al., 2013 PONZETTO et al. 2016, PONZETTO et al., 2017) e também para estimar divergências intraespecíficas (FREDERICO et al., 2012).

A filogeografia e a filogenia fornecem importantes contribuições para o entendimento da evolução das populações, espécies e comunidades de peixes em distintos ambientes neotropicais (PIORSKI et al., 2008), sendo este um campo de estudo que leva em questão os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (AVISE, 2004), que permite examinar questões como as origens das zonas híbridas (HEWITT, 2001) e os limites das espécies (MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2004). Tais inferências, principalmente as relacionadas às reconstruções das espécies e suas genealogias, são baseadas principalmente em sequências de genes do DNA mitocondrial (DNAm_t) (LOVEJOY e DE ARAÚJO, 2000).

Dessa forma, a filogenia molecular é uma das principais ferramentas da biologia da conservação, e deve ser usada no estudo de espécies ameaçadas, na criação de programas de conservação e preservação de todos os tipos de ecossistemas, bem como no entendimento da distribuição de organismos e conhecimento de sua biogeografia. Aliada a outras ferramentas, como a taxonomia e estudos ecológicos aplicados, a filogenia molecular certamente está entre as metodologias mais promissoras para auxiliar na conservação da biodiversidade (EGUIARTE, 2007). Além disso o mtDNA está presente em várias cópias por célula, o que facilita sua amplificação e sequenciamento, o que o torna um bom marcador para reconstrução de filogenias (GILLET et al. 2014). Em peixes, são vários os exemplos da utilização de haplótipos de mtDNA na resolução de problemas taxonômicos, de relações filogenéticas, populacionais e conservacionistas (PERDICES et al., 2004; STRECKER et al., 2004; WANG et al., 2004; BATISTA E ALVES-GOMES, 2006; WILLIS et al., 2007;

HUBERT et al., 2007; BRITZKI, 2015; HASHIMOTO, 2015; PONZETTO et al., 2016; PONZETTO et al., 2017).

A família Loricariidae tem sido alvo de inúmeros estudos de caráter filogenético e filogeográfico, devido à grande diversidade e distribuição de espécies, ao grande número de incertezas taxonômicas que persistem na família e a inexistência de uma posição filogenética para determinados grupos (MONTROYA-BURGOS et al., 1998; MONTROYA-BURGOS et al., 2003; CRAMER et al., 2011; ROXO et al., 2012; BORBA et al., 2013; LUJAN et al., 2015; LUJAN et al., 2017). O gênero *Ancistrus*, entretanto, até o presente momento foi alvo de poucos estudos envolvendo ferramentas moleculares, e não há na literatura ainda dados envolvendo análises filogenéticas e filogeográficas deste grupo, sobretudo na região que engloba as bacias do Paraguai, Araguaia-Tocantins e Amazônica no estado do Mato Grosso, sendo esta uma importante região para a biodiversidade da ictiofauna Neotropical.

1.2 Identificação molecular de espécies

A metodologia denominada “DNA barcoding” tem sido bastante empregada para a discriminação entre indivíduos e espécies, facilitando assim a identificação de novas espécies (MORITZ E CICERO, 2004). Essa metodologia também tem se apresentado bastante frequente e relevante em estudos relacionados à caracterização da biodiversidade da ictiofauna Neotropical e na identificação molecular de espécies crípticas de peixes (WARD et al., 2005; RIBEIRO et al., 2012; MEJIA et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2016; BRANDÃO et al., 2016, PRIZON et al. 2017). Além disso, a metodologia foi satisfatoriamente aplicada para identificar espécimes imaturos e indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento (WIBOWO et al. 2016).

Mesmo com as críticas iniciais a respeito da utilização da técnica como atividade não científica e restrita a simples produção de informação (LIPSCOMB et al., 2003; EBACH E HOLDREGE, 2005), muitos autores como Waugh (2007) argumentam que a aplicação da técnica não só pode ser considerada como uma atividade estritamente científica, como também serviria para testar hipóteses relacionadas a composição da biodiversidade através da identificação de espécies, também gerando fontes de dados que dariam suporte para formulação de novas hipóteses. Além disso, DeSalle et al. (2005), propõe explicitamente que uma ponte entre as pesquisas moleculares e morfológicas são de extrema importância para o aprimoramento do processo de identificação de espécies.

A identificação e discriminação genética de espécies, se dá com base na similaridade de sequências de DNA mitocondrial e a introdução do DNA *barcoding* destacou a expansão do uso destas moléculas, mais especificamente na subunidade I do Citocromo C Oxidase (COI), como um marcador genético para identificação de indivíduos (DAWNEY et al., 2007). Esta metodologia vem sendo amplamente utilizada em diversas áreas biológicas com comprovada capacidade de diferenciar espécies estreitamente relacionadas, em estudos que vão desde ciências forenses, sistemática molecular, à identificação de espécies crípticas como já foi realizado em espécies de peixes do rio Uruguai (WONG, 2011; PRIZON et al. 2017).

Esta metodologia baseia-se no isolamento e análise deste gene específico, o qual apresenta variações interespecíficas, mas que geralmente são conservados dentro da espécie. O Citocromo oxidase I é o elemento mais utilizado nestas análises, pois, suas taxas de mutação são consideravelmente coincidentes com a taxa de evolução da espécie (OGDEN et al., 2009). Importantes estudos para o desenvolvimento de extensas

bibliotecas de código de barras de DNA, mais notavelmente o código de *Barcode of Life Data Systems* (BOLD), levou à adoção da tecnologia de código de barras de DNA como o “padrão ouro” para a identificação de espécies e tem se expandido o poder da técnica (WONG, 2011).

Dessa forma a identificação acurada de espécies possui grande importância para gestão sustentada e para o monitoramento das populações de diferentes espécies (WARD, 2000; BEERKIRCHER et al., 2009), além de permitir a identificação de espécies em diferentes estágios, indivíduos com perda de caracteres diagnósticos e também espécies crípticas (DOMINGUEZ et al., 2013)

1.3 Bacia Amazônica e Bacia do Paraguai

A Bacia Amazônica considerada a maior bacia hidrográfica do mundo, com cerca de 6.000.000 km² está situada na América do Sul, entre os paralelos de 5° 00'N a 20° 00'S, limitada ao norte pelo Planalto das Guianas, com variações de altitude entre 500 e 3000 metros; ao sul, pelo Planalto Brasileiro, que forma uma barreira de 700 metros de altura; a oeste, pela Cordilheira dos Andes, com elevações de cerca de 3000 a 7000 m, e a leste, pelo Oceano Atlântico. A bacia é caracterizada pela diversidade de formações geológicas, distribuídas em quatro principais zonas morfoestruturais: os escudos cristalinos Pré-Cambrianos, ao norte e ao sul, com rochas ígneas e metamórficas; a Cordilheira dos Andes, a leste, com predominância de rochas sedimentares carbonatos e evaporitos, e a Depressão Amazônica, em sequência, para o centro da bacia, com depósitos fluviais de origem no Terciário (STALLARD E EDMOND 1983).

A vegetação presente na Bacia Amazônica pode ser dividida em dois grupos principais: vegetação de várzeas e igapó, frequentemente inundada, e vegetação de terra firme, que se encontra pelo menos a alguns metros acima do nível mais alto dos rios locais. Os solos encontrados nessa região são distribuídos de forma heterogênea e são, em sua maioria, ácidos e de baixa fertilidade química, devido às altas temperaturas, chuvas intensas e geologia heterogênea (JORDAN, 1985). Os solos de várzea apresentam-se compostos de material aluvial e com drenagem prejudicada, sendo classificados como solos hidromórficos (MORTATTI, 1995).

Alguns dados estimam que os rios Solimões e Amazonas são responsáveis pelo aporte global de água ao oceano da ordem de 205000 m³/s (MOLINIER et al., 1992), o que reforça a sua posição na liderança hidrológica mundial. De acordo com Richey et al. (1989), independentemente das variações do regime pluviométrico da bacia de drenagem, o rio Amazonas apresenta uma certa regularidade com relação aos períodos de cheias e de águas baixas, permitindo a existência das várzeas, por onde transita cerca de 30% do seu volume de água.

O rio Paraguai nasce em território brasileiro e sua rede hidrográfica abrange uma extensão de 1.095.000 Km². Ocupa uma área de aproximadamente 600.000 Km² na América do Sul, dos quais 363.442 Km² estão em território brasileiro. O Pantanal brasileiro, totalmente inserido na Bacia do Rio Paraguai (BRP), representa 41% da área total da bacia, ocupando um território de aproximadamente 147.629 Km². A BRP também é composta por nascentes de rios que ocupam uma área de 215.813 Km² localizadas nos planaltos do seu entorno e representam 59% da área da Bacia. Isso significa que uma porção significativa da drenagem hidrográfica central do continente sulamericano depende da BRP (ANA et al, 2004).

O Pantanal, considerado a maior área úmida do mundo e declarado Patrimônio Nacional pela Constituição Brasileira de 1988, abriga sítios de relevante importância internacional pela Convenção de Áreas Úmidas RAMSAR e contempla áreas de Reserva da Biosfera declaradas pela UNESCO em 2000. A fauna e flora do Pantanal brasileiro são extremamente dependentes das regiões adjacentes, principalmente do Cerrado, ocorrente nas bordas norte, leste e sul da planície pantaneira (MITTERMEIER et al, 2002).

A região do Pantanal também é caracterizada pela existência de grandes oscilações climáticas e hidrológicas. Tais eventos têm grande influência no deslocamento de populações silvestres da região (ANA et al. 2004, HARRIS et al. 2005). O ciclo hidrológico e a dinâmica hídrica da região, representadas principalmente pela alternância de períodos de secas e de cheias, são condicionantes ambientais que garantem a alta biodiversidade e mantêm o funcionamento ecológico de toda a região (ANA et al, 2004).

Diversos cursos d'água que compõem a BRP, incluindo a região do Pantanal, sofrem flutuações de nível de água, nutrientes e espécies como resultado do pulso de inundação (MEMEDE E ALHO 2006). Tais eventos têm grande influência na comunidade de peixes dessa região, alterando a diversidade, os padrões de migração e a estrutura trófica das mesmas após estes períodos (MUNIZ 2010). Dessa forma as regiões inundáveis se tornam portadoras de grande diversidade e riqueza ictiológica (WELCOME 2000), se apresentando assim como um importante cenário para estudos envolvendo ecologia, genética e conservação de espécies de peixes de pequeno e grande porte.

A partir desse conjunto de informações sobre as bacias, emerge a necessidade de estudos morfológicos, citogenéticos e genético-moleculares enfocando aspectos da biologia, ecologia, filogeografia e da filogenia dos peixes de riachos, principalmente, da bacia do rio Paraguai. Estes estudos são importantes ferramentas para a identificação de novas espécies numa área de reconhecido endemismo e subestimativa da ictiofauna, além de caracterizar a diversidade de espécies da região.

1.4 Ordem Siluriformes

A ictiofauna de água doce da região Neotropical possui cerca 8000 espécies de peixes já descritas (REIS et al. 2016) sendo uma das mais ricas em diversidade do mundo. Os peixes Neotropicais estão distribuídos em cinco grandes grupos: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes (LÉVEQUE et al., 2008). Os Siluriformes, por sua vez, formam um grupo extremamente grande e diverso, possuindo grupos dominantes na América do Sul e ampla distribuição mundial (BURGES, 1989; NELSON 2006; OTA et al 2015). Formada exclusivamente por peixes ósseos, a ordem tem sido foco de muitos estudos devido a sua grande diversidade taxonômica e ecológica (FINK E FINK, 1981; DE PINNA, 1998; BRITTO, 2003). Composta por 39 famílias, 5257 espécies estimadas e 3763 espécies nominais, a ordem soma cerca de 10% de todas as espécies de peixes (FERRARIS, 2007; OTA et al 2015; ESCHMEYER E FONG, 2017). Estes números tendem a aumentar significativamente devido ao aumento dos estudos taxonômicos e o estabelecimento das relações filogenéticas e filogeográficas entre os grupos pertencentes à ordem.

Os Siluriformes geralmente habitam o fundo dos rios e riachos permanecendo escondidos entre as rochas e a vegetação. Possuem formas e tamanhos variados, com

hábitos geralmente crepusculares e noturnos (PAXTON E ESCHMEYER, 1995). Estes peixes não possuem escamas sobre o corpo, sendo este revestido por uma pele espessa (couro) ou placas ósseas. Geralmente, possuem três pares de barbilhões e frequentemente apresentam um forte e pungente acúleo à frente do primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitorais (BURGES, 1989). A maioria das espécies habita as regiões Tropicais e Neotropicais, sendo poucas as espécies que alcançam o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (NELSON, 2006).

Apesar de se tratar de um grupo de grande importância científica e econômica, a sistemática e a taxonomia dos Siluriformes ainda é bastante problemática, sendo que a própria classificação da ordem foi redefinida diversas vezes (DE PINNA, 1998; BRITTO, 2003). Um exemplo disso é mostrado no estudo realizado por de Pinna (1998) que fez uma análise da sistemática de representantes de todos os principais grupos dessa ordem, mostrando a existência de um grande número de famílias polifiléticas, ainda que vários grupos tradicionais realmente representem grupos monofiléticos. Britto (2003) elaborou uma nova hipótese filogenética para grupos da ordem Siluriformes elevando à família, representantes de grupos considerados polifiléticos por de Pinna (1998), sendo esta a hipótese mais aceita atualmente.

1.5 Família Loricariidae

Dentro da ordem Siluriformes, a família Loricariidae, pertencente à superfamília Loricarioidea, é considerada a segunda mais numerosa entre os peixes neotropicais observados na maioria dos rios brasileiros (FERRARIS, 2007; DELAPIEVE, 2014). Estes peixes, vulgarmente conhecidos como “cascudos”, são caracterizados pela presença de um “escudo ósseo” que recobre todo o corpo e sua cabeça, possuem pequenas estruturas ósseas em forma de espinho chamadas de odontódeos e boca

suctória com projeções carnosas. Várias espécies de loricariídeos já foram descritas até o momento, de modo que hoje a família é representada por 1078 espécies estimadas e 937 espécies nominais (ESCHMEYER E FONG, 2017).

As relações filogenéticas da família Loricariidae têm um histórico bastante controverso, Schaefer (1987) definiu seis grupos monofiléticos para a família: Hypostominae e Loricariinae; Hypoptopomatinae; Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae mais Ancistrinae. E até 2004 o grupo era dividido em seis subfamílias de acordo com Isbrücker (1980): Hypoptomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Ancistrinae, Neoplecostominae e Lithogeneinae.

Entretanto, a classificação das subfamílias e o agrupamento dos gêneros continuaram sendo alvo de constantes reformulações (ISBRÜCKER, 1980; ARMBRUSTER, 2004; REIS et al., 2006). Em uma extensa revisão realizada por Armbruster (2004) as subfamílias: Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae e Neoplecostominae foram consideradas válidas. A antiga subfamília Ancistrinae foi considerada como sinônima de Hypostominae, a qual passou a ser constituída por cinco tribos: Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini. Adicionalmente, os gêneros *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys* e *Pareiorhina* foram alocados na subfamília Neoplecostominae (ARMBRUSTER, 2004).

Posteriormente, foi descrita a subfamília Delturinae, que incorporou os gêneros *Delturus* e *Ursilodus* (REIS et al., 2006). Mais recentemente, Cramer (2009) usando dados moleculares nucleares, mitocondriais e morfológicos, alocou o gênero *Hemipsilichthys* na subfamília Delturinae. Chiachio et al. (2008) propôs uma sétima subfamília, Otothyrinae, a montagem da antiga tribo Otothyriini, mantendo

Hypoptopomatinae composta apenas por membros da antiga tribo Hypoptopomatini. Apesar de Cramer et al. (2011) refutar tal tentativa de elevar este grupo à subfamília, alegando esta ser parafilética, Roxo et al. (2014) mostraram o monofiletismo de Otothyriinae, além de evidenciar que Neoplecostominae está mais relacionada com Otothyriinae do que com Hypoptopomatinae. Lujan et al. (2015), com a utilização de técnicas filogenéticas moleculares multilocus (segmentos de DNA nuclear e mitocondrial) conseguiu elevar a categoria de família o grupo Rhinelepinae, anteriormente denominado como tribo Rhinelepini (Hypostominae). Desta forma, a atual família Loricariidae é dividida em oito subfamílias: Lithogeneinae Eigenmann, 1909 (3 espécies), Delturinae Reis et al., 2006 (7 espécies), Neoplecostominae Regan, 1904 (58 espécies), Hypoptopomatinae Eigenmann e Eigenmann, 1890 (52 espécies), Loricariinae Bonaparte, 1831 (238 espécies), Hypostominae Kner, 1853 (462 espécies), Otothyriinae Chiachio et al. (2008) (105 espécies) e Rhinelepinae Lujan et al. (2015) (6 espécies).

1.6 Tribo Ancistrini e Gênero *Ancistrus*

A tribo Ancistrini possui 217 espécies válidas, distribuídas em 24 gêneros, sendo a maior e mais diversificada em número de espécies dentre os loricariídeos da região amazônica (FERRARIS, 2007). No Brasil são encontrados 21 gêneros, em um total de 78 espécies nominais (SARMENTO-SOARES E INGENITO, 2007). O gênero *Ancistrus* Kner, 1854 é um dos mais diversificados da tribo, possuindo atualmente 66 espécies nominais e 16 consideradas como sinônimos de outras espécies de *Ancistrus* (TAPHORN et al., 2010; TAPHORN et al., 2013; ESCHMEYER, 2013, FROESE E PAULY 2016). As espécies desse gênero podem ser diferenciadas de outros loricariídeos devido a ausência de placas e odontódios na margem anterior do focinho,

onde existem apenas pequenos tentáculos carnudos e odontódeos interoperculares bem desenvolvidos. Além disso o gênero também é caracterizado pela ocorrência de cuidado parental de ovos e larvas dos indivíduos machos (SABAJ et al., 1999), e pela existência de dimorfismo sexual, no qual os tentáculos dos machos são mais desenvolvidos do que os das fêmeas (ISBRÜCKER E NIJSSEN, 1992; SABAJ et al., 1999).

Embora as espécies de *Ancistrus* sejam amplamente distribuídas pelos rios e riachos Neotropicais, as bacias dos rios Amazonas e Paraguai nos estados do Amazonas, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul abrigam o maior número e diversidade de espécies do gênero (FISCH-MULLER, 2003), de modo que várias espécies já foram descritas nessa região.

Algumas espécies de *Ancistrus* possuem taxonomia duvidosa, tendo ainda uma ausência na chave precisa de identificação, ficando esta restrita aos especialistas (BRITSKI, et al., 2007). Sobretudo na região do Pantanal brasileiro, que engloba a bacia do rio Paraguai, a taxonomia das espécies de *Ancistrus* é bastante limitada e as chaves de identificação existentes não abrangem todas as espécies da região. Por exemplo, *Ancistrus dubius* e *Ancistrus hoplogenyis* já foram considerados sinônimo de *Ancistrus cirrhosus* que não ocorre nesta bacia, além de outras espécies que ainda não possuem classificação devido a existência de incertezas taxonômicas (BIFI et al., 1999; REIS et al. 2003; BRITZKI et al 2007). Dessa forma a identificação de muitos exemplares de *Ancistrus* dessa região se baseia apenas no nível de gênero, o que dificulta os estudos biológicos e de conservação desse grupo, sendo necessária uma revisão do gênero na bacia do rio Paraguai, a fim de possibilitar a correta identificação das espécies (REIS et al. 2003).

