

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI
E DAS MISSÕES
URI – CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

PRISCILA MEZZOMO

Revisão do uso de marcadores genéticos e moleculares dentro do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) e avaliação da eficiência de diferentes protocolos na extração de DNA de *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836).

ERECHIM, JANEIRO DE 2019.

PRISCILA MEZZOMO

Revisão do uso de marcadores genéticos e moleculares dentro do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) e avaliação da eficiência de diferentes protocolos na extração de DNA de *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia (Área de Concentração: Gestão e Conservação Ambiental).

Linha de Pesquisa
Ambiente e Tecnologia

Orientadores
Rogério Luis Cansian
Jorge Reppold Marinho

ERECHIM, JANEIRO DE 2019.

PRISCILA MEZZOMO

Revisão do uso de marcadores genéticos e moleculares dentro do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) e avaliação da eficiência de diferentes protocolos na extração de DNA de *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia.

Área de Concentração: Gestão e Conservação Ambiental.

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. ROGÉRIO LUIS CANSIAN (Orientador)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

PROF. DR. JORGE REPPOLD MARINHO (Coorientador)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

PROFA. DRA. ALICE HIRSCHMANN

Universidade Federal do Pampa

PROFA. DRA. ALBANIN A. MIELNICZKI PEREIRA

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

Erechim, janeiro de 2019.

M617r Mezzomo, Priscila

Revisão do uso de marcadores genéticos e moleculares dentro do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) e avaliação da eficiência de diferentes protocolos na extração de DNA de *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836). -2018.
124 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

“Orientação: Rogério Luis Cansian, Jorge Reppold Marinho”

1. Peixes 2. Marcadores genéticos e moleculares 3. Extração de DNA I. Título

C.D.U.: 597

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

Dedico este trabalho aos meus pais e a meu irmão,
Iraci, Moacir e Pedro Augusto, pelo amor e apoio incondicionais.

*“I went to the woods because I wished to live deliberately,
to front only the essential facts of life, and see if I could not learn
what it had to teach, and not, when I came to die,
discover that I had not lived.”*

Henry David Thoreau, 1854.

RESUMO

Em peixes, os processos de isolamento geográfico, devido as características geomorfológicas dos habitats aquáticos, acabam forçando uma adaptação fisiológica e, por vezes evolutiva, altamente expressiva e passível de quantificação através de ferramentas genéticas. Os peixes estão entre os recursos naturais mais importantes do mundo e o gênero *Hypostomus* Lacépède é considerado o mais diversificado e complexo da família Loricariidae, com espécies distribuídas da América Central até a América do Sul. Inclusa no gênero está a espécie *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836) e apesar de sua distribuição e o fato de ser encontrada em uma ampla gama de micro-habitats de água doce, é possível verificar que poucos estudos biológicos estão disponíveis e que à nível genético existe uma lacuna ainda maior quanto as informações específicas deste grupo. Neste sentido, os objetivos desta dissertação foram os de revisar o uso de marcadores genéticos e moleculares em trabalhos avaliando o gênero de peixes *Hypostomus* (capítulo I) e analisar a eficiência de diferentes protocolos de extração de DNA em exemplares de *Hypostomus commersoni* (capítulo II). Neste primeiro capítulo, buscou-se explicar os dados provenientes da base de referência formada a partir de pesquisa bibliográfica em plataforma científica específica, onde revisou-se as principais descobertas feitas pelos autores de cada artigo e destacou-se características das ferramentas genéticas utilizadas, discutindo-se por fim quais as perspectivas futuras na pesquisa em genética de peixes. O banco de dados compreendeu 49 artigos revisados por pares publicados nos últimos 50 anos (1968-2018) em que abordou-se análises baseadas em marcadores genéticos clássicos (citológicos, bioquímicos, enzimáticos) e moleculares (baseados em PCR e genotipagem). Rápidos avanços na genética e edição genômica tem levado ao desenvolvimento e uso de técnicas modernas, como os sistemas ZFN (*Zinc-Finger Nuclease*), TALEN (*Transcription Activator-like Effector Nuclease*) e CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), que vêm sendo aplicados ao estudo de espécies de peixes em diversos níveis estruturais. Cabe ressaltar que não existem trabalhos revisando o uso de marcadores genéticos e moleculares no gênero *Hypostomus* publicados até a presente data. No segundo capítulo, avaliou-se a eficiência de diferentes metodologias (oito protocolos), variáveis e tecidos-alvo (nadadeiras caudal e dorsal, tecido muscular, brânquias, tecido ocular e amostras de sangue) na extração de DNA de *H. commersoni*. O princípio e as técnicas de isolamento de DNA desempenham um papel importante na obtenção de uma quantidade considerável e pura de material genético. O rendimento e a qualidade do produto obtido, por métodos que são bem-sucedidos em outros animais podem diferir em espécies de peixes. Neste sentido, avaliou-se a eficiência dos distintos protocolos na extração de DNA genômico em exemplares de *H. commersoni*, espécie relevante comercial e ecologicamente e sem descrição de protocolo específico até a presente data. Os resultados indicam que o uso de diferentes tecidos com o mesmo protocolo apresenta diferenciação em termos de quantidade e qualidade de DNA. Da mesma forma, a extração de DNA a partir do mesmo modelo tecidual, mas com diferentes metodologias resulta em variações na amostragem final de material genético obtido. Os resultados mostram que é possível obter DNA a partir de tecido ocular e que o mesmo apresenta potencial para permanecer incubado em tampão de extração por até 36 horas previamente à continuidade do processo de extração. Concluiu-se, por fim, que o protocolo descrito neste trabalho – e que reúne etapas de todas as metodologias avaliadas – foi o que demonstrou maior eficiência na extração de DNA da espécie estudada.