O gênero *Ancistrus* é conhecido por possuir inúmeras variações quanto aos cariótipos das diferentes espécies existentes. Dentre estas variações pode-se destacar a grande variação do número diploide, que vai de $2n=34$ a $2n=54$, a presença de cromossomos sexuais (ZZ/ZW e XX/XY), sistemas múltiplos de cromossomos sexuais (XX/XY1Y2 e Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) polimorfismos na região organizadora de nucléolo e ocorrência de rearranjos em forma de inversões pericêntricas e paracêntricas (ALVES et al., 2003; MARIOTTO et al., 2004; SOUZA et al., 2004; ALVES et al., 2005; MARIOTTO E MIYAZAWA, 2006; DE OLIVEIRA et al., 2006, 2007 e 2008; MARIOTTO, 2009; MARIOTTO et al., 2011; MARIOTTO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2015; FAVARATO et al., 2016, PRIZON et al., 2016, PRIZON et al., 2017). Devido a estas características, as análises cromossômicas têm auxiliado de maneira positiva a discriminação de espécies e populações de *Ancistrus* nas regiões da bacia Amazônica do rio Paraguai onde foi sugerida a ocorrência de 13 citótipos para as espécies de *Ancistrus* (DE OLIVEIRA et al., 2006; MARIOTTO et al., 2013, veja a Tabela 1).

Tabela 1: Linhagens e espécies de *Ancistrus* citogeneticamente caracterizadas.

Species	Diploid number	Sex Chromosome Systems	Location	Reference
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	-	Rio Coxipó – MT	Mariotto et al., 2006
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	XX/XY	Córrego Pari - MT	Mariotto et al., 2006; 2011
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	XX/XY	Córrego Flecha - MT	Mariotto et al., 2006; 2011
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	XX/XY	Córrego Fundo - MT	Mariotto et al., 2006; 2011
<i>Ancistrus cuiabae</i>	2n=34	-	Baía do Arrombado - MT	Mariotto et al., 2009; 2011
<i>Ancistrus cuiabae</i>	2n=34	-	Baía do Arrombado - MT	Mariotto et al., 2009; 2011
<i>Ancistrus cuiabae</i>	2n=34	-	Baía do Arrombado - MT	Mariotto et al., 2009; 2011
<i>Ancistrus abelhoai</i>	2n=48	-	Rio Iguaçú - PR	Ribeiro et. al., 2015
<i>Ancistrus claro</i>	2n=54	-	Rio Coxipó - MT	Mariotto et. al., 2011; 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 03	2n=54	-	Córrego Pari - MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 01	2n=54	-	Rio Pipa - MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 04	2n=52	-	Córrego São José - MT	Mariotto et. al., 2011; 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 06	2n=50	-	Rio Matrixã - MT	Mariotto et. al., 2011; 2013
<i>Ancistrus tombador</i>	2n=50	-	Rio Preto - MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 13	2n=40	-	Córrego Salgadinho - MT	Mariotto et. al., 2011; 2013
<i>Ancistrus</i> n.sp.1	2n=38	-	Rio São Francisco - AC	Alves et. al., 2003
<i>Ancistrus</i> n. sp. 2	2n=52	-	Rio Betari - SP	Alves et. al., 2003
<i>Ancistrus multispinnis</i>	2n=52	-	Rio Itapocu - SC	Alves et. al., 2003
<i>Ancistrus</i> n. sp. 1	2n=39♂	-	Rio Vermelho - GO	Alves et al. 2006

<i>Ancistrus</i> n. sp. 2	2n=52	-	Rio Garuva - SC	Alves et al., 2006
<i>Ancistrus</i> sp. Piagaçu' (<i>A. aff. dolichopterus</i>)	2n=52	ZZ/ZW	Rio Purus - AM	De Oliveira et. al., 2007; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus ranunculus</i>	2n=48	ZZ/ZW	Rio Xingu - PA	De Oliveira et. al., 2007; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus</i> sp. 1 "Balbina" (<i>A. dubius</i>)	2n=39 ♂	-	Córrego Barretinho - AM	De Oliveira et. al., 2008; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus</i> sp. 2 Barcelos (<i>A. dolichopterus</i>)	2n=52	Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2	Igarapé Dimeni - AM	De Oliveira et. al., 2008; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=44	ZZ/ZW	Serra das Araras - MT	Mariotto et. al., 2004
<i>Ancistrus</i> sp. 08	2n=44	XX/XY	Rio Currupira - MT	Mariotto et. al., 2011
<i>Ancistrus</i> sp. Purus	2n=34	XX/XY	Rio Purus - AM	De Oliveira et al., 2009; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus</i> sp. Macoari (<i>A. maximus</i>)	2n=46	-	Rio Branco - RR	De Oliveira et al., 2009; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus</i> sp. Dimona	2n=52	-	Igarapé Dimona - AM	De Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> sp. Vermelho	2n=42	-	Igarapé Demeni - AM	De Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> sp. Trombetas	2n=38	-	Rio Trombetas - PA	De Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> sp. Catalão	2n=34	-	Catalão - AM	De Oliveira 2006
<i>Ancistrus</i> sp. Criminoso	2n=42	-	Córrego Criminoso -MT	Prizon et al. 2016
<i>Ancistrus</i> sp I	2n=50	-	Rio Mourão - PR	Prizon et al 2017
<i>Ancistrus</i> sp II	2n=50	-	São Francisco Verdadeiro - PR	Prizon et al 2017
<i>Ancistrus</i> sp III	2n=50	-	Rio Arroyo San Juan - AG	Prizon et al 2017
<i>Ancistrus</i> sp IV	2n=50	-	Rio Ocoi - PR	Prizon et al 2017
<i>Ancistrus</i> sp V	2n=50	-	São Francisco Falso - PR	Prizon et al 2017

<i>Ancistrus</i> sp. 1 Cupim	2n= 42	-	Córrego Cupim - MT	De Oliveira 2016
<i>Ancistrus</i> sp. 2 Cupim	2n=50	-	Córrego Cupim - MT	De Oliveira 2016
<i>Ancistrus</i> sp. Mutuca	2=54	-	Córrego Mutuca - MT	De Oliveira 2016
<i>Ancistrus</i> sp. Soberbo	2n=54	-	Rio Soberbo - MT	De Oliveira 2016
<i>Ancistrus</i> sp. Tamanduá	2n=44	-	Córrego Tamanduá - MT	De Oliveira 2016

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi elaborar uma hipótese filogenética e filogeográfica das espécies do gênero que compõem das bacias Amazônica e do Paraguai nos estados do Amazonas do Mato Grosso, baseada em caracteres do genoma mitocondrial e nuclear.

2.2 Metas Específicas

- Realizar uma discriminação das linhagens do gênero *Ancistrus* das regiões estudadas, através da análise de sequências do gene Citocromo oxidase c subunidade I (COI).
- Realizar uma análise filogenética das espécies de *Ancistrus* que compõem a região, utilizando sequências concatenadas dos genes mitocondriais ATPase (6/8) e COI, e do gene nuclear Rag2.
- Testar a monofilia do grupo utilizando outros grupos próximos como parâmetro.
- Determinar o grau de compartilhamento de haplótipos entre as diferentes linhagens estudadas.
- Observar a existência de estruturação genética entre as linhagens estudadas.

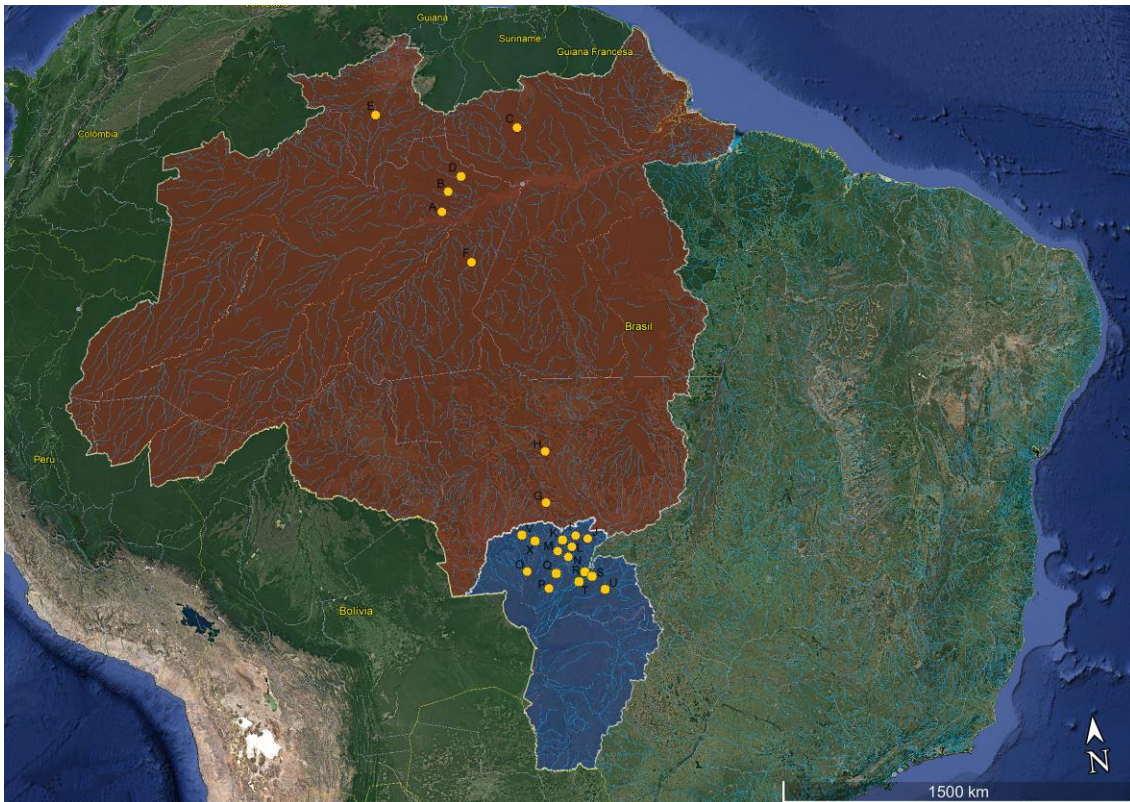
3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram amostrados 140 indivíduos de diferentes linhagens de *Ancistrus* 23 diferentes localidades, sendo oito delas representantes da bacia Amazônica e 15 representantes da do Paraguai (Figura 1).

As espécies *Hypostomus commersoni* e *Rhamdia quelen*, cujo material já estava disponível no laboratório, foram utilizadas como *outgroup*.

Figura 1: Mapa dos sistemas hidrográficos das bacias Amazônica e do Paraguai, destacando os pontos de coleta (círculos amarelos). Bacia Amazônica: A (Catalão), B (Igarapé Dimeni), C (Igarapé Trombetas), D (Igarapé Barretinho), E (Igarapé Mocoari), F (Rio Juma), G (Córrego Matrinxã) e H (Rio Preto). Bacia do Paraguai: I (Córrego Coxipó), J (Rio do Peixe), K (Córrego Soberbo), L (Córrego Mutuca), M (Córrego Sagradouro), N (Rio Pari), O (Córrego Flecha), P (Baia do Arrombado), Q (Córrego Santa Cruz), R (Córrego Cupim), S (Córrego Macaco), T (Córrego Tamanduá), U (Córrego Vermelho), V (Córrego Tangará) e X (Córrego Currupira). O sombreado vermelho delimita a região hidrográfica Amazônica e o sombreado azul delimita a região hidrográfica do Paraguai.



Na bacia do Paraguai os rios e riachos amostrados estão localizados dentro e fora do perímetro urbano e representam pequenos corpos d'água de baixa profundidade e sempre associados à mata ciliar. Os pontos coletados na bacia Amazônica estão todos localizados fora do perímetro urbano, sendo que são corpos d'água de média e grande profundidade e estão sempre associados a grandes quantidades de plantas aquáticas e mata ciliar.

Os peixes foram coletados com auxílio de redes e tarrafas e transportados vivos para a aclimatação em laboratório. Alguns indivíduos foram fixados inteiros em Etanol 100% a fim de manter sua morfologia externa para correta identificação e para posterior extração de tecido. Os indivíduos sacrificados para a obtenção de preparações de cromossomos mitóticos foram corretamente identificados, fixados em Formaldeído 10% e depositados na coleção ictiológica do laboratório de genética da UFMT. A coleta dos exemplares foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente Brasileiro através do seu Sistema de Informação e Autorização em Biodiversidade (SISBIO), com o número de licença 42144-1. Os protocolos utilizados no estudo foram submetidos ao Comitê de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e aprovado como número de protocolo 7913.

Os indivíduos coletados na bacia do rio Paraguai foram enviados para identificação. Foram inicialmente agrupados de acordo com a localidade de coleta e enviados ao Prof^o Dr^o Claudio Henrique Zawadzki (Universidade Estadual de Maringá) para a correta identificação.

Os exemplares da bacia Amazônica foram obtidos em coletas e visitas a coleções ictiológicas em parceria com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com a supervisão da Prof^a Dr^a Eliana Feldberg. Todos os exemplares encontram-se depositados na coleção do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de DNA genômico

O DNA total foi obtido utilizando-se amostras de músculo e/ou fígado e empregando a técnica de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK E RUSSELL, 2001) ou o Kit de extração da Promega (protocolo do fabricante). Para a técnica utilizando fenol, as amostras de tecidos foram colocadas em tubos eppendorf juntamente com a solução de lise (composta por 300 µL de TNE (Tris-NaCl-EDTA) 1X; 30 µL de Tris-HCl 1M pH = 8,0; 20 µL de SDS (Disodium Phosphate Anhydrous) 10% e 25 µL de Proteinase K (20mg/mL)) recém preparada. Os tubos foram submetidos à brusca agitação (vórtex) por 15 segundos cada.

Após estes procedimentos, os tubos foram mantidos em estufa a 37°C *overnight*, em seguida receberam 8 µL de solução aquosa de RNase na concentração de 10 mg/mL e permaneceram em estufa na mesma temperatura por mais 1 hora, sendo agitados a cada 30 minutos. Transcorrido esse tempo, foram adicionados aos tubos com os tecidos completamente digeridos, 400 µL de uma mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25: 24: 1), utilizando-se a capela.

Mais uma vez o material foi submetido a uma brusca agitação por 30 segundos e, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. Os tubos foram retirados da centrífuga com cuidado para não misturar as fases e o sobrenadante (fase alcoólica contendo DNA) foi transferido para um novo tubo devidamente identificado. Então, 60 µL de acetato de sódio 3M (pH= 5,3) foram adicionados e o tubo foi invertido lentamente para a completa mistura do sal com a solução.

Posteriormente, mais 600 μL de etanol absoluto gelado foram acrescentados aos tubos, os quais foram invertidos como no passo anterior. Os tubos foram mantidos no freezer por 30 minutos e centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos para a completa retirada da mistura etanol e acetato de sódio. Em seguida o sobrenadante foi descartado, certificando-se que o precipitado de DNA continuou aderido à parede do tubo.

Os tubos receberam 150 μL de solução de etanol 70% a temperatura ambiente e foram novamente levados à centrífuga para agitação a 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, como na etapa anterior, para que o precipitado de DNA continuasse aderido à parede do tubo. Esse passo foi repetido mais uma vez para garantir a retirada de todo o sal adicionado ao DNA.

A partir daí os tubos foram colocados abertos sobre folhas de papel absorventes em estufa a 37°C por 30 minutos para secagem do DNA. Após esse período, o DNA foi ressuspenso com 100 μL de água ultrapura autoclavada, por meio de agitação delicada do tubo para desprendimento total do DNA aderido à parede do tubo. O material foi levado para a estufa a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, transferido para a geladeira (4°C) overnight. O armazenamento do mesmo foi feito em freezer (-20°C) para conservação por longo prazo.

A integridade do DNA extraído foi aferida baseando-se no padrão eletroforético gerado após corrida em gel de agarose na concentração de 1%, corado com GelRed (proporção de 0,1 μL de GelRed® para cada 10 μL de gel), em 1 μL de tampão de corrida *blue juice* (10X) e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.2 Amplificação e Sequenciamento

As reações de amplificação por PCR dos genes estudados foram obtidas a partir de um volume de 13,5 μ L de uma solução contendo:

Solução	Volume
Mix PCR* (Quiagen)	6,25 μ L
Água Milli Q	5,25 μ L
Primer F 10 μ M	0,5 μ L
Primer R 10 μ M	0,5 μ L
DNA	1,0 μ L
Volume final	13,5μL

** Na solução de MIX PCR estão contidos os reagentes Taq DNA polimerase 5U, Tampão da enzima 10X, MgCl₂ 1,5 mM e dNTP (dideoximonucleotídeo trifosfato) 200 μ M.*

Para o gene ATP sintetase subunidade 6 e 8 (ATPase 6/8) o programa de PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 40s, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, 55°C por 40s para anelamento dos primers, 68°C por 2 minutos, estendendo a cadeia, uma extensão final de 72°C por 5 minutos. A porção do gene amplificada corresponde aos primers L8331 (5'- AA GCR TYR GCC TTT TAA GC-3') e H9236 (5'- GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC-3') (PERDICES et al., 2004) e inclui sequências conservadas de tRNA (RNA transportadores) que flanqueiam este complexo de genes.

Para a amplificação do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) o programa de PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 90°C por 40s, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, para anelamento dos primers fez-se um ciclo de 50°C por 40s, a extensão da cadeia foi de 68°C por 2 min, e a extensão final de 72°C for 5 min. O conjunto de primers utilizado foi: VF1 (5'-TTC TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GG-3') e VR1 (5'-TAG ACT TCT GGG TGG-3') (IVANOVA et al. 2007).

Para o gene nuclear Rag2 o programa de PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 90°C por 40s, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, para anelamento dos primers fez-se um ciclo de 55°C por 40s, a extensão da cadeia foi de 68°C por 2 min, e a extensão final de 72°C for 5 min. O conjunto de primers utilizado foi: Rag2 F (5'-TGY TAT CTC CCA CCT CTG CGY T-3') e Rag2 R (5'-TCA TCC TCC TCA TCK TCC TCW TT-3') (HARDMAN 2004).

Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR dos genes ATPase 6/8 e COI foram visualizados em gel de agarose 1% corados com GelRed® (proporção de 0,1 µL de GelRed® para cada 10µL de gel). As bandas foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta e a quantificação do produto gênico foi realizada com marcadores de peso molecular Lambda (λ) DNA 50ng e 30ng (Figura 2 e 3).

Para o sequenciamento, foram utilizadas as amostras que possuíam por volta de 50ng de DNA/µL. Estas amostras passaram pelo tratamento com a enzima EXOSAP (GE Healthcare) no qual foi adicionado a um tubo eppendorf 10µL de produto de PCR, 2µL da enzima EXOSAP e 2µL de água Milli Q autoclavada. Os tubos foram levados ao termociclador em um ciclo de 1 hora à 37°C e 15 minutos à 80°C. As amostras foram mantidas no freezer (-20°C).

O produto de PCR purificado foi enviado para sequenciamento na empresa MacroGen. As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas através do programa BioEdit (HALL, 1999).

3.2.3 Análises de distância genética para o gene COI

As distâncias genéticas entre e dentro das espécies foram calculadas utilizando o método Kimura2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980) e os padrões de divergência sugeridos por essas distâncias, foram representados graficamente usando o método Neighbour-Joining (NJ) com 1000 réplicas de bootstrap. Estas análises foram conduzidas no programa MEGA v6. 0 (TAMURA et al. 2011), que também foi usado para a composição da base média de sequências. Os alinhamentos de sequências foram realizados utilizando o algoritmo ClustalW disponível no software Dambe (XIA E XIE 2001) e a composição de base média de sequências foi adquirida com a ferramenta BOLD (RATNASINGHAM E HEBERT 2007).

3.2.4 Análises filogenéticas

As sequências foram alinhadas usando Clustal W no BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.5.3 (Hall 1999) e DAMBE (XIA E XIE 2001). As relações filogenéticas das linhagens de *Ancistrus* foram inferidas pela combinação de análises filogenéticas e populacionais. Nas análises filogenéticas foram estimadas separadamente as distâncias genéticas de cada conjunto de dados (ATPase, COI e Rag2) usando o método Neighbor-Joining (NJ) realizado no MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013). Foi também feita uma análise de sequências múltiplas, no qual as sequências foram concatenadas usando o software Geneious (KEARSE et al., 2012) e em sequência foram submetidas a uma inferência Bayesiana utilizando o software Mr.Bayes v. 3.1.2

(HUELSENENCK E RONQUIST 2001). Quatro correntes simultâneas de Monte Carlo Markov (MCMC) foram executadas por 2 milhões de gerações sob o modelo de evolução do tempo geral reversível (GTR), com frequência de amostra de 100 gerações e temperatura da corrente definida para 0,2. A estabilidade de log- *likelihood* foi alcançada após aproximadamente 80.000 gerações (excluindo as primeiras 80.000 árvores). As árvores remanescentes foram usadas para calcular uma árvore de consenso de regra de maioria de 50% e os valores de probabilidade posteriores foram calculados para determinar o nível de suporte para a topologia Bayesiana.

3.2.5 Análises Filogeográficas e populacionais

Para acessar o padrão de diversidade foram computados os números de haplótipos (n), diversidade haplotípica (h), e diversidade nucleotídica (p) para cada fragmento gênico, usando o DnaSP v.5.10.01 (LIBRADO e ROZAS, 2009). Para avaliar a associação entre os haplótipos e suas distribuições geográficas foi utilizado o programa Network v.4.6.1.2 (Fluxus Tachnology). A estrutura da população e a variação genética (AMOVA e F_{ST}) foram caracterizadas e comparadas utilizando o software Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER et al., 2005).

4.0 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram subdivididos em dois capítulos, que correspondem a dois artigos que estão em fase de análise por revistas internacionais de divulgação científica.

Capítulo I: Molecular discrimination of *Ancistrus* lineages (Siluriformes: Loricariidae) from Paraguay and Amazon Basins Using Barcode DNA Tool

Capítulo II: Phylogenetic and Phylogeographic Relationships Inferred by Concatenated Genes in the Lineages of the Armored Catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae: Ancistrini) from Paraguay and Amazon basins

4.1 Capítulo I

O presente artigo encontra-se em análise na revista: **Journal of Molecular Biology Research**

Molecular discrimination of *Ancistrus* lineages (Siluriformes: Loricariidae) from Amazon and Paraguay Basins Using Barcode DNA Tool

Rafael Splendore de Borba¹, Sandra Mariotto², Liano Centofante³, Claudio Henrique Zawadzki⁴, Patricia Pasquali Parise-Maltempi*¹

¹Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

²IFMT Instituto Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

³Instituto de Biociências, UFMT Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

⁴Departamento de Biologia, NUPELIA, UEM, Maringá, Paraná, Brazil.

Corresponding author:

Patricia Pasquali Parise-Maltempi, Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista, 24A Avenida, 1515, CEP 13506900, Rio Claro, SP, Brazil.

Email: parise@rc.unesp.br

Phone number: +5519 3526-4148

Abstract

Several species of *Ancistrus* have been described in the region of the Amazon and Paraguay basins in the states of Amazonas and Mato Grosso. Cytogenetic and molecular data have helped to discriminate and isolate populations in these regions, but the taxonomic states among the species in this region remain unclear. The mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene is an important genetic marker in plants and animals and it is widely used to identify taxonomic relationships between species through a process called DNA barcoding. The present work used DNA barcoding and cytogenetic data to study populations and species of *Ancistrus* to realize a molecular discrimination of *Ancistrus* lineages from the Paraguay and Amazon basins. Twenty-three populations of *Ancistrus* distributed in eight locations along the Amazon basin and 15 populations in the Paraguay basin were analyzed. The Neighbor-joining technique were conducted in the software MEGA 6.0. The sequencing produced 669 bp, of which 171 bp were conserved and 491 bp were variable. The genetic distances observed showed that there were seven distinct lineages of *Ancistrus* in the studied points of Amazon basin and eight lineages in the Paraguay basin points. Our results illustrate the efficiency of this technique for the discrimination of the *Ancistrus* lineages once indicate the occurrence of cryptic species in these regions, which cannot be identified only as chromosomal and morphologic analyzes.

Keywords: Catfish, Ancistrini, mitochondrial DNA, distance tree, taxonomy.

1. Introduction

Species classification is a fundamental unit of an organism's biology. Although the term does not have a consensus definition in academy assigning valid scientific names to different organisms is vitally important in many biological fields, such as systematics and conservation biology (Balakrishnan, 2005). Traditionally, species were identified and classified through the examination of morphological characters. However, these methods have many limitations, including the occurrence of cryptic species, phenotypic plasticity, the absence of diagnostic characters and an identification key (Hebert, Cywinska, Ball & Dewaard 2003). In recent years, DNA sequencing has become a powerful tool for species identification of natural fish populations and fish products (Rasmussen & Morrissey, 2008; Smith, Mcyeagh & Steinke 2008; Vinas & Tudela, 2009; Carvalho, Neto, Brasil & Oliveira 2011).

The "DNA barcoding" methodology consists of analyzing a 650 bp segment of the Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene. These sequences have a high level of similarity and

low genetic divergence (Hebert et al., 2003; Herbert, Penton, Burns, Janzen & Hallwachs 2004; Ratnasingham & Dewaard 2003). In recent years, DNA barcoding of these sequences has often been used to discriminate and identify different species and populations (Moriz & Cicero, 2004; Herbert, et al., 2004; Decaëns et al., 2004; Duarte et al., 2017; Karahan et al. 2017). For example, this methodology is regularly used to characterize Neotropical fish fauna biodiversity and cryptic fish species, and has successfully identified immature specimens and individuals at different stages of development (Duarte et al., 2017; Karahan et al. 2017; Ribeiro et al., 2012; Mejía, León-Romero & Soto-Galera 2012; Pereira, Hanner, Foresti & Oliveira 2013).

The Ancistrini tribe has 217 valid species belonging to 24 genera. In Brazil, there are 22 genus and approximately 78 nominal species (Armbruster, 2004; Ferraris, 2008; Zawadzki, Bifi & Mariotto 2016). *Ancistrus* Kner, 1854 is the most diverse genus of the tribe and currently has 64 nominal species (Taphorn, Armbruster & Rodríguez-Olarte 2010; Taphorn, Armbruster & Villa-Navarro 2013; Eschmeyer, 2017). The genus can be differentiated from other members of the Ancistrini tribe by the absence of plates and odontodes on the leading edge of the snout, and the presence of tentacles and well developed protractil interopercular odontodes. The *Ancistrus* taxonomy classification is a complex issue. For most species, an accurate identification key is not available (Britski et al., 2007) and an extensive taxonomic revision is needed, particularly for some basins such as the Paraguay River Basin (Bifi, Silimon & Lopes 2009; Reis, Kullander & Ferraris 2003).

Ancistrus species belongs to a very interesting group from the cytogenetic point of view, since it has great variation in karyotype and diploid number ($2n = 34$ to $2n = 54$), a heteromorphic sexual chromosome system (ZZ/ZW and XX/XY) in some species, multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) and structural polymorphisms (Alves, Oliveira & Foresti 2003; Mariotto, Artoni & Miyazawa 2004; Souza et al., 2004; Alves, Oliveira & Foresti 2005; Mariotto & Miyazawa, 2006; De Oliveira, 2006; De Oliveira, Feldberg, Anjos & Zuanon 2007; De Oliveira, Feldberg, Anjos & Zuanon 2008; De Oliveira, Zuanon, Zawadzki & Py-Daniel 2015; Mariotto, Centofante, Miyazawa, Bertollo & Moreira-Filho 2009; Mariotto, Centofante, Vicari, Artoni & Moreira-Filho 2011; Mariotto, Centofante & Moreira-Filo 2013; Ribeiro et al., 2015 see also Table 1).

Taxonomic knowledge provides access to understanding real diversity of different species in certain regions. Therefore, this knowledge is of utmost importance for the maintenance and preservation of biodiversity (Pettersson, Cooper, Kirk, Pyle & Remsen 2010). The employment of morphological, cytogenetic, and molecular genetic tools has helped to identify and discriminate populations and species of *Ancistrus* in the Amazon and Paraguay

basin (De Oliveira, 2006; Mariotto et al., 2013; Favarato et al. 2016). Considering the promising use of DNA barcoding to identify a cryptic species, this study aims to generate a comprehensive molecular discrimination of *Ancistrus* lineages from the Amazon and Paraguay basin, in order to assist future genetic and taxonomic studies of the genus in this region and to associate these results with cytogenetic characters described to these lineages.

2. Material and Methods

A total of 146 *Ancistrus* spp. samples from 23 locations were examined, eight of the locations were obtained from the Amazon Basin, and 15 were retrieved from the Paraguay Basin (Figure 1). Specimen collection was authorized by the Brazilian Environment Ministry through its Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO), under license number 42144-1. The protocols used in this study were submitted to the Ethics Committee on the Use of Animals in Research (CEUA) of the Universidade Estadual Paulista (UNESP) and approved under protocol number 7913. The specimens were deposited to the Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA) and the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

DNA was extracted with the phenol-chloroform-isoamyl alcohol technique (Sambrook & Russel, 2001) and the NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, MN). PCR amplification of the Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene was conducted using a 13.5 µL solution containing 6.25 µL PCR Mix (Qiagen), 5.25 µL Milli Q water, 0.5 µL primer F (10 µM), 0.5 µL primer R (10 µM), and 1.0 µL template DNA (200 ng). PCR was performed in a thermocycler (Eppendorf Mastercycler) and consisted of an initial cycle of denaturation at 94°C for 40 s, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, annealing at 50°C for 40 s, chain extension at 68°C, and a final extension at 72°C for 5 minutes. The following set of primers was used: VF1 (5'-TTC TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GG-3') and VR1 (5'-TAG ACT TCT GGG TGG-3') (Ivanova, Zemlak, Hanner & Hebert 2007).

Quantification of the amplified gene products was performed using the molecular weight marker Lambda (λ) DNA (50 and 30 ng). For the sequence analysis, the amplified DNA was purified with the EXOSAP enzyme and subsequently sequenced (MacroGen, Korea).

Multiple sequence alignments were constructed to check the proportion of sequence indels and stop codons using BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.5.3 (Hall, 1999) and DAMBE (Xia & Xie, 2001). Genetic distances among and within species were calculated using the Kimura 2-parameter (K2P) substitution model (Kimura, 1980). The divergence patterns

suggested by the genetic distances were graphically represented using a Neighbor-Joining (NJ) approach with 1000 replicates bootstrap trees implemented in MEGA v6.0 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski & Kumar 2013). This program was also used to calculate the average sequence base composition. Sequence alignments were also constructed using the Clustal W algorithm available in the DAMBE software (Xia & Xie, 2001). The average base composition of sequences was calculated using BOLD tools (Ratnasingham & Hebert, 2007).

3. Results

The alignment of the COI gene sequences revealed 669 bp, of which 171 bp were conserved and 491 bp were variable. No indels or stop codons were detected. The mean nucleotide base composition in the sequences was as follows: 29.4% (T), 24.2% (C), 26.9% (A), and 19.5% (G).

The topology generated by the NJ method presented 21 clades, all of which displayed bootstrap values above 50% (Figure 2). The clades were identified according to their individuals' location and diploid number: eight of the clades represent the Amazon basin and 13 clades represent the Paraguay basin. The lineages analyzed were grouped according to their respective locality, and where possible, the diploid number (Figure 2).

We observed that the mean K2P genetic distance within each group was 0.4%, 21 times smaller than the mean distance observed among groups (8.4%) (Table 2). The genetic distance percentages observed among the groups were mostly quite high; however, some groups showed lower distances from each other (Table 2). With genetic distance analyses was possible discriminate seven lineages in Amazon basin and eight lineages in Paraguay basin (Table 3 and Figure 2). In the BOLD and BLAST alignment it was possible to identify the specimens studied only at the genus level (*Ancistrus* sp. BOLD:AAD9392 and BLAST: KP960567.1).

4. Discussion

The species of *Ancistrus* from the Paraguay and Amazon River basins have few diagnostic morphological characters, and as such, several publications describe these fish either on a generic level (Britski et al., 2007) or as unidentified at a species level/putatively new species (De Oliveira et al., 2015). Additionally, De Oliveira *et al.* (2015) highlighted that the accurate identification of the genus species is difficult primarily because of the lack of a taxonomic revision of the whole genus, and also because of the historical loss of a number of

primary types from European collections, the lack of details, and poor original descriptions of the species. However, molecular tools such as DNA barcoding employed in the present study using the molecular marker COI have proven very effective for the discrimination of *Ancistrus* lineages from the Paraguay and Amazon basins. The genetic distance analyses conducted among the morphologically very similar *Ancistrus* populations suggests that there are nine distinct lineages from the Paraguay basin and six lineages from the Amazon basin.

The K2P mean distance within the 15 discriminated *Ancistrus* lineages (0.32%) is similar to K2P mean distances found for other fish species such as ornamental fish from the Indian and Pacific oceans (0.42%) (Steinke, Zemplak & Hebert 2009), and Indian marine fishes (0.30%) (Lakra et al., 2011), and is slightly lower than that for the fish larvae from the Convergence Zone of the Sargasso Sea (0.47%) (Ayala, Riemann & Munk 2016). The genetic distance (i.e., the mean distance between groups) increased progressively among taxonomic groups considered distinct (Table 1), corroborating data from Hebert *et al.* (2003b). We identify two cryptic species in Paraguay basin, the “Mutuca” location have two *Ancistrus* lineages both with $2n=54$ chromosomes and are identical morphologically, however the genetic distance between them is 3.3% which shows that they correspond to two different species. Our observations illustrate the occurrence of a significant increasing genetic divergence in the studied lineages and show the efficiency of our technique in the separation of cryptic species (Table 3).

The genetic distance observed among the analyzed *Ancistrus* lineages generally has values considered high, with a mean distance of 8.4%. However, some populations (e.g., Sangradouro, Rio Vermelho, Pari, Flecha, Currupira, Tamanduá and Tangará) presented low levels of genetic distance ranging from 0.5% to 1.5% (Table 1). These values are below what is described in the literature for the separation of distinct species (Pereira et al., 2013). These lineages have diploid numbers ranging from $2n = 42$ to $2n = 44$ chromosomes, and the lineage from the “Pari” river has a heteromorphic chromosome sexual system XX/XY, these parameters are considered important cytogenetic markers among *Ancistrus* populations (Mariotto et al., 2006; Mariotto et al., 2011). Despite these features, the individuals of these populations present genetic distance values ranging from 0.5% to 1.5% (Table 1).

A low genetic distance indicates that the studied populations are composed of only one lineage of *Ancistrus*. Therefore, variations observed in diploid numbers and karyotype structure in these populations may be due to recurrent chromosomal polymorphisms resulting from different rearrangements that occurred in these populations. These events are quite common in the karyotype evolution of many groups of fish such as *Hypostomus* (Milhomem et al., 2010;

Bueno et al., 2012), and have already been observed in other populations of *Ancistrus* (Mariotto et al., 2013). De Oliveira (2006) found different karyotype and diploid numbers among ten different lineages of *Ancistrus* in the Amazon basin. In our analysis, it is possible to discriminate six of these lineages corroborating the hypothesis that the karyotype characteristics could be used as markers for these individuals. Only samples from the “Igarapé Barretinho” “Igarapé Macoari” have same diploid number ($2n=46$) and were previously identified as *Ancistrus* sp. 5 by De Oliveira (2006), were divided into two branches in the present topology with 8.6% of genetic distance between them. This observation indicates that there are two distinct lineages of *Ancistrus* in this location. Posteriorly these specimens were taxonomically reviewed, and two species were identified: *Ancistrus dubius* (Igarapé Barretinho) and *Ancistrus maximus* (Igarapé Macoari).

5. Conclusion

Combining cytogenetic, molecular, and morphological data and tools is a powerful approach to observe the actual taxonomic status of certain species. Although the main objective of DNA barcode analysis is to delineate species boundaries and to name individuals of known species, the technique also enables the detection of unknown species and the separation of cryptic species (Herbert et al., 2004; Kerr et al., 2007; Pons et al., 2006). This study shows that the DNA barcoding technique allows the discrimination of seven lineages of *Ancistrus* from the Amazon basin and eight lineages in Paraguay basins. In addition, this technique also helps the separation of possible cryptic species in Paraguay basin. Our results indicate that the occurrence of chromosome polymorphisms and the presence of distinct diploid numbers in the Paraguay basin may have contributed to the high level of genetic distance observed in different *Ancistrus* lineages. Our data can contribute to future studies of taxonomic revisions and cytogenetic characterization of *Ancistrus* lineages in these regions.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (The São Paulo State Research Foundation) (FAPESP - 2013/17826-9 and 2013/17211-4) for financial support. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) for providing the collection license (42144-1). The authors thank Eliana Feldberg and Maelin Silva (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA) for providing samples of *Ancistrus* from the Amazon basin, Dr. Josi Margarete Ponzetto do Nascimento for intellectual communication and Bioedit® for helping with the English language.

References

- Alves, A. L., Oliveira, C. & Foresti, F. (2003). Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariidae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia* 56, 57-63.
- Alves, A. L., Oliveira, C. & Foresti, F. (2005). Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica* 124, 127-136.
- Armbruster, J. W. (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool. J Linn Soc.* 141, 1-80.
- Ayala, D., Riemann, L. & Munk, P. (2016). Species composition and diversity of fish larvae in the Subtropical Convergence Zone of the Sargasso Sea from morphology and DNA barcoding. *Fish Oceanogr.* 25 (1), 85-104.
- Balakrishnan, R. (2005). Species concepts, species boundaries and species identification: a view from the tropics. *Syst. Biol.* 54 (4), 689-93.
- Bifi, A. G., Pavanelli, C. S. & Zawadzki, C. H. (2009). Three new species of *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Iguacu basin, Paraná State, Brazil. *Zootaxa* (Online) 2275, 41-59.
- Britski, H. A., Silimon, K. Z. S. & Lopes, B. S. (2007). Manual de identificação de peixes do Pantanal Mato-grossense. SPI. Corumbá, MS: EMBRAPA.
- Bueno, V., Zawadzki, C. H. & Margarido, V. P (2012). Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Rev. Fish Biol. Fish.* (22), 241-250.
- Carvalho, D. C., Neto, D. A.P., Brasil, B. S. A. F. & Oliveira, D.A.A. (2011). DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA* 1-9.