ABSTRACT

In fishes, the processes of geographic isolation, due to the geomorphological characteristics of the aquatic habitats, end up forcing a physiological, and sometimes evolutionary, adaptation, highly expressive and quantifiable through genetic tools. Fishes are among the most important natural resources in the world and the genus *Hypostomus* Lacépède is considered the most diversified and complex of the Loricariidae family, with species distributed from Central America to South America. Included in the genus, is the specie *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836) and despite its distribution and the fact that it is found in a wide range of freshwater microhabitats, it is possible to verify that few biological studies are available and that at the genetic level there is an even greater gap concerning about the specific information of this group. In this sense, the goals of this dissertation were to review the use of genetic and molecular markers in papers evaluating the fish genus *Hypostomus* (chapter I) and to analyze the efficiency of different DNA extraction protocols in *Hypostomus commersoni* (Chapter II). In this first chapter, we explain the data of the reference base obtained from a bibliographical research in a specific scientific platform, where the main discoveries made by the authors of each article were reviewed and some of the characteristics of the genetic tools used were highlighted. In the end, the future prospects of fish genetics research are discussed. The database comprised 49 peer-reviewed articles published over the past 50 years (1968-2018) and addresses analyzes based on classical (cytological, biochemical, enzymatic) and molecular genetic markers (based on PCR and genotyping). Rapid advances in genetic and genomic edition have led to the development and use of modern techniques such as the systems ZFN (Zinc-Finger Nuclease), TALEN (Transcription Activator-like Effector Nuclease) and CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), which has been applied to study of fish species at various genetic and structural levels. It should be noted that there are no papers reviewing the use of genetic and molecular markers in the genus *Hypostomus* published until the present date. In the second chapter, we evaluated the efficiency of different methodologies (eight protocols), different variables and target tissues (caudal and dorsal fin, muscle, gills, ocular tissue and blood samples) in the extraction of genomic DNA from *H. commersoni*. The principle and techniques of DNA isolation play an important role in obtaining a considerable and pure amount of genetic material. The yield and quality of the product obtained by methods that are successful in other animals may differ in fish species. In this sense, the efficiency of the different protocols in the extraction of genomic DNA in specimens of *H. commersoni*, relevant commercial and ecological species and without specific protocol description until the present date, was evaluated. The results indicate that the use of different tissues with the same protocol presents differentiation in terms of quantity and quality of DNA. Likewise, the extraction of DNA from the same tissue model, but with different methodologies results in variations in the final sampling of genetic material obtained. The results shown that it is possible to obtain DNA from ocular tissue and that it has the potential to remain incubated in extraction buffer for up to 36 hours prior to continuity of the extraction process. Finally, we conclude that the protocol described in this work - and that combines stages of all the methodologies evaluated - was the one that demonstrated the highest efficiency in the DNA extraction of the studied species.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