De Oliveira, R. R. (2006). Diversidade cariotípica entre dez espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) da bacia amazônica: estrutura e mecanismos de evolução cromossômica. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

De Oliveira, R. R.; Feldberg, E.; Anjos, M. B. & Zuanon, J. (2007) Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotrop. Ichthyol.* (Impresso), 5, 301-306.

De Oliveira, R. R.; Feldberg, E.; Anjos, M. B. & Zuanon, J. (2008) Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica* ('s-Gravenhage), 134, 243-249.

De Oliveira, R. R., Feldberg, E., Dos Anjos, M. B. & Zuanon, J. (2009) Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *J. Fish Biol.* 75, 2209-2225.

De Oliveira, R. R., Zuanon, J., Zawadzki, C. H. & Py-Daniel, L. R. (2015). *Ancistrus maximus*, a new species of red-dotted armored catfish from rio Branco, Roraima State, Brazilian Amazon (Siluriformes: Loricariidae). *Ichthyol. Explor. Freshws.* 26, 73-82.

Decaëns, T., Porco, D., James, S.W., Brown, G.G., Chassany, V., Dubs, F., Dupont, L., Lapied, E., Rougerie, R., Rossi, J. P. & Roy, V. (2016). DNA barcoding reveals diversity patterns of earthworm communities in remote tropical forests of French Guiana. *Soil. Biol. Biochem.* 92, 171-183.

Duarte, L. A. G., Oliveira, E. J. F., Amorim, A., Silva, D. A., Carvalho, E. F., Mazzoni, R. & Amaral, C. R. L. (2017). DNA Barcoding and Atlantic reef fishes: The molecular identification of a reef fish community from the Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. *Forensic. Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* (In press) doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigs.2017.09.140>.

Eschmeyer, W.N. (2017). Catalog of fishes. Electronic publication in "World Wide Web". <http://www.collections.calacademy.org/ich/>. Access in: june, 2017.

Favarato, R. M.; Silva, M.; de Oliveira, R. R.; Artoni, R. F.; Feldberg, E. & Matoso, D. A. (2016) Cytogenetic Diversity and the Evolutionary Dynamics of rDNA Genes and Telomeric Sequences in the *Ancistrus* Genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish* (Larchmont, NY), 13, 103-111.

- Ferraris Jr, C. J. (2008). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of Siluriform primary types. *Zootaxa* 1418, 1-628.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids* 41:95-98.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S.L. & Dewaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soci. Lond.* 270, 313-321.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J.M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14812-14817.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & Dewaard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R. Soci Lond.* 270, 96-99.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H. & Hebert, P. D. N. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes* (7), 544-548.
- Karahan, A., Douek, J., Paz, G., Stern, N., Kideys, A. E., Shaish, L., Goren, M. & Rinkevich, B. (2017). Employing DNA barcoding as taxonomy and conservation tools for fish species censuses at the southeastern Mediterranean, a hot-spot area for biological invasion. *J. Nat. Conserv.* 36, 1-9
- Kerr, K. C., Stoeckle, M. Y., Dove, C. J., Weigt, L. A. & Francis, C.M. (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol. Ecol. Notes.* (4), 535-543.
- Kimura, M. A. (1980). Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- Lakra, W. S., Verma, M. S., Goswami, M., Lal, K. K., Mohindra, V., Punia, P., Gopalakrishnan, A., ... Hebert, P. (2011). DNA barcoding Indian marine fishes. *Mol. Ecol. Res.* 11 (1), 60-71.
- Mariotto, S. & Miyazawa, C. S. (2006). *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomal characterization of four populations and occurrence of sex chromosomes of the type XX/XY, in the Pantanal Basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia* 59(4), 299-304.

- Mariotto, S., Artoni, R. F. & Miyazawa, C.S. (2004). Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia* 57, 327-331.
- Mariotto, S., Centofante, L. & Moreira-Filho, O. (2013). Diversity and chromosomal evolution in the genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae: Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso State, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 11 (1), 125-131.
- Mariotto, S., Centofante, L., Miyazawa, C. S., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2009). Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotrop. Ichthyol.* 7, 595-600.
- 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. *Comp. Cytogenet.* 5, 289-300.
- Mejía, O., León-Romero, Y. & Soto-Galera, E. (2012). DNA barcoding of the ichthyofauna of Pánuco–Tamesí complex: Evidence for taxonomic conflicts in some groups. *Mitochondrial DNA.* 23, 471-476.
- Milhomem, S. S. R., Castro, R. R., Nagamachi, C. Y., Souza Paes, A. C., Feldberg, E. & Pieczarka, J. C. Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). *Comp. Cytogenet.* 4, 11-12.
- Moritz, C. & Cicero, C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLOS Biology* 2 (10), 1529-1531.
- Patterson, D. J., Cooper, J., Kirk, P. M., Pyle, R. L. & Remsen, D. P. (2010). Names are key to the big new biology. *Tre. Ecol. Evol.* 25(12), 686-691.
- Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BCM Genetics.* 14, 20.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A. & Duran, D. P. (2006). Sequence based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst. Biol.* 55, 595-606.

Prizon, A.C., Borin-Carvalho, L.A., Bruschi, D.P., Ribeiro, M.O., Barbosa, L.M., Ferreira, G.E.B., Cius A., ... Portela-Castro, A.L.B. (2016) Cytogenetic data on *Ancistrus* sp. (Siluriformes, Loricariidae) of the Paraguay River basin (MS) sheds light on intrageneric karyotype diversification. *Comparat Cytogenet* 10(4): 625–636. doi: 10.3897/CompCytogen.v10i4.8532

Prizon, A.C., Bruschi, D.P., Borin-Carvalho, L.A., Cius, A., Barbosa, L.M., Ruiz, H.B., Zawadzki, C.H., ... Portela-Castro ALdB (2017) Hidden Diversity in the Populations of the Armored Catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná River Basin Revealed by Molecular and Cytogenetic Data. *Front Genet* 8:185. doi: 10.3389/fgene.2017.00185

Rasmussen, R. S. and Morrissey, M. T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comp. Rev. Food Sci. Food.* 7, 280-295.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: the Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes.* 7, 355-364.

Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris, C. (2003). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)*, Porto Alegre, EDIPUCRS.

Ribeiro, A. O., Caires, R. A., Mariguela, T. C., Pereira, L. H. G., Hanner, R. & Oliveira, C. (2012). DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. *Mol. Ecol. Res.* 12, 1012-1020.

Ribeiro, M. O., Noleto, R. B., Lorscheider, C. A., Porto, F. E., Prizon, A. C., Zawadzki, C. H., Oliveira, L. C. & Portela Castro, A. L.B. (2015). Cytogenetic description of *Ancistrus abilhoai* (Siluriformes: Loricariidae) from Iguaçú River basin, southern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 14, 4051-4057.

Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Spring Harbor Laboratory Press. Third Edition.

Smith, P. J., Mcveagh, S.M. & Steinke, D. (2008). DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *J. Fish Biol.* 72:464–471.

Souza, A. C. P., Nascimento, A. L., Carvalho, J. R., Barros, R. M. S., Feldberg, E., Nagamachi, C. Y. & Pieczarka, J. C. (2004). Karyotypic analysis of *Baryancistrus* aff. *niveatus* (Ancistrinae, Loricariidae) by C-banding, Ag-NOR, CMA3, DAPI and FISH. *Caryologia*; 57, 219-223.

Steinke, D., Zemlak, T. S. & Hebert, P. D. N. (2009). Barcoding nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. *PLoS ONE*. 4 (7), 6300, doi: 10.1371/journal.pone.0006300.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. *Mol. Biol. Evol.* 2725-2729.

Taphorn, D. C., Armbruster, J. W. & Rodríguez-Olarte, D. (2010). *Ancistrus falconensis* n. sp. and *A. gymnorhynchus* Kner (Siluriformes: Loricariidae) from central Venezuelan Caribbean coastal streams. *Zootaxa* 2345, 19-32.

Taphorn, D. C., Armbruster, J. W., Villa-Navarro, F. & Ray, C. K. (2013). Trans-Andean *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa* 3641 (4), 343-370.

Vinas, J. & Tudela, S. A (2009). validated methodology for genetic identification of tuna species (genus *Thunnus*). *PLoS ONE* 4 e7606.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. (2005). D. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biol. Sci.* 360, 1847-1857.

Xia, X. & Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92, 371-373.

Zawadzki, C. H., Bifi, A. G. & Mariotto, S. (2016). *Araichthys loro*, a new genus and species of suckermouth armored catfish from the upper rio Tapajós basin, Brazil (Siluriformes: Loricariidae). *Ichthyol. Explor. Freshw.* 27, 361-372.

Tabela 1: Linhagens e espécies de *Ancistrus* citogeneticamente caracterizadas.

Species	Diploid number	Sex Chromosome Systems	Location	Reference
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	-	Rio Coxipó – MT	Mariotto et al., 2006
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	XX/XY	Córrego Pari - MT	Mariotto et al., 2006; 2011
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	XX/XY	Córrego Flecha - MT	Mariotto et al., 2006; 2011
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=42	XX/XY	Córrego Fundo - MT	Mariotto et al., 2006; 2011
<i>Ancistrus cuiabae</i>	2n=34	-	Baía do Arrombado - MT	Mariotto et al., 2009; 2011
<i>Ancistrus cuiabae</i>	2n=34	-	Baía do Arrombado - MT	Mariotto et al., 2009; 2011
<i>Ancistrus cuiabae</i>	2n=34	-	Baía do Arrombado - MT	Mariotto et al., 2009; 2011
<i>Ancistrus abelhoai</i>	2n=48	-	Rio Iguaçú - PR	Ribeiro et. al., 2015
<i>Ancistrus claro</i>	2n=54	-	Rio Coxipó - MT	Mariotto et. al., 2011; 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 03	2n=54	-	Córrego Pari - MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 01	2n=54	-	Rio Pipa - MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 04	2n=52	-	Córrego São José - MT	Mariotto et. al., 2011; 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 06	2n=50	-	Rio Matrixã - MT	Mariotto et. al., 2011; 2013
<i>Ancistrus tombador</i>	2n=50	-	Rio Preto - MT	Mariotto et. al., 2013
<i>Ancistrus</i> sp. 13	2n=40	-	Córrego Salgadinho - MT	Mariotto et. al., 2011; 2013
<i>Ancistrus</i> n.sp.1	2n=38	-	Rio São Francisco - AC	Alves et. al., 2003
<i>Ancistrus</i> n. sp. 2	2n=52	-	Rio Betari - SP	Alves et. al., 2003
<i>Ancistrus multispinnis</i>	2n=52	-	Rio Itapocu - SC	Alves et. al., 2003
<i>Ancistrus</i> n. sp. 1	2n=39♂	-	Rio Vermelho - GO	Alves et al. 2006

<i>Ancistrus</i> n. sp. 2	2n=52	-	Rio Garuva - SC	Alves et al., 2006
<i>Ancistrus</i> sp. Piagaçu' (<i>A. aff. dolichopterus</i>)	2n=52	ZZ/ZW	Rio Purus - AM	De Oliveira et. al., 2007; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus ranunculus</i>	2n=48	ZZ/ZW	Rio Xingu - PA	De Oliveira et. al., 2007; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus</i> sp. 1 "Balbina" (<i>A. dubius</i>)	2n=39 ♂	-	Córrego Barretinho - AM	De Oliveira et. al., 2008; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus</i> sp. 2 Barcelos (<i>A. dolichopterus</i>)	2n=52	Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2	Igarapé Dimeni - AM	De Oliveira et. al., 2008; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus cf. dubius</i>	2n=44	ZZ/ZW	Serra das Araras - MT	Mariotto et. al., 2004
<i>Ancistrus</i> sp. 08	2n=44	XX/XY	Rio Currupira - MT	Mariotto et. al., 2011
<i>Ancistrus</i> sp. Purus	2n=34	XX/XY	Rio Purus - AM	De Oliveira et al., 2009; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus</i> sp. Macoari (<i>A. maximus</i>)	2n=46	-	Rio Branco - RR	De Oliveira et al., 2009; Favarato et al. 2016
<i>Ancistrus</i> sp. Dimona	2n=52	-	Igarapé Dimona - AM	De Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> sp. Vermelho	2n=42	-	Igarapé Demeni - AM	De Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> sp. Trombetas	2n=38	-	Rio Trombetas - PA	De Oliveira et al., 2009
<i>Ancistrus</i> sp. Catalão	2n=34	-	Catalão - AM	De Oliveira 2006
<i>Ancistrus</i> sp. Criminoso	2n=42	-	Córrego Criminoso -MT	Prizon et al. 2016
<i>Ancistrus</i> sp I	2n=50	-	Rio Mourão - PR	Prizon et al 2017
<i>Ancistrus</i> sp II	2n=50	-	São Francisco Verdadeiro - PR	Prizon et al 2017
<i>Ancistrus</i> sp III	2n=50	-	Rio Arroyo San Juan - AG	Prizon et al 2017
<i>Ancistrus</i> sp IV	2n=50	-	Rio Ocoi - PR	Prizon et al 2017
<i>Ancistrus</i> sp V	2n=50	-	São Francisco Falso - PR	Prizon et al 2017

<i>Ancistrus</i> sp. 1 Cupim	2n= 42	-	Córrego Cupim - MT	De Oliveira 2016
<i>Ancistrus</i> sp. 2 Cupim	2n=50	-	Córrego Cupim - MT	De Oliveira 2016
<i>Ancistrus</i> sp. Mutuca	2=54	-	Córrego Mutuca - MT	De Oliveira 2016
<i>Ancistrus</i> sp. Soberbo	2n=54	-	Rio Soberbo - MT	De Oliveira 2016
<i>Ancistrus</i> sp. Tamanduá	2n=44	-	Córrego Tamanduá - MT	De Oliveira 2016

Table 2: K2P distance (%) among groups of different *Ancistrus* lineages. The bold numbers represent the distance within each group and the ray shadings indicates those who are at low values among themselves (< 2.0).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 Flecha Sp. 1	0.2																				
2 Coxipo/Soberbo Sp.5	13.48	0.0																			
3 Peixe/Soberbo Sp.6	13.72	3.2	1.2																		
4 Flecha/Santa Cruz/Sangradouro Sp.7	12.89	10.6	10.5	1.7																	
5 Tangara 2n=52 Sp.1	1.5	13.35	13.58	12.77	0.1																
6 Preto river Sp.6AM	9.3	14.11	14.31	13.24	9.2	0.0															
7 Currupira Sp.1	0.8	13.61	13.85	13	2.1	9.5	0.0														
8 Baia do Arrombado Sp.8	10	14.16	14.6	13.88	10	7.7	9.5	0.0													
9 Sangradouro/Vermelho Sp.1	0.7	13.92	14.11	13.28	2.0	9.3	1.2	9.9	0.2												
10 Mutuca Sp.4	9.6	13.26	13.75	13.04	10.3	7.7	9.7	9.9	9.8	0.0											
11 Pari/Mutuca Sp.3	9.4	13.82	14.01	13.09	10.1	7.8	9.4	8.7	9.8	3.3	0.4										
12 Cupim/Macaco Sp.2	2.0	13.62	13.87	13.01	2.0	9.3	2.0	9.7	2.0	10.3	10	0.0									
13 Pari Sp.1	0.5	13.4	13.64	12.81	1.6	9.2	1	9.9	0.9	9.7	9.5	1.5	0.1								
14 Igarapé Macoari Sp.4AM	10.9	14.68	15.18	13.59	11.7	6.3	10.8	9.4	11.5	9.0	9.0	11.4	11.1	0.0							
15 Juma Sp.7AM	6.7	13.52	13.72	13.22	7.0	10.2	7.0	10.2	7.1	10.7	10.2	7.1	6.8	11	0.6						
16 Igarapé Dimona Sp.2AM	8.2	14.05	14.34	13.41	8.5	10.1	8.4	11.8	8.7	10.1	9.6	9.2	8.3	10.9	8.9	0.0					

Cont. Table 2: K2P distance (%) among groups of different *Ancistrus* lineages. The bold numbers represent the distance within each group and the ray shadings indicates those who are at low values among themselves.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
17 Catalão Sp.3AM	11	14.62	14.94	13.73	11.4	9	10.8	3.4	11.1	10.6	9.3	11.1	11.1	10.1	11.6	11.9	1,5				
18 Trombetas Sp.5AM	9.9	14.28	14.59	13.2	10.6	6.3	10.1	9.3	10.3	8.3	8.6	10.4	10	2.0	10.6	11	9.3	0.2			
19 Igarapé Barretinho Sp.1AM	8.0	14.18	14.32	13.15	8.5	8.7	8.1	10.1	8.5	8.7	8.4	8.4	8.0	8.6	7.1	6.9	10.5	8.7	0.2		
20 Matrinxã Sp.6AM	9.4	14.73	14.97	13.75	9.4	1.1	9.3	7.9	9.5	7.7	8.2	9.5	9.4	5.9	10.4	10.3	9.1	6.2	8.8	0.0	
21 Tamanduá Sp.1	0.6	13.39	13.63	12.81	1.7	9.2	1.1	10	1	10	9.8	1.3	0.8	11.1	6.7	8.2	11.2	10.1	9	9.4	0.2

AM = Amazon basin.

Table 3: Lineages discriminated using “Barcode tool” in Amazon and Paraguay basins.					
Amazon basin			Paraguay basin		
Locality	Diploid Number	Lineage/Specie	Locality	Diploid Number	Lineage
Igarapé Barretinho	2n=46	Sp.1AM (<i>Ancistrus dubius</i>)	Flecha	2n=44	Sp.1
Igarapé Dimona	2n=52	Sp.2AM (<i>Ancistrus dolichopterus</i>)	Curupira	2n=44	Sp.1
Catalão	2n=34	Sp.3AM	Pari	2n=42	Sp.1
Igarapé Macoari	2n=46	Sp.4AM (<i>Ancistrus maximus</i>)	Sangradouro/Vermelho	2n=42	Sp.1
Trombetas	2n=38	Sp.5AM	Tamanduá	2n=44	Sp.1
Preto river	2n=50	Sp.6AM (<i>Ancistrus tombador</i>)	Tangará	2n=42	Sp.1
Matrinxã	2n=50	Sp. 6AM (<i>Ancistrus tombador</i>)	Cupim/Macaco	2n=50	Sp.2
Juma river	-	Sp.7AM	Mutuca/Pari*	2n=54	Sp.3
-	-	-	Mutuca*	2n=54	Sp.4
-	-	-	Coxipó/Soberbo	2n=54	Sp.5
-	-	-	Peixe/Soberbo	2n=54	Sp.6
-	-	-	Flecha/Santa cruz/Sangradouro	2n=42	Sp.7
-	-	-	Baia do Arrombado	2n=34	Sp.8

*Putative cryptic species from Paraguay basin

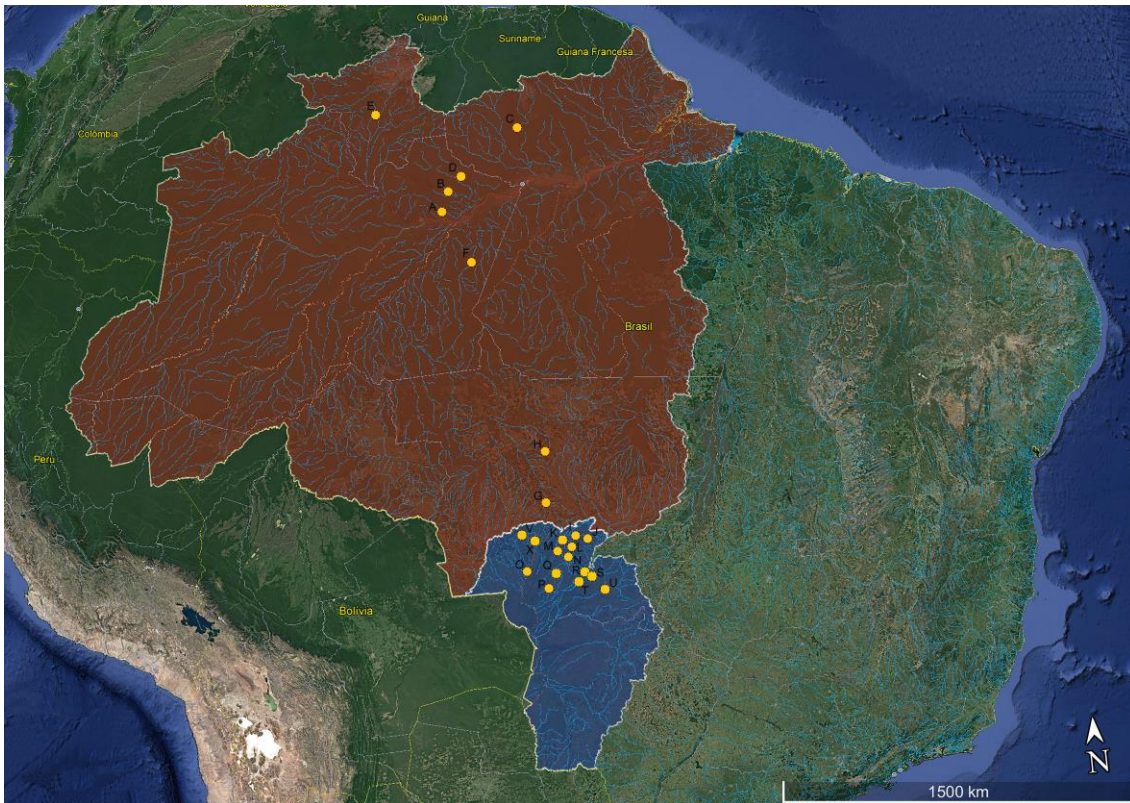


Figure 1: Map of the Amazon and Paraguay hydrographic systems showing the collection points (colorful circles). Amazon basin: A (Catalão), B (Igarapé Dimona), C (Igarapé Trombetas), D (Igarapé Barretinho), E (Igarapé Mocoari), F (Juma river), G (Matrinxã stream) and H (Preto river). Paraguay basin: I (Coxipó stream), J (Rio do Peixe), K (Soberbo stream), L (Mutuca stream), M (Sagradoiro stream), N (Pari river), O (Flecha stream), P (Baia do Arrombado), Q (Santa Cruz stream), R (Cupim stream), S (Macaco stream), T (Tamanduá stream), U (Vermelho stream), V (Tangará stream) and X (Currupira stream). The red shading delimits the Amazonian hydrographic region and the blue shading delimits the Paraguay hydrographic region.

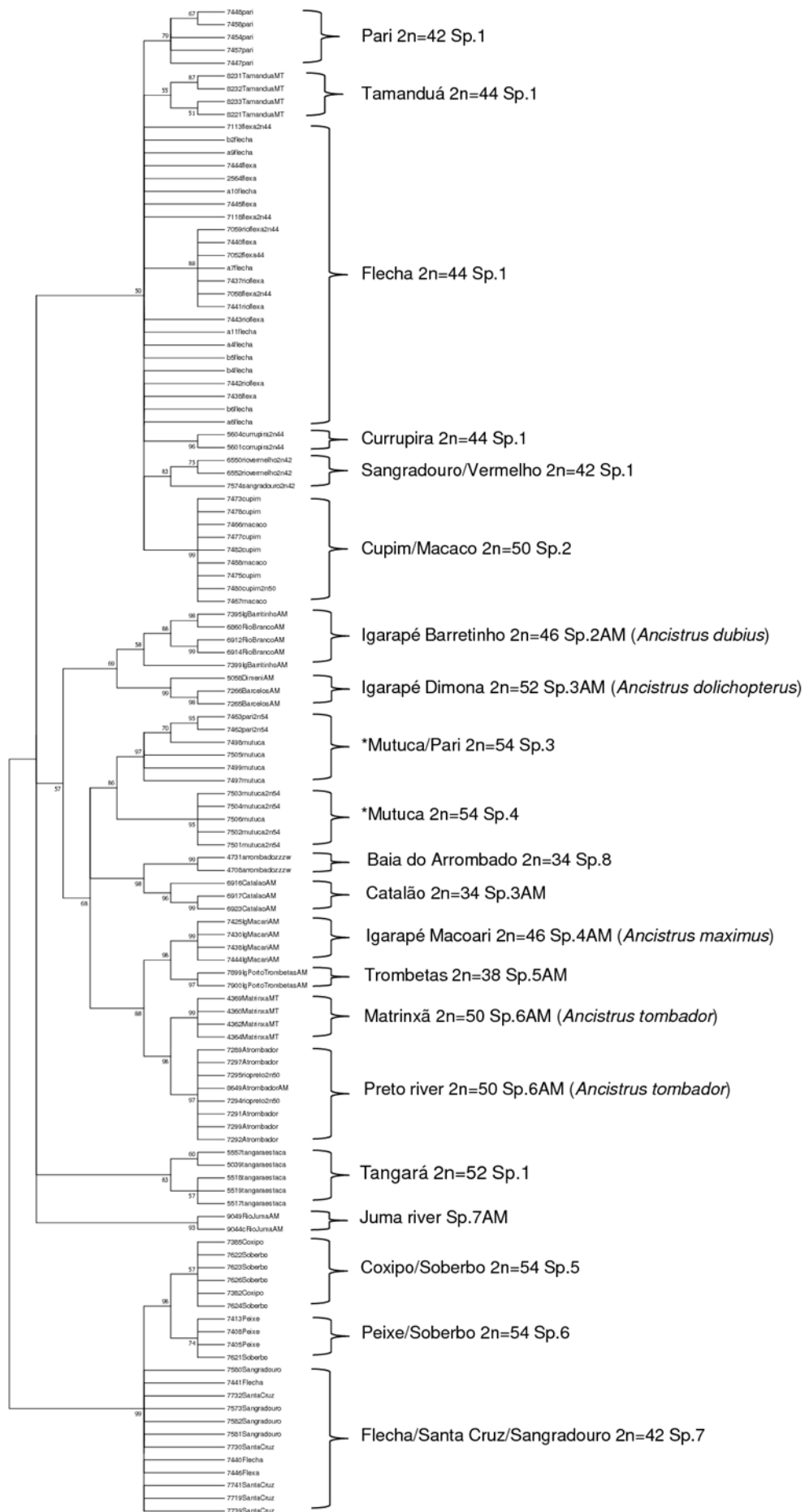


Figure 2: Condensed neighbor-joining tree showing genetic distances (K2P) among different *Ancistrus* lineages in the Amazon and Paraguay basins. *Indicate the cryptic species of Paraguay basin. AM = Amazon basin.

4.2 Capítulo II

O presente artigo encontra-se em análise na revista: **Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology**

Phylogenetic and Phylogeographic Relationships among Lineages of the Armored Catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae: Ancistrini), from the Amazon and Paraguay Basins

Rafael Splendore de Borba¹, Sandra Mariotto², Liano Centofante³, Patricia Pasquali Parise-Maltempi¹

¹Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

²IFMT Instituto Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

³Instituto de Biociências, UFMT Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

Corresponding author:

Patricia Pasquali Parise-Maltempi, Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista, 24A Avenida, 1515, CEP 13506900, Rio Claro, SP, Brazil.

Email: parise@rc.unesp.br

Phone number: +5519 3526-4148

Abstract

Ancistrus is one of the most diverse genera in the Ancistrini tribe, with 64 nominal species. The group is characterized by high cytogenetic variability; the diploid number of chromosomes ranges from $2n = 34$ to $2n = 54$. *Ancistrus* is widely distributed in the basins of the Uruguay, Paraguay, and Amazonian rivers; the latter two regions show the greatest diversity of *Ancistrus* species and karyotypes. Despite these characteristics, the group includes species for which taxonomic identification is difficult, and phylogenetic relationships and phylogeographic patterns, especially in the Paraguay and Amazon basins, have not yet been revealed. In this study, we determined the phylogenetic and phylogeographic relationships among the *Ancistrus* lineages in these regions. In particular, 93 concatenated sequences of mitochondrial *ATPase 6/8* and *COI* as well as nuclear *Rag2* were used for a phylogenetic analysis, and *ATPase 6/8* were used for a phylogeographic analysis. The topology generated by the Bayesian method included three distinct clades subdivided into 21 groups. The clades indicated a monophyletic relationship among the lineages from the Amazon and Paraguay basins. The 21 groups had a high average genetic distance (8.4%) and were structured genetically. In the haplotype network, eight large groups were observed, seven belonging to the Paraguay basin and one corresponding to the Amazon basin, and no haplotypes were shared between the two basins. These results indicate that *Ancistrus* lineages form a monophyletic unit in the Paraguay and Amazon basins, and these lineages have a high level of divergence and genetic isolation. These results corroborate the existence of cryptic species in the region and emphasize the need for a taxonomic revision of the genus in these basins.

Keywords: Catfish, Hypostominae, genetic structure, distance-based tree, taxonomy

Introduction

The Amazon and Paraguay basins are the main water tributaries of Brazil and are responsible for a significant portion of the hydrological drainage of South America [1, 2]. These flood regions also harbor great diversity and rich ichthyology, sheltering species with different trophic structures, sizes, and patterns of migration and locomotion [3, 4].

The Loricariidae superfamily represents one of the largest groups among the neotropical species observed in most Brazilian rivers, with 1078 estimated species and 931 nominal species [5, 6, 7]. The genus *Ancistrus* includes 69 nominal species; it is the most diverse group within Ancistrini and the second most species-rich genus in Loricariidae [5, 8, 9]. The genus is characterized by the absence of plates and odontodes on the leading edge of the snout and the presence of tentacles and well-developed protractile interopercular odontodes [10].

The Amazon and Paraguay basins in the states of Amazonas and Mato Grosso, harbor the largest number and greatest diversity of *Ancistrus* species [11]. Several species in the genus have already been described in this region, and others are in the process of being identified. Based on cytogenetical analyses, these species show substantial variation in the diploid number ($2n = 34$ to $2n = 54$), unlike the species found in the Paraná river basin, which do not show any variation ($2n = 50$) [12]. Species from the Amazon and Paraguay basins also have other interesting cytogenetics features, including the presence of sex chromosome systems (ZZ/ZW and XX/XY), polymorphisms in the nucleolar organizing region, and the occurrence of rearrangements involving pericentric and paracentric inversions [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23].

Molecular tools, including the sequencing of multiple genes, have helped to identify phylogenetic and phylogeographic patterns of fish species [25, 26, 27, 28]. Recent molecular and cytogenetic analyses have enabled the discrimination of cryptic species in the genus *Ancistrus* and have revealed the high diversity of this genus in the Amazon, Paraguay, and Paraná basins [27, 29]. Despite an increase in cytogenetic studies of this group, taxonomic assignments, phylogenetic relationships, and species distributions in the genus remain unclear, particularly in the Amazon and Paraguay basins [30, 31]. In this study, we analyzed the concatenated sequences of nuclear and mitochondrial markers to identify the phylogenetic relationships and phylogeographic patterns of *Ancistrus* lineages from the Amazon and Paraguay basins.

Materials and Methods

Sample collection and DNA amplification

Samples were obtained from 146 *Ancistrus* spp. in 23 populations, including eight populations from the Amazon basin and 15 from the Paraguay basin (Figure 1). All individuals had known diploid numbers, and *Hypostomus commersoni* and *Rhamdia quelen* were used as outgroups. The specimens were deposited in the Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA), and the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Specimen collection was authorized by the Brazilian Environment Ministry through its Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO), under license number 42144-1, and the protocols used in this study were submitted to the Ethics Committee on the Use of Animals in Research (CEUA) of the Universidade Estadual Paulista (UNESP) and approved under protocol number

7913. A total of 91 sequences from different *Ancistrus* species were analyzed; 34 of these sequences represented the Amazon basin, and 112 represented the Paraguay basin. DNA was extracted from the muscles and flippers using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol technique [32] and the NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany).

The mitochondrial genes ATP synthase (*ATPase*) subunits 6 and 8 and cytochrome oxidase subunit I (*COI*) and the nuclear gene *Rag2* were analyzed (Table 1). Polymerase chain reaction (PCR) was conducted using a 13.5 μL solution containing 6.25 μL of PCR Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 5.25 μL of Milli Q water (Millipore, Billerica, MA, USA), 0.5 μL of primer F (10 μM), 0.5 μL of primer R (10 μM), and 1.0 μL of template DNA (200 ng). PCR was performed using a thermocycler (Eppendorf Mastercycler) and consisted of an initial cycle of denaturation at 94°C for 40 s, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, annealing temperature (Table 1) for 40 s, and chain extension at 68°C, and a final extension at 72°C for 5 min. For the sequence analysis, the amplified DNA was purified with the EXOSAP enzyme and subsequently sent for sequencing (MacroGen, Seoul, Korea).

Phylogenetic, phylogeographic, and population analyses

The sequences were aligned using ClustalW in BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.5.3 [35] and DAMBE [36]. For phylogenetic analyses, genetic distances were estimated separately for each data set (*ATPase*, *COI*, and *Rag2*) using the neighbor-joining (NJ) method implemented in MEGA v.6 [37]. Concatenated sequences were obtained using Geneious [38], and a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) approach was utilized to estimate tree topologies using MrBayes v. 3.1.2 [39]. Four simultaneous MCMC analyses were run for 2 million generations under the

general time-reversible (GTR) model of evolution, with a sampling frequency of 100 generations and a heating temperature of 0.2. Log-likelihood stability was reached after approximately 80,000 generations (excluding the first 80,000 trees). The remaining trees were used to compute a 50% majority-rule consensus tree, and the posterior probability values were calculated to determine the level of support for the Bayesian topology.

Phylogeographic and population analyses were performed using the mitochondrial gene ATPase. Haplotype and nucleotide diversity (π) were calculated using DNASP v.5.10.01 [40]. The median-joining algorithm in Network 4.6.1.1 (fluxus-engineering) was used to examine the relationships among haplotypes. Population structure and genetic variation (F_{ST} and AMOVA) were characterized using Arlequin v.3.5 [41].

Results

Molecular characterization

In total, 146 sequences were obtained (ATPase, COI, and Rag2). The ATPase gene was 868 bp, with a nucleotide composition of 28.8% (T), 29.1% (C), 30.1% (A), and 12% (G). The COI gene was 675 bp with a nucleotide composition of 29.4% (T), 24.2% (C), 26.9% (A), and 19.5% (G). The Rag2 nuclear gene was 894 bp with a nucleotide composition of 2.4% (T), 24.1% (C), 26.9% (A), and 24.2% (G).

The concatenated sequence analysis included 91 sequences, of which 64 corresponded to specimens from the Paraguay basin and 27 to specimens from the Amazon basin. The sequences were 3623 bp in total, with a mean nucleotide

composition of 26.9% (T), 25.4% (C), 28.5% (A), and 19.2% (G). There were 1825 variable sites and 918 conserved sites.

Phylogenetic analysis

Independent analyses of mitochondrial and nuclear genes generated topologies similar to those observed in the analysis of concatenated sequences.

Using concatenated sequence data, three clades (I, II, and III) were observed, and these were divided into 21 groups (G1–G21) (Figure 2). Clades I and III were formed exclusively by samples from the Paraguay river basin, and clade II was formed mostly by samples from the Amazon basin, except for three groups that belonged to two localities in the Paraguay basin (Chapada dos Guimarães and Poconé) (Figure 2 and Supplementary Figure S2). The three groups were well-supported, with a posterior probability value of 100%, and clades I and II formed a monophyletic unit (Figure 2b). Clade III, formed by samples from Cuiabá, Cáceres, and Chapada dos Guimarães (Paraguay basin), exhibited a basal position in the topology when compared with clades I and II.

The smaller groups (G1–G21) in the topology were consistent with different collection points within each of the studied basins, i.e., G1 to G10 and G19 to G21 corresponded to points in the Paraguay basin and G11 to G18 corresponded to points in the Amazon basin. The diploid number for individuals in each group was determined (Table 2). The mean genetic distance (p distance) was 0.4% within groups and 8.4% between groups.

Phylogeographic and population analyses

Using mitochondrial ATPase gene sequences, a network of 60 haplotypes formed by individuals from the two basins (Amazon and Paraguay) was generated (Figure 3). The most frequent haplotype (H_3) was detected in 14 individuals from the Paraguay basin. This haplotype was shared by samples from three collection points in the region of Chapada dos Guimarães (Coxipó stream, Peixe river, and Mutuca stream) with a diploid number of $2n = 54$. The other most frequent haplotypes were H_13 of the Amazon basin, detected in ten individuals ($2n = 50$), H_4 of the Paraguay basin, detected in eight individuals (Serra de São Vicente region) ($2n = 50$), and H_5 of the Paraguay basin, detected in eight individuals (Cáceres region) ($2n = 44$).

Haplotype sharing was not observed among individuals from the Amazon and Paraguay basins; accordingly, both locations exhibited a high level of isolation in the network, with the exception of haplotype H_32, which was allocated to the Amazon basin and included samples from the Poconé region (Paraguay basin), with a diploid number of $2n = 34$. In the Paraguay basin network, there was separation among the Chapada dos Guimarães, Serra de São Vicente, and Cáceres regions, with no haplotype sharing among these regions (Figure 3).

F_{ST} values were obtained for all 21 groups identified in the phylogenetic tree (G1–G21) to investigate genetic structure. The F_{ST} indexes for populations in both the Amazon and Paraguay basins varied widely from 0 to 1 (Supplementary Table S1), and these values were statistically significant ($p < 0.05$) for most of the groups in both basins.

An analysis of molecular variation (AMOVA) indicated that there is differentiation among groups I, II, and III, and these groups correspond to the three clades observed in the phylogenetic tree (I, II, and III). AMOVA indicated a total

genetic variance of 0.49, and negative values for the variance between groups, with the greatest proportion of total variance explained by variation within three groups, 0.33% and 67.16%, respectively (Table 3). In addition, the observed differentiation among groups was significant ($p < 0.05$).

Discussion

The genealogy generated using the concatenated sequences of three genes (*ATPase*, *COI*, and *Rag2*) exhibited a topology similar to that observed using mitochondrial genes (*ATPase* and *COI*) independently. These topologies offered a higher resolution than that of topologies generated using the nuclear gene *Rag2*. This difference can be explained by differences in mutation rates, which are lower for nuclear genes than for mitochondrial genes [42].