β – Beta;
°C – Grau Celsius;
mA – Miliampère;
V – Volts;
N – Tamanho amostral;
 μ l – Microlitro;
ml – Mililitro;
mg – Miligrama;
mg/L – Miligrama por litro;
 μ g – Micrograma;
 μ M – micrômetro;
ng – Nanograma;
ng/ μ l – Nanograma por microlitro;
rpm – Rotações por minuto;
OD – Densidade óptica;
pb – Pares de bases;
DNA – Ácido desoxirribonucleico;
rDNA – DNA ribossômico;
mtDNA – DNA mitocondrial;
RNA – Ácido ribonucleico;
rRNA – RNA ribossômico;
tRNA – RNA transportador;
mRNA – RNA mensageiro;
Tris – Tris (hidroximetil) aminometano ($C_4H_{11}NO_3$);
Tris-HCl – Cloridrato de tris (hidroximetil) aminometano ($NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$);
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético ($C_{10}H_{16}N_2O_8$);
SDS – Dodecil sulfato de sódio ($NaC_{12}H_{25}SO_4$);
NaCl – Cloreto de sódio;
NADP⁺ – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina ($C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3$);
DTT – Ditioneitol ($C_4H_{10}O_2S_2$);
CTAB – Brometo de Cetrônio ($C_{19}H_{42}BrN$);
PVP – Polivinilpirrolidona ($(C_6H_9NO)_n$);
Tampão TBE – Tris/Borato/EDTA;
Tampão TE – EDTA;
Tampão STE – Cloreto de Sódio/Tris/EDTA;

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - Revisão do uso de marcadores genéticos e moleculares dentro do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae).

Figura 1. Gráfico de frequência do uso de marcadores por ano de publicação dos artigos 45

CAPÍTULO II - Avaliação da eficiência de diferentes protocolos na extração de DNA de *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836).

Figura 1. Padrão de bandas geradas por eletroforese das extrações de DNA avaliando os tratamentos para alguns dos diferentes tecidos nos tempos de 1, 12, 24 e 36 horas. 91

Figura 2. Valores comparativos de DNA quantificados para os diferentes protocolos e tecidos.... 93

Figura 3. Quantidade e padrão de bandas geradas por eletroforese com *primers* RAPD (Kit W – Operon) em DNA de *H. commersoni*. 95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - Revisão do uso de marcadores genéticos e moleculares dentro do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae).

Tabela 1. Cariótipos disponíveis para *Hypostomus*, organizado em ordem crescente de número diploide..... 15

Tabela 2. Dados genéticos de *Hypostomus*, organizado por marcador(es), espécie(s) analisada(s), objetivo/resultados e referência por autor(es) e ano de publicação..... 36

CAPÍTULO II - Avaliação da eficiência de diferentes protocolos na extração de DNA de *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836).

Tabela 1. Matriz qualitativa representando a influência das variáveis no resultado final da extração de DNA em exemplares de *Hypostomus commersoni*.....89

Tabela 2. Valores comparativos de DNA quantificados para os diferentes protocolos e tecidos ... 93

Tabela 3. Quantidade de bandas de DNA amplificadas para cada *primer*..... 94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Genética e a manutenção da vida	1
1.2 Marcadores genéticos e moleculares	2
1.3 O gênero <i>Hypostomus</i> - Diversidade, importância ecológica e econômica	4
1.4 <i>Hypostomus commersoni</i>	6
CAPÍTULO I	9
Resumo	10
Abstract	10
Introdução	10
Perspectivas futuras	45
Considerações Finais	50
Agradecimentos	50
Referências Bibliográficas	51
CAPÍTULO II	72
Resumo	74
Abstract	74
Introdução	75
Materiais e Métodos.....	77
Resultados	88
Discussão	95
Considerações Finais	98
Agradecimentos	99
Referências Bibliográficas	99