In the topology inferred from the concatenated sequences, three clades (I, II, and III) were clearly detected. Clades I and II formed a monophyletic unit. Clade I was formed exclusively by samples from the Paraguayan basin, while clade II was formed mostly by samples from the Amazon basin. It is possible to demonstrate the occurrence of monophyly among the *Ancistrus* strains present in the two basins, a condition already described for other traditional groups of Siluriformes, which also represent monophyletic groups [28, 43, 44, 45]. Phylogenies inferred from multiple gene sequences also indicate that the Loricariidae family and some subfamilies (Hypostominae) are monophyletic groups [46, 47]. Other studies of loricariids based on osteological and molecular characters suggest that *Ancistrus* is a monophyletic group within the Ancistrini tribe [48, 49]. Thus, our results obtained using concatenated sequences corroborate the hypothesis of monophyly for the group.

Clade III exhibited a basal position in the phylogeny. This clade consisted exclusively of representatives of the Paraguay basin and was formed by groups G19, G20, and G21; individuals in the last two groups have $2n = 54$ chromosomes. In Loricariidae, species with a diploid number $2n = 54$ and metacentric and submetacentric chromosomes are considered basal [20, 50, 51, 52, 53]. The basal position of the clade with $2n = 54$ chromosomes reinforces the hypothesis that this diploid number is a plesiomorphic characteristic for *Ancistrus*.

The groups that form clades I and II in the topology were characterized by a wide variety of karyotypes; in clade I, diploid numbers of chromosomes ranged from $2n = 42$ to $2n = 54$, and in clade II, they ranged from $2n = 34$ to $2n = 54$. The great variation in diploid numbers is an interesting feature of *Ancistrus* lineages from the Paraguay and Amazon basins [13, 16, 17, 18, 20]. This large karyotypic variability may be a reflection of the high genetic distance observed among the lineages and groups in this study.

Recently, Prizon et al. [29] detected five lineages of *Ancistrus* in the Paraná basin using chromosomal and molecular data. These lineages do not constitute monophyletic groups in the topology and have the same diploid number ($2n = 50$). These results indicate that genetic and chromosomal variation in the group may be related to the geographical distribution of taxa in the studied basins, and the substantial genetic and chromosomal variation observed in the Amazon and Paraguay basins can be attributed to the high isolation among the *Ancistrus* lineages in these regions.

The haplotype network results were consistent with the results of the phylogenetic analysis, indicating clear separation and a high degree of isolation between *Ancistrus* lineages from the Paraguay and Amazon basins. The network showed

separation among the three major groups observed in the phylogeny, clades I, II, and III. The haplotype sub-network corresponding to clade III in the phylogeny was composed of the haplotype H_3 ($2n = 54$), which was the most frequent haplotype in the network and can be considered the ancestral haplotype for the group, reinforcing the hypothesis that the lineages belonging to clade III are the basal lineages for these localities.

The high genetic distances, high degree of isolation according to both the phylogeny and the haplotype network, genetic structure (as determined by F_{ST} and AMOVA), and extensive karyotype variation for the *Ancistrus* lineages provide insight into the biological, ethological, and biogeographic aspects of the group. Fish from the *Ancistrus* group use microhabitats in their life cycle. In this way, they establish territories that consequently reduce their vagility [54, 55]. These characteristics may favor the emergence of isolation mechanisms or barriers to gene flow, which contribute to the occurrence of micro-allopatric speciation [56]. Such events have already been characterized in other fish species, such as African cichlids, which are endemic to the great lakes of East Africa and possess a high degree of genetic and geographic isolation [57, 58].

Geomorphological aspects of the region may have contributed to the observed isolation among lineages. The regions of Serra de São Vicente and Chapada dos Guimarães have rugged relief features, with steep slopes [59, 60]. These characteristics are associated with a high level of biological diversity in various ecosystems [61, 62] and may explain, in part, the chromosomal and genetic differentiation of *Ancistrus* lineages in this region.

In conclusion, our molecular data suggest that the *Ancistrus* lineages form a monophyletic unit in the Paraguayan and Amazonian basins and the diploid number of

54 is a plesiomorphic character for the group. The high genetic distances and genetic structure may reflect the history of physical and biological isolation of the studied *Ancistrus* lineages.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (The São Paulo State Research Foundation) (FAPESP - 2013/17826-9 and 2013/17211-4) for financial support. Instituto Chico mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) for providing the collection license (42144-1). The authors thank Eliana Feldberg and Maelin Silva (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA) for providing samples of *Ancistrus* from the Amazon basin, Dr. Josi Margarete Ponzetto do Nascimento for intellectual communication and Bioedit® for helping with the English language.

References

1. Molinier M, Cudo R.J, Guimarães V (1992) Disponibilidade de água na Bacia Amazônica. In: FOREST 92: Estudos ambientais em florestas Tropicais Úmidas. Rio de Janeiro.
2. ANA – Agência Nacional de Águas (2004) Implementação de práticas de gerenciamento integrado de bacia hidrográfica para o Pantanal e a Bacia do Alto Paraguai: programas de ações estratégicas para o gerenciamento integrado do Pantanal e Bacia do Alto Paraguai. GEF. Relatório Final. Brasília.
3. Muniz CC (2010) Avaliação do papel do pulso de inundação sobre a riqueza e biodiversidade de peixes em ambiente inundável, no sistema de baias Caiçara, porção norte do Pantanal Matogrossense, alto Paraguai. Universidade Federal de São Carlos, SP.
4. Welcomme RL (2000) Fish biodiversity in floodplain and their associated Rivers. In Gopal B, Junk W Davis JA (eds). Biodiversity in wetland assessment, function and conservation Netherlands: Backhuys publishers, p. 61-87.

5. Ferraris Jr, C. J. (2008). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of Siluriform primary types. *Zootaxa* 1418, 1-628.
6. Delapieve ML (2014) Filogenia de Hypoptopomatini (Loricariidae: Hypoptopomatinae). Porto Alegre, RS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
7. Eschmeyer WN (2017) Catalog of fishes. Electronic publication in “World Wide Web”. <http://www.collections.calacademy.org/ich/>.
8. Bifi AG, Pavanelli CS, Zawadzki CH (2009) Three new species of *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Iguaçu basin, Paraná State, Brazil. *Zootaxa* 2275, 41-59.
9. Froese R, D Pauly (2017) FishBase. Available: <http://www.fishbase.se/summary/Loricariidae.html>.
10. Sabaj MH, Armbruster JW, Page LM (1999) Spawning in *Ancistrus* with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. **Ichthyol Explor Freshw** 10: 217-229.
11. Fisch-Muller S (2003) Subfamily Ancistrinae. In Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, 729p.
12. Prizon AC, Borin-Carvalho LA, Bruschi DP, Ribeiro MO, Barbosa LM, Ferreira GEB, Cius A, Zawadzki CH, Portela-Castro ALB (2016) Cytogenetic data on *Ancistrus* sp. (Siluriformes, Loricariidae) of the Paraguay River basin (MS) sheds light on intrageneric karyotype diversification. *Comparat Cytogenet* 10(4): 625–636. doi: 10.3897/CompCytogen.v10i4.8532
13. Alves AL, Oliveira C, Foresti F (2003). Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariidae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia* 56, 57-63.
14. Mariotto S, Artoni RF, Miyazawa CS (2004) Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, MatoGrosso, Brazil. *Caryologia* 57, 327-331.

15. Souza ACP, Nascimento AL, Carvalho JR, Barros RMS, Feldberg E, Nagamachi CY, Pieczarka JC (2004) Karyotypic analysis of *Baryancistrus* aff. *niveatus* (Ancistrinae, Loricariidae) by C-banding, Ag-NOR, CMA3, DAPI and FISH. *Caryologia*; 57, 219-223.
16. Alves AL, Oliveira C Foresti F (2005) Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica* 124, 127-136.
17. Mariotto S, Miyazawa CS (2006) *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomal characterization of four populations and occurrence of sex chromosomes of the type XX/XY, in the Pantanal Basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia* 59(4), 299-304.
18. de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J (2007) Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae). *Neotrop Ichthyol* 5: 301-306.
19. de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J (2008) Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica* 134: 243-249.
20. Mariotto S, Centofante L, Miyazawa CS, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2009) Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotrop Ichthyol* 7: 595-600.
21. Mariotto S, Centofante L, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O (2011) Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comp Cytogenet* 5: 289-300.
22. Mariotto S, Centofante L, Moreira-Filho O (2013) Diversity and chromosomal evolution in the genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae: Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso State, Brazil. *Neotrop Ichthyol* 11 (1): 125-131.

23. Ribeiro MO, Noletto RB, Lorscheider CA, Porto FE, Prizon AC, Zawadzki CH, Oliveira LC, Portela Castro ALB (2015) Cytogenetic description of *Ancistrus abilhoai* (Siluriformes: Loricariidae) from Iguaçú River basin, southern Brazil. *Genet Mol Res* 14, 4051-4057.
24. Favarato RM, da Silva M, de Oliveira RR, Artoni RF, Feldberg E, Matoso DA (2016) Cytogenetic Diversity and the Evolutionary Dynamics of rDNA Genes and Telomeric Sequences in the *Ancistrus* Genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish* 13: 103-111.
25. Yang Z, Rannala B, (2010). Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107: 9264–9269.
26. Habib M, Lakra WS, Mohindra V, Lal KK, Punia P, Singh RK, Khan AA (2012) Assessment of ATPase 8 and ATPase 6 mtDNA Sequences in Genetic Diversity Studies of *Channa Marulius* (Channidae: Perciformes). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biol Sci* 82(4): 497-501.
27. Borba RS, Zawadzki CH, Oliveira C, Perdices P, Parise-Maltempi PP, Alves AL (2013) Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Osteichthyes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the Upper Paraná River basin. *Neotrop Ichtyol* 11(1): 111-116.
28. Ponzetto JM, Alves AL, Varela ES, Villela LCV, Caetano AR, Leonardecz, E (2017) Molecular Phylogeny Inferred from the Concatenated Genes of Two Neotropical Catfish Species and Implications for Conservation. *J Phylogenet Evol Biol* 05: 176-184.
29. Prizon AC, Bruschi DP, Borin-Carvalho LA, Cius A, Barbosa LM, Ruiz HB, Zawadzki CH, Fenocchio AS and Portela-Castro ALdB (2017) Hidden Diversity in the Populations of the Armored Catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná River Basin Revealed by Molecular and Cytogenetic Data. *Front Genet* 8:185. doi: 10.3389/fgene.2017.00185
30. Reis RE, Kullander SO, Ferraris C (2003) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), Porto Alegre, EDIPUCRS.

31. Britski HA, Silimon KZS, Lopes BS (2007) Manual de identificação de peixes do Pantanal Mato-grossense. SPI. Corumbá, MS: EMBRAPA.
32. Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Spring Harbor Laboratory Press. Third Edition.
33. Perdices A, Cunha C, Coelho MM (2004) Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequence. *Mol Phylogenet Evol* 31: 192-203.
34. Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol Ecol Notes* 7: 544-548.
35. Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids* 41:95-98.
36. Xia X, Xie Z (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92: 371-373.
37. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. *Mol Biol Evol* 2725-2729.
38. Kearse M, Moir R, Wilson A, (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647-1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.
39. Huelsenbenck JP, Ronquist FR (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny, *Bioinformatics*, 17: 754-755.
40. Librado P, Rozas J (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

41. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN. Ver 3.0. An integrated software package for population genetic data analysis. *Evol Bioinformatics* 1: 47-50.
42. Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*, first ed. Harvard University Press, Cambridge.
43. de Pinna MCC (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi); historical overview and synthesis of hypothesis. Pp. 279- 330. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil.
44. Hardman M, Hardman LM (2008) The relative importance of body size and paleoclimatic change as explanatory variables influencing lineage diversification rate: an evolutionary analysis of bullhead catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) *Syst Biol* 57:116–130.
45. Villela LCV, Alves AL, Varela ES, Yamagishi MEB, Giachetto PF, Da Silva NMA, Ponzetto JM, Paiva SR, Caetano AR (2017). Complete mitochondrial genome from South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann) and its impact in Siluriformes phylogenetic tree. *Genetica* (Dordrecht. Online) 144: 1-16.
46. Cramer CA, Bonatto SL, Reis RE (2011) Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Mol Phylogenet Evol* 59: 43-52.
47. Lujan NK, Armbruster JW, Lovejoy NK, López-Frenandez H (2015) Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Mol Phylogenet Evol* 82.
48. Schaefer SA (1987) Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus) with a phylogenetic analysis of the loricariid subfamilies (Pisces: Siluroidei). *Natural History Museum of Los Angeles County* 394: 1-31.
49. Montoya-Burgos JI, Muller S, Weber C, Pawlowski J (1998) Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene

sequences. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, edited by Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS Edipucrs, Porto Alegre, RS.

50. Artoni RF, Bertollo LAC (1996) Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49: 81-90.

51. Artoni RF, Bertollo LAC (2001) Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134: 201-210.

52. Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*, 94: 180-186.

53. de Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB, Zuanon J (2009) Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *J Fish Biol*, 75: 2209-2225.

54. Power ME (1984) The importance of sediment in the grazing ecology and size class interactions of an armored catfish, *Ancistrus spinosus*. *Environ Biol Fishes* 10: 173–181. doi: 10.1007/BF00001124

55. Buck S, Sazima I (1995). An assemblage of mailed catfishes (Loricariidae) in south eastern Brazil: distribution, activity, and feeding. *Ichthyol Explor Freshw* 6:325–332.

56. Futuyma DJ (1997) *Evolutionary Biology*. Sinauer, New York.

57. Lewis DSC (1982) A revision of the genus *Labidochromis* (Teleostei: Cichlidae) from Lake Malawi. *Zool J Linn Soc* 75: 189–265.

58. Lowe-McConnell RH (1999) *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. EDUSP, São Paulo.

59. Ross JLS, Santos LM (1982) Geomorfologia. In: MME. Projeto RADAMBRASIL. Vol. 26 - Cuiabá. Rio de Janeiro, MME.

60. Moreira AAN (1977) Relevo. In: IBGE. *Geografia do Brasil, Região Centro-Oeste* (Vol. 4) p. 1-34. Rio de Janeiro.

61. Shugart HH (1984) A theory of forest dynamics: the ecological implications of forest succession models. Springer-Verlag, New York.
62. Richards PW (1996) The tropical rainforest. 2th ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Primers	Sequences of primers	Ta (°C)	References
L8331 – F (ATPase)	AA GCR TYR GCC TTT TAA GC	55	Perdices et al. 2002
H92326 – R (ATPase)	GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC		
VF1 (COI)	TTC TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GG	50	Ivanova et al. 2007
VR1 (COI)	TAG ACT TCT GGG TGG-3		
Rag2 F	TGY TAT CTC CCA CCT CTG CGY T	55	Hardman 2004
Rag2 R	TCA TCC TCC TCA TCK TCC TCW TT		
Table 1: Sequences of primers used in the samples amplification. Ta: Annealing temperature; F: Forward; R: Reverse.			

Group	Diploid number	Collect points	Basin
G 1	2n=44	Flecha stream	Paraguay
G 2	2n=54	Pari stream	Paraguay
G 3	2n=42	Vermelho river	Paraguay
G 4	2n=50	Cupim/Macaco stream	Paraguay
G 5	2n=44	Tamanduá stream	Paraguay
G 6	2n=44	Currupeira stream	Paraguay
G 7	2n=52	Tangará stream	Paraguay
G 8	2n=54	Peixe stream	Paraguay
G 9	2n=54	Pari/Mutuca stream	Paraguay
G 10	2n=54	Mutuca stream	Paraguay
G 11	2n=50	Matrinã river (<i>Ancistrus trombador</i>)	Amazon
G 12	2n=50	Preto river (<i>Ancistrus trombador</i>)	Amazon
G 13	2n=34	Catalão	Amazon
G 14	2n=34	Arrombado	Amazon
G 15	2n=38	Trombetas stream	Amazon
G 16	2n=46	Igarapé Macoari (<i>Ancistrus maximus</i>)	Amazon
G 17	2n=52	Iguarapé Dimona (<i>Ancistrus dolichopterus</i>)	Amazon
G 18	2n=46	Iguarapé Barritinho (<i>Ancistrus dubius</i>)	Amazon
G 19	2n=42	Sangradouro/Santa Cruz/Flecha stream	Paraguay
G 20	2n=54	Soberbo/Peixe stream	Paraguay
G 21	2n=54	Soberbo/Coxipo stream	Paraguay

Table 2: Relation of groups (G 1 to G 21) with diploid number and collection points.

	G 1	G 2	G 3	G 4	G 5	G 6	G 7	G 8	G 9	G 10	G 11	G 12	G 13	G 14	G 15	G 16	G 17	G 18	G 19	G 20	G 21
G 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 2	0.88832	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 3	1.00000	0.50000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 4	1.00000	0.83133	1.00000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 5	0.82470	0.22581	0.52941	0.76068	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 6	1.00000	0.50000	1.00000	1.00000	0.52941	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 7	0.87295	0.34426	0.64179	0.82390	0.41667	0.64179	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 8	1.00000	0.50000	1.00000	1.00000	0.52941	1.00000	0.64179	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 9	0.79114	0.00000	0.36842	0.70833	0.18644	0.36842	0.28205	0.36842	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 10	1.00000	0.64706	1.00000	1.00000	0.61290	1.00000	0.70732	1.00000	0.50000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 11	1.00000	0.72414	1.00000	1.00000	0.66667	1.00000	0.75000	1.00000	0.57895	1.00000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 12	1.00000	0.77273	1.00000	1.00000	0.70588	1.00000	0.78102	1.00000	0.63415	1.00000	1.00000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 13	0.87160	0.20755	0.57143	0.81579	0.33333	0.57143	0.42857	0.57143	0.16667	0.66667	0.72414	0.76378	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 14	1.00000	0.50000	1.00000	1.00000	0.52941	1.00000	0.64179	1.00000	0.36842	1.00000	1.00000	1.00000	0.57143	-	-	-	-	-	-	-	-
G 15	0.88832	0.00000	0.50000	0.83133	0.22581	0.50000	0.34426	0.50000	0.00000	0.64706	0.72414	0.77273	0.20755	0.50000	-	-	-	-	-	-	-
G 16	1.00000	0.72414	1.00000	1.00000	0.66667	1.00000	0.75000	1.00000	0.57895	1.00000	1.00000	1.00000	0.72414	1.00000	0.72414	-	-	-	-	-	-
G 17	0.88832	0.00000	0.50000	0.83133	0.22581	0.50000	0.34426	0.50000	0.00000	0.64706	0.72414	0.77273	0.20755	0.50000	0.00000	0.72414	-	-	-	-	-
G 18	0.82470	0.22581	0.52941	0.76068	0.33333	0.52941	0.41667	0.52941	0.18644	0.61290	0.66667	0.70588	0.33333	0.52941	0.22581	0.66667	0.22581	-	-	-	-
G 19	0.58182	0.12205	0.34200	0.51665	0.22688	0.34200	0.28538	0.34200	0.10684	0.40377	0.44227	0.47149	0.21870	0.34200	0.12205	0.44227	0.12205	0.22688	-	-	-
G 20	0.77295	0.11111	0.42029	0.69499	0.25000	0.42029	0.33333	0.42029	0.09244	0.52000	0.58333	0.62963	0.23967	0.42029	0.11111	0.58333	0.11111	0.25000	0.16480	-	-
G 21	1.00000	0.80645	1.00000	1.00000	0.73626	1.00000	0.80488	1.00000	0.67568	1.00000	1.00000	1.00000	0.79310	1.00000	0.80645	1.00000	0.80645	0.73626	0.49568	0.66574	-

Supplementary table 1: FST values among pairwise of G 1 to G 21 groups, $p < 0.05$ (significant values).

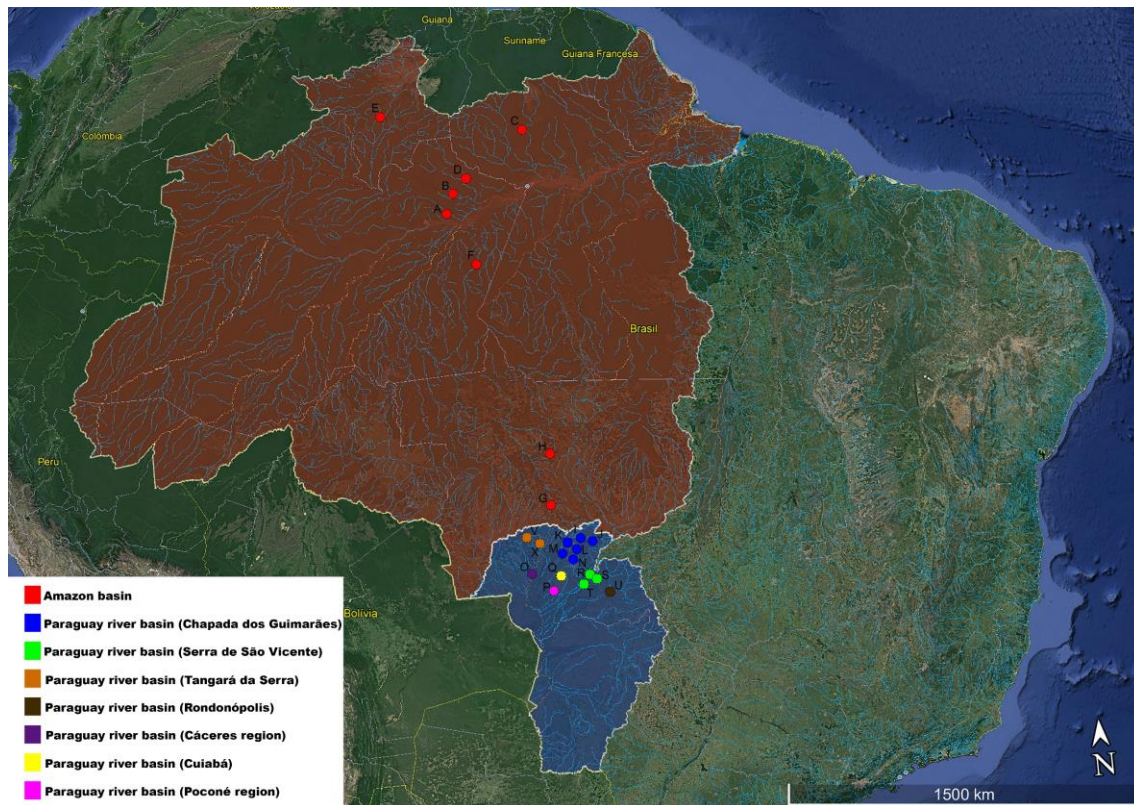


Figure 1: Map of the Amazon and Paraguay hydrographic systems showing the collection points (colorful circles). Amazon basin: A (Catalão), B (Igarapé Dimeni), C (Igarapé Trombetas), D (Igarapé Barretinho), E (Igarapé Mocoari), F (Juma river), G (Matrinxã stream) and H (Preto river). Paraguay basin: I (Coxipó stream), J (Rio do Peixe), K (Soberbo stream), L (Mutuca stream), M (Sagradoiro stream), N (Pari river), O (Flecha stream), P (Baia do Arrombado), Q (Santa Cruz stream), R (Cupim stream), S (Macaco stream), T (Tamanduá stream), U (Vermelho stream), V (Tangará stream) and X (Currupira stream). The red shading delimits the Amazonian hydrographic region and the blue shading delimits the Paraguay hydrographic region.

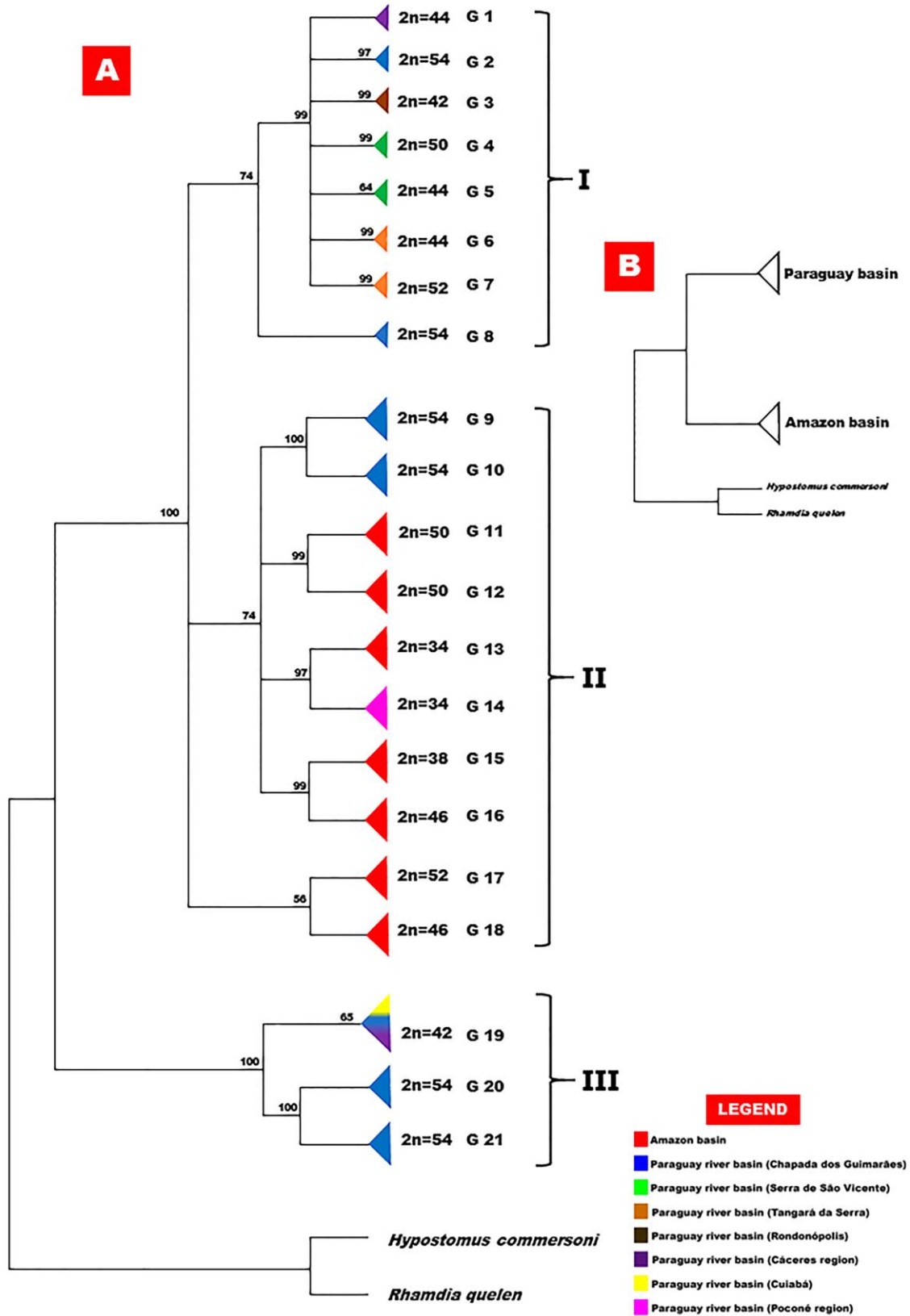
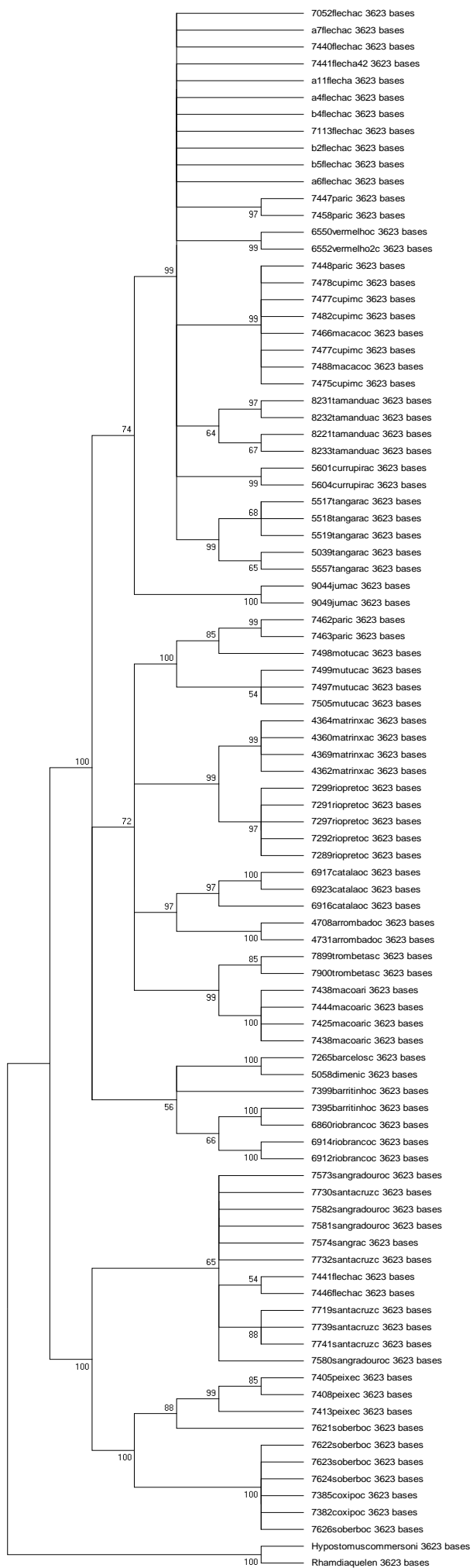


Figure 2: A) Phylogenetic relationship among *Ancistrus* lineages based on Bayesian analysis of concatenated sequences (*ATPase*, *COI* and *Rag2*). B) Monophyletic relationship among Paraguay and Amazon basins lineages.



Supplementary Figure S2: Phylogenetic relationship among *Ancistrus* lineages based on Bayesian analysis of concatenated sequences (*ATPase*, *COI* and *Rag2*).

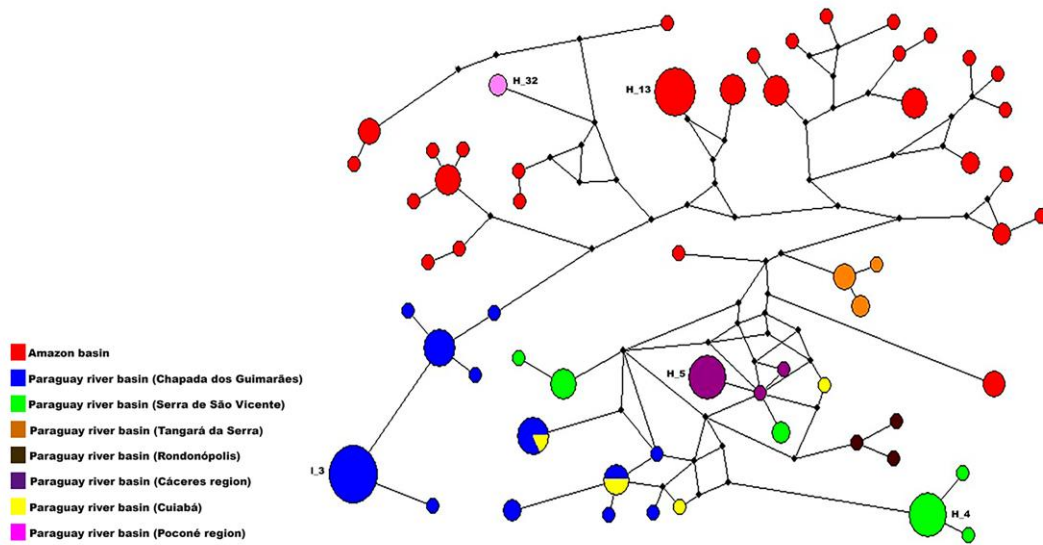


Figure 3: Network haplotypes depicting the relationship of *Ancistrus* lineages from Paraguay and Amazon basins.

5.0 CONCLUSÕES FINAIS

- As linhagens de *Ancistrus* estudadas, além de possuírem uma grande variação do número diploide e da morfologia dos cromossomos, possui também altos níveis de distância genética entre si, características que podem ser explicadas por aspectos biológicos da espécie, como sua baixa vagilidade e alto grau de isolamento geográfico;
- Com a técnica de DNA barcoding foi possível discriminar nove linhagens de *Ancistrus* na bacia do rio Paraguai, e seis linhagens na bacia Amazônica;
- Os resultados obtidos pela técnica de DNA barcoding também aponta a existência de espécies crípticas em ambas as bacias hidrográficas, como é o caso do córrego Mutuca (bacia do Paraguai), onde as linhagens apresentam ambas $2n=54$ cromossomos, porém possuem alto nível de distância genética entre si;
- A análise concatenada das sequências apontou a ocorrência de uma unidade monofilética entre as linhagens das bacias do rio Paraguai e Amazônica;
- A análise filogenética também ajudou a corroborar a hipótese do número diploide basal do grupo de $2n=54$ cromossomos, característica que é observada nas linhagens provenientes da bacia do Paraguai;
- As linhagens de *Ancistrus* apresentam alto grau de isolamento genético, e não foi observado compartilhamento de haplótipos entre as duas bacias estudadas, de modo que as linhagens se apresentam bem estruturadas dentro das mesmas, o que os indícios de alto grau de isolamento geográfico entre as linhagens.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariidae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*, v. 56, p. 57-63, 2003.

ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariidae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*, v. 56, p. 57-63, 2003. ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica*, v. 124, p. 127-136, 2005.

ANA – Agência Nacional de Águas. 2004. Implementação de práticas de gerenciamento integrado de bacia hidrográfica para o Pantanal e a Bacia do Alto Paraguai: programas de ações estratégicas para o gerenciamento integrado do Pantanal e Bacia do Alto Paraguai. GEF. Relatório Final. Brasília. 513 pp.

ARMBRUSTER, J.W. Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Hypostominae and Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 141, p. 1-80, 2004.

AVISE, J.C. Molecular markers, natural history and evolution. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 541, 2004.

BALLARD J.W.O.; WHITLOCK M. C. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, v. 13, p. 729-744, 2004.

BATISTA, J.C.; ALVES-GOMES, J. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research*, v. 5, n. 4, p. 723-740, 2006.

BEERKIRCHER, L.; AROCHA, F.; BARSE, A.; PRINOE, E.; RESTREPO, V.; SERAFY, J.; SHIVJI, M. S. Effects of species misidentification on population assessment of overfished white marlin *Tetrapturus albidus* and roundscale spearfish *T. georgii*. *Endangered Species Research*, v. 9, p. 81-90, 2009.

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

BONAPARTE, C.L.J.L. Saggio di una distribuzione metódica degli animal vertebrati. *G. Arcadio Science*, v.49, p. 1-77, 1831.

BORBA, R.S.; ZAWADZKI, C.H.; OLIVEIRA, C.; PERDICES, P.; PARISEMALTEMPI, P.P.; ALVES, A.L. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Osteichthyes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the Upper Paraná River basin. *Neotropical Ichthyology*, v.11, n.1, p. 111-116, 2013.

BRANDÃO, J.H.S.G.; BITENCOURT, J.A.; SANTOS F.B.; WATANABE, L.A.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; AFFONSO, P.R.A.M. DNA barcoding of coastal ichthyofauna from Bahia, northeastern Brazil, South Atlantic: high efficiency for systematics and identification of cryptic diversity. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 65, p. 214–224, 2016.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. Manual de identificação de peixes do Pantanal Mato-grossense. SPI. Corumbá, MS: EMBRAPA, p.184, 2007.

BRITTO, M.R. Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, p. 512, 2003.

BRITZKI, R. Relações filogenéticas do gênero *Apistogramma* (Teleostei: Cichidae) e filogeografia da espécie *Apistogramma agassizzi*. Tese de Doutorado, UNESP Botucatu, 2015.

BURGES, W.E. An atlas of freshwater and marine catfishes a preliminary survey of the Siluriformes. T.F.H. Publications, Neptune, NJ. 1989.

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

COWEN, R.K.; SPONAUGLE, S. Larval dispersal and marine population connectivity. *The Annual Review of Marine Science*, v. 1, p. 443-66, 2009.

CRAMER, A.C. Filogenia de duas subfamílias de cascudos (Siluriformes, Loricariidae), usando dados nucleares, mitocondriais e morfológicos. Tese de Doutorado, p. 1-121, 2009.

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

DAWNAY, N., OGDEN, R., MCEWING, R., CARVALHO, G.R.; THORPE, R.S. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International*, p. 1-7, 2007.

DE OLIVEIRA, R.R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M.B.; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, v. 5. p. 301-306, 2007.

DE OLIVEIRA, R.R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *Journal of Fish Biology*, v. 75, p. 2209-2225, 2009.

DE OLIVEIRA, R.R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M.B.; ZUANON, J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of

the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica*, v. 134, p. 243-249, 2008.

DE OLIVEIRA, R.R.; SOUZA, I.L.; VENERE, P.C. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotropical Ichthyology*, v. 4. p. 93-97, 2006.

DE PINNA, M.C.C. Phylogenetic relations of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, edited by MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. Edipucrs. Porto Alegre, RS, p. 279-330, 1998.

DE LAPIEVE, M.L.S. Filogenia de Hypoptopomatini (Loricariidae: Hypoptopomatinae). Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

DESALLE, R.; EGAN, M.G.; SIDDALL, M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v.360, p. 1905-1916, 2005

DOMINGUEZ, R.R.; AMORIM, A. F.; HILSDORF, A.W.S. Genetic identification of *Carcharhinus* sharks from the southwest Atlantic Ocean (Chondrichthyes: CARCHARHINIFORMES). *Journal of Applied Ichthyology*. ISSN 0175–8659, 2013.

EBACH, M.C., HOLDREGE, C. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature*, v. 434, p.697, 2005.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v.32, p. 1792-1797, 2004.

EGUIARTE, L.E.; SOUZA, V.; AGUIRRE, X. *Ecología molecular*. México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología, SEMANART, 608 p, 2007.

EIGENMANN, C.H.; R. EIGENMANN S. 1890. A revision of the South America Nematognathi or catfishes. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, v.1, n.2, p. 1-508, 1890.

EIGENMANN, C.H. Reports on the expedition to British Guiana of the Indiana University and the Carnegie Museum, 1908. Report no. 1. Some new genera and species of fishes from British Guiana. *Annals of Carnegie Museum*, v.6, n.1, p. 4-54, 1909.

ESCHMEYER, W. Catalog of fishes. Electronic publication in “World Wide Web”. Available at <http://www.calacademy.org/research/ichthyology/catalog>. Acessado, Novembro, 2016.

ESCHMEYER, W.N., FONG, J.D. Species by family/subfamily. Catalog of Fishes <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> Electronic version acessado em 24 de Novembro 2016.

FAVARATO, R.M.; SILVA, M.; DE OLIVIERA, R.R; ARTONI, R. F.; FELDBERG, E.; MATOSO, D. A. Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish*, v. 13, 2016.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, v. 39, p. 783-791, 1985.

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

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

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 72, p. 297-353, 1981.

FISCH-MULLER, S. subfamily Ancistrinae. In Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 729, 2003.

FISCH-MULLER, S.; CARDOSO, A.R.; SILVA, J.F.P.; BERTACO, V.A. Three new species of *Ancistrus* Kner (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) from the upper Tapajós and Tocantins rivers. *Revue Suisse de Zoologie*, v. 112, n. 2, p. 559-572, 2005b.

FISCH-MULLER, S.; CARDOSO, A.R.; SILVA, J.F.P.; BERTACO, V.A. Two new Amazonian species of armored catfishes (Siluriformes:Loricariidae): *Ancistrus verecundus* and *Ancistrus parecis*. *Neotropical Ichthyology*, v. 3, n. 4, p. 325-332, 2005a.

FREDERICO, R.G.; FARIAS, I.P.; ARAÚJO, M L.G.D.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALVES-GOMES, J.A. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, v. 10, n.1, p. 71–80, 2012.

FROESE, R.; PAULY D. 2016. FishBase. [Version 01/2016] www.fishbase.org. Acessado em Novembro de 2016.

GARESSE, R; CARRODEGUAS, J.A.; SANTIAGO, J.; PEREZ, M. L.; MARCO, R.; VALLEJ, C.G. *Artemia* mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 117, p. 357-366, 1997.

GILLETT, C.P.D.T., CRAMPTON-Platt, A., TIMMERMANS, M.J.T.N., JORDAL, B.H., EMERSON, B.C.; VOGLER, A.P. Bulk de novo mitogenome assembly from pooled total DNA elucidates the phylogeny of weevils (Coleoptera: Curculionoidea). *Molecular Biology and Evolution*, v. 31, p. 2223–2237, 2014.

- GÜNTHER, A. Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiatidae in the collection of the British Museum. Trustees, London, v.22, p. 455, 1864.
- HABIB, M.; LAKRA, W.S.; MOHINDRA, V.; LAL, K.K.; PUNIA, P.; SINGH, R.K.; KHAN, A.A. 2012. Assessment of ATPase 8 and ATPase 6 mtDNA Sequences in Genetic Diversity Studies of *Channa Marulius* (Channidae: Perciformes). Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences v. 82, n. 4, p. 497-501, 2012.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids*, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HARRIS, M.B.; TOMAS, W.M; MOURÃO, G.; DA SILVA, C.J.; GUIMARÃES, E.; SONODA, F.; FACHIM, E. Desafios para proteger o Pantanal brasileiro: ameaças e iniciativas em conservação. *Megadiversidade*, v. 1, n.1, p. 156-164, 2005.
- HASHIMOTO, S. Análises moleculares em *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae): limites taxonômicos e relações intragenéricas. Tese de Doutorado, INPA Manaus, 2015.
- HEWITT, G.M. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, v. 10, n. 3, p. 537-549, 2001.
- HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; GARCIA-DAVILA, C.; PAUGY, D.; RENNO, J.F. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 2115-2136, 2007.
- ISBRÜCKER, I. J. H. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Verslagen en Technische Gegevens*, v.22, p. 1-181, 1980.
- ISBRÜCKER, I.J.H.; NIJSSEN, H. Sexual dimorphisms bei Harnischwelsen (Loricariidae). *DATZ-Sonderheft*, p.19-33, 1992.
- IVANOVA, N.V.; ZEMLAK, T.S.; HANNER, R.H.; HEBERT, P.D.N. (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, v.7, p. 544-548, 2007.
- JORDAN, C.F. Soils of the Amazon rainforest. In: G. T. Prance & T.E. Lovejoy (Ed.) *Amazônia*. Oxford, IUCN/Pergamon Press, p. 83-94, 1985.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p.111-120, 1980.
- KNAACK, J. New *Ancistrus* species from the Rio Cuiaba system, Brazil (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Tropical Fish Hobbyist*, v.47, p. 150-155, 1999.

KNER R. Über die Hypostomiden, oder zweite Hauptgruppe der Panzerfische. Sitzungsberichten der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe, v. 10, p. 279-282, 1853.

KNER, R. Die Hypostomiden Zweite Hauptgruppe der familie der panzerfische (Loricata vel Goniodontes). Denks Kaiser Akad Wissens Wien, mathem. Naturwissen. Classe AM, v. 31, p. 65-98, 1854.

LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M.L.J.; TEDESCO, P.A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, v. 595, p. 545-567, 2008.

LEWIN, B. *Genes V*. Oxford University Press Inc., New York, p. 1272, 1994.

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

LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, v.18, p. 65-66, 2003.

LOVEJOY, N.R.; DE-ARAÚJO, M.L.G. Molecular systematic, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology*, v. 9, n. 3, p. 259-268, 2000.

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

LUNDBERG, J. G. et al. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American Rivers. In: MALABARBA L. R. et al. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs, 1998. p. 13–48.

MARIOTTO, S. CENTOFANTE, L. MOREIRA-FILHO, O. Diversity and chromosomal evolution in the genus *Ancistrus* Kner, 1854(Loricariidae: Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v.11, n.1, p.125-131, 2013

MARIOTTO, S. Estudo citogenético clássico e molecular em quinze espécies da tribo Ancistrini (Siluriformes: Loricariidae) de três bacias hidrográficas brasileiras. 2008. 106f. Tese doutorado (Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MARIOTTO, S.; ARTONI, R.F.; MIYAZAWA, C.S. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, MatoGrosso, Brazil. *Caryologia*, v. 57, p. 327-331, 2004.

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

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

MARIOTTO, S.; MIYAZAWA, C.S. *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of 53 sexual chromosomes of type XX/XY, in the pantanal basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia*, v. 59, n. 4, p. 299–304, 2006.

MARTÍNEZ-ORTEGA, M.M.; LUIS, D.; ALBACH, D.C.; ELENA-ROSSELLO, J.A. e RICO, E. Species boundaries and phylogeographic patterns in cryptic taxa inferred from AFLP markers: *Veronica* subgen. *Pentasepalae* (Scrophulariaceae) in the Western Mediterranean. *Systematic Botanic*, v. 29, n. 4, p. 965-986, 2004.

MEJÍA, O.; LEÓN-ROMERO, Y.; SOTO-GALERA, E. DNA barcoding of the ichthyofauna of Pánuco–Tamesí complex: Evidence for taxonomic conflicts in some groups. *Mitochondrial DNA*, v. 23, p. 471-476, 2012

MEMEDE, S.B.; ALHO, C.J.R. Response of wild mammals to seasonal shrinking-and-expansion of habitats due to flooding regime of the Pantanal, Brazil. *Brazilian Journal of Mammal*, v. 66, p. 991-998, 2006.

MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. n. 2. p. 1-38, 1993.

MIRANDA RIBEIRO, A.; Loricariidae, Callichthyidae, Doradidae e Trichomycteridae. In: Comissão de Linhas Telegráficas Estratégicas de Matto-Grosso ao Amazonas, p. 1-31, 1912.

MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; GIL, P.A.; PILGRIM, J. *Wilderness: Earth's last wild places*. Mexico: CEMEX. 573 p, 2002.

MIYA, M.; TAKESHIMA, H.; ENDO, H.; ISHIGURO, N. B.; INOUE, J.G.; MUKAI, T.; SATOH, T.P.; YAMAGUCHI, M.; KAWAGUCHI, A.; MABUCHI, K.; SHIRAI, S.M.; NISHIDA, M. Major Patterns of Higher Teleostean Phylogenies: a New Perspective Based on 100 Complete Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 26, n. 1, p. 121-38, 2003.

MOLINIER, M.; CUDO, R.J.; GUIMARÃES, V. Disponibilidade de água na Bacia Amazônica. In: *FOREST 92: Estudos ambientais em florestas Tropicais Úmidas*. Rio de Janeiro, 1992.

MONTOYA-BURGOS, J.I.; MULLER, S.; WEBER, C. e PAWLOWSKI, J. Historical biogeography of the catfishes genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* v.12, p. 1855-1867, 2003.

MONTOYA-BURGOS, J.I.; MULLER, S.; WEBER, C.; PAWLOWSKI, J. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, edited by

MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. Edipucrs, Porto Alegre, RS. p. 363-375, 1998.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLOS Biology*, v.2, n.10, p. 1529-1531, 2004.

MORTATTI, J. Erosão na Amazônia: processos, modelos e balanço. Tese de LivreDocência, ESALQ, Universidade de São Paulo. 154 p, 1995.

MULLER, S. Description de deux nouvelles espèces paraguayennes du genre *Ancistrus* Kner, 1854 (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue suisse de Zoologie, Annales de la Société zoologique suisse et du Muséum d'Histoire naturelle de Genève*, v. 96, p. 885-904. 1989.

MUNIZ, C.C. Avaliação do papel do pulso de inundação sobre a riqueza e biodiversidade de peixes em ambiente inundável, no sistema de baías Caiçara, porção

norte do Pantanal Matogrossense, alto Paraguai. Tese de Doutorado (Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Federal de São Carlos, SP, p. 82, 2010.

NASCIMENTO, M.H.S.; ALMEIDA, M.S.; VEIRA, M.N.S.; LIMEIRA FILHO, D.; LIMA, R.C.; BARROS, M.C.; FRAGA, E.C. DNA barcoding reveals high levels of genetic diversity in the fishes of the Itaipuru Basin in Maranhão, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n.3, gmr.15038476, 2016.

NELSON, J. S. *Fishes of the World*. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA. 601 p, 2006.

OGDEN, R., DAWNAY, N., MCEWING, R. Wildlife DNA Forensics Bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research*, v. 9, p. 179-195, 2009.

PANCHAL, M. The automation of Nested Clade Phylogeography Analysis. *Bioinformatics Applications Note*, v.23, n.4, p. 509-510, 2007.

PATERNELLO, T.; MARCATO, S.; ZANE, L.; VAROTTO, V.; BARGELLONI, L. Phylogeography of the *Chionodraco* genus (Perciformes, Channichthyidae) in the Southern Ocean. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, v. 28, p. 420-429, 2003.

PAXTON, J.R.; ESCHMEYER, W.N. *Encyclopedia of fishes*. Academic Press, San Diego, 1995.

PERDICES, A.; CUNHA, C.; COELHO, M.M. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequence. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, v. 31, p. 192-203, 2004.

PEREIRA, L.H.G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BCM Genetics*, v.14, 2013. doi:10.1186/1471-2156-14-20, 2013.

PIORSKI, N.M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L.F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P.D. e GALETTI JR., P.M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Brazilian Journal of Biology*. v. 68, n. 4, p. 1039-1050, 2008.

PONZETTO, J.M.; BRITZKE, R.; NIELSEN, D.T.B.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; ALVES, A.L. Phylogenetic relationships of *Simpsonichthys* subgenera (Cyprinodontiformes, Rivulidae), including a proposal for a new genus. *Zoologica Scripta*, v. 45, 2016.

PONZETTO, J.M.; ALVES, A.L.; VARELA, E.S.; VILLELA, L.C.V.; CAETANO, A.R.; LEONARDECZ, E. Molecular Phylogeny Inferred from the Concatenated Genes of Two Neotropical Catfish Species and Implications for Conservation. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology* v. 05, p. 176-184, 2017.

POSADA, D.; CRANDALL K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, v. 14, p. 817-818, 1998.

PRIZON, A.C.; CARVALHO, L.A.B.; BRUSCHI, D.P.; RIBEIRO, M.O.; BARBOSA, L.M.; FERREIRA, G.E.B.; CIUS, A.; ZAWADZKI, C.H.; PORTELA-CASTRO, A.L. B. Cytogenetic data on *Ancistrus* sp. (Siluriformes, Loricariidae) of the Paraguay River basin (MS) sheds light on intrageneric karyotype diversification. *Comparative Cytogenetics*, v. 10, p. 625-636, 2016.

PRIZON, A.C.; BRUSCHI, D.P.; BORIN-CARVALHO, L.A.; CIUS, A.; BARBOSA, L.M.; RUIZ, H.B.; ZAWADZKI, C.H.; FENOCCHIO, A.S.; PORTELA-CASTRO, A.L.D.B. () Hidden Diversity in the Populations of the Armored Catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná River Basin Revealed by Molecular and Cytogenetic Data. *Frontiers in Genetics*, v. 8, p. 185, 2017. doi: 10.3389/fgene.2017.00185

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, v. 7, p. 355-364, 2007.

REGAN, C.T. A monograph of the fishes of the family Loricariidae. *Transactions of the Zoological Society, London* v. 17, p. 191-350, 1904.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P. ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, doi:10.1111/jfb.13016, 2016.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), Porto Alegre, EDIPUCRS, p. 729, 2003.

REIS, R.E.; PEREIRA, E.H.L. e ARMBRUSTER, J.H. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei: Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 143, p.277-299, 2006.

REYNOLDS, L. K.; MCGLATHERY, K. J.; WAYCOTT, M. Genetic Diversity enhances Restoration Success by Augmenting Ecosystem Services. *PLoS ONE* 7, e38397, 2012.

RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: An example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, v. 4, n. 2, p. 225–246, 2006.

RIBEIRO, A.O.; CAIRES, R.A.; MARIGUELA, T.C.; PEREIRA, L.H.G.; HANNER, R.; OLIVEIRA O. DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. *Molecular Ecology Resources*, v. 12, p. 1012-1020, 2012.

RIBEIRO, M.O.; NOLETO, R.B.; LORSCHIEDER, C.A.; PORTO, F.E.; PRIZON, A. C.; ZAWADZKI, C.H.; OLIVEIRA, L.C.; PORTELA CASTRO, A.L.B. Cytogenetic description of *Ancistrus abilhoai* (Siluriformes: Loricariidae) from Iguaçu River basin, southern Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, p. 4051-4057, 2015.

RICHEY, J.E.; NIERTES, L.A.K.; DUNNE, T.; VICTORIA, R.L.; FORSBERG, B.R.; TANCREDI, A.C.N.S.; OLIVEIRA, E. Sources and routing of the Amazon river flood wave. *Global Biogeochemical Cycles*, v. 3, n.3, p. 191-204, 1989.

ROXO, F.F.; ZAWADZKI, C.H.; TROY, W.P. Description of two new species of *Hisonotus* Eigenmann & Eigenmann, 1889 (Ostariophysi, Loricariidae) from the rio Paraná-Paraguay basin, Brazil. *Zookeys*, v. 395, p. 57-78, 2014.

ROXO, F.R.; ZAWADZKI, C.H.; SILVA, G.C.; CHIACHIO, M.C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, O. Molecular systematics of the armored neotropical catfish subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa*, v. 3390, p. 33-42, 2012.

RULL, V. Speciation timing and Neotropical biodiversity: The Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology*, v. 17, n. 11, p. 2722-2729, 2008.

SABAJ, M.H.; ARMBRUSTER, J.W.; PAGE, L.M. Spawning in *Ancistrus* with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. *Ichthyology Exploration of Freshwaters*, v. 10, n. 3, p. 217-229, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL D.W. *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Cold New York: Spring Harbor Laboratory Press. Third Edition, 2001.

SARMENTO-SOARES, L.M.; INGÊNITO, L.F.S. Ancistrinae. In: *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil.* Rio de Janeiro: Museu Nacional, p. 98-102. 2007.

SCHAEFER, S.A. Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus) with a phylogenetic analysis of the loricariid subfamilies (Pisces: Siluroidei). *Natural History Museum of Los Angeles County*, v. 394, p. 1-31, 1987.

SOUZA, A.C.P.; NASCIMENTO, A.L.; CARVALHO, J.R.; BARROS, R.M.S.; FELDBERG, E.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C. Karyotypic analysis of *Baryancistrus aff. niveatus* (Ancistrinae, Loricariidae) by C-banding, Ag-NOR, CMA3, DAPI and FISH. *Caryologia*, v. 57, p. 219-223, 2004.

STALLARD, R.F. & EDMOND, J. Geochemistry of the Amazon basin. 2. The influence of the geology and weathering environment on the dissolved load. *Journal of Geophysical Research*, v. 88, p. 9671-9688, 1983.

STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics*, v. 73, p. 1162–1169, 2003.

STEPHENS, M.; SMITH, N.J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, v. 68, p. 978–989, 2001.

STRECKER, U.; FAÚNDEZ, V.H.; WILKENS, H. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, v. 33, p. 469-481, 2004.

SWOFFORD, D.L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Massachusetts, 2003.

TAGLIACOLLO, V. A. et al. Biogeographical signature of river capture events in Amazonian lowlands. *Journal of Biogeography*, v. 42, n. 12, p. 1–14, 2015.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, p. 2731–2739, 2011

TAPHORN, D.C.; ARMBRUSTER, J.W.; RODRÍGUEZ-OLARTE, D. *Ancistrus falconensis* n. sp. and *A. gymnorhynchus* Kner (Siluriformes: Loricariidae) from central Venezuelan Caribbean coastal streams. *Zootaxa*, v. 2345, p. 19-32, 2010.

TAPHORN, D.C.; ARMBRUSTER, J.W.; VILLA-NAVARRO, F.; RAY, C.K. TransAndean *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa*, v. 3641, n. 4, p.343-370, 2013.

TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. 111. Cladogram estimation. *Genetics*, v. 132, p. 619633, 1992.

VILA, C.; MALDONADO, J. E.; WAYNE, R. K. Phylogenetic Relationships, Evolution and Genetic Diversity of the Domestic Dog. *The American Genetic Association*, v.90, p.71-77, 1997.

VILLELA, L.C.V.; ALVES, A.L.; VARELA, E.S.; YAMAGISHI, M.E.B.; GIACHETTO, P.F.; DA SILVA, N.M.A.; PONZETTO, J.M.; PAIVA, S.R.; CAETANO, A.R. Complete mitochondrial genome from South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann) and its impact in Siluriformes phylogenetic tree. *Genetica* (Dordrecht. Online) v. 144, p. 1-16, 2017.

- WANG, J.; LIN, H.; HUANG, S.; PAN, C.; CHEN, X.; CHIANG, T. Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymas. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, v. 31, p. 1143-1156, 2004.
- WARD, R.D. Genetics in Fisheries Management. *Hydrobiology*, v. 420, p. 191-201, 2000.
- WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 360, p. 1847-1857, 2005
- WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, v. 29, p. 188-197, 2007.
- WELCOMME, R.L. Fish biodiversity in floodplain and their associated Rivers. In GOPAL, B.; JUNK, W.; DAVIS, J. A. (eds). *Biodiversity in wetland assessment, function and conservation* Netherlands: Backhuys publishers, p. 61-87, 2000.
- WILLIS, S.; NUNES, M.S.; MONTANA, C.; FARIAS, I.P.; LOVEJOY, N. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, v. 44, p. 291-307, 2007.
- WONG, L.L; PEATMAN E.; LU, J.; KUCUKTAS, H; He S., et al. DNA Barcoding of Catfish: Species Authentication and Phylogenetic Assessment. *PLoS ONE* 6(3): e17812, 2011.
- XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, v. 92, p. 371-373, 2001.