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Genética e a manutenção da vida

Todas as formas vivas no planeta Terra são o produto de uma longa história, que remonta há bilhões de anos atrás (Mayr, 1982). Todo organismo foi formado por diferentes células, genes e cromossomos, por um genoma, com características genéticas únicas e uma trajetória evolutiva compartilhada (Mayr, 1982; Jousy, 2017). Talvez seja possível afirmar que poucos ramos da biologia revolucionaram de modo tão profundo o pensamento humano e as pautas científicas quanto a genética (Mayr, 1982). Mutações e mudanças cromossômicas surgem em todas as espécies, o tempo todo, fornecendo a matéria-prima para que ocorram os processos evolutivos, carregados por um único objetivo discernível, que é a própria vida em si (Dobzhansky, 1951).

A molécula de DNA foi identificada pela primeira vez na década de 1860 pelo químico suíço Johann Friedrich Miescher (Dahm, 2007). No entanto, foi apenas um século depois que James Watson e Francis Crick descreveram a estrutura deste importante polímero e sugeriram, pela primeira vez e com grande impacto, o modelo de dupla hélice, que é seguido, com alguns poucos ajustes, até os dias de hoje (Scheid et al., 2005). Indubitavelmente, mesmo o mais simples dos organismos conhecidos, tenha ele núcleos complexos e definidos ou não, possui cromossomos em cujo cerne está contido o material genético, transferido de progenitores para progênie, geração após geração e cujas informações genéticas tem o infindável – e superficialmente explorado – potencial de nos guiar até a origem da vida (Sagan, 1977; Muhammad et al., 2016).

Quaisquer diferenças presentes nos nucleotídeos, genes, cromossomos ou genomas completos dos distintos organismos são referidas como diversidade genética, isto é, um estado de biodiversidade que reflete todo o número de características presentes na composição genética de uma espécie (Jini, 2017). Essa diversidade genética, expressamente essencial para a sobrevivência a longo prazo de organismos e populações, permite que seja possível manter altos níveis de aptidão, favorecendo a adaptação dos diferentes *taxa* frente as condições ambientais (Frankel e Soule, 1981). Assim, o conhecimento a respeito da variação genética presente nas espécies é de fundamental importância na compreensão de parâmetros evolutivos e é indispensável no planejamento e criação de estratégias de conservação e uso sustentado de recursos genéticos (Gribel, 2001).

Os padrões de expressão dos genes relacionados à respostas as condições ambientais ou estressoras são mecanismos complexos e podem diferir em organismos geneticamente distintos (Iwama et al., 1992; Pottinger e Carrick, 1999; Picard e Schulte, 2004). Em peixes, os processos de isolamento geográfico, devido as características geomorfológicas dos habitats aquáticos, acabam forçando uma adaptação fisiológica e, por vezes evolutiva, altamente expressiva e passível de quantificação através de ferramentas genéticas (Wang et al., 2002). Tais abordagens genéticas oferecem meios poderosos para examinar o estado atual das populações e correlacioná-los com os estados passados e para entender as mudanças e processos que melhor garantam sua conservação (Belfiore e Anderson, 2001). Contudo, apesar da biodiversidade presente nos habitats aquáticos e sua importância, a caracterização e conservação deste patrimônio genético ainda não tem recebido a devida atenção (Najiah e Gade, 2003).

Compreender como as diferenças inatas entre peixes de diferentes populações genéticas são caracterizadas e de que forma são influenciadas por diferentes processos evolutivos e ecológicos é uma etapa importante em programas de conservação de populações naturais e em melhoramento genético de espécimes cativos (Hiltsdorf et al., 2013). Neste sentido, se torna evidente a necessidade de expandirmos o conhecimento acerca da caracterização genética e estruturação dos mecanismos que regem os componentes ictiofaunísticos em sua ampla gama de formas e habitats ocupados.

1. 2 Marcadores genéticos e moleculares

Nas últimas décadas, discute-se a importância da conservação da diversidade genética como uma das questões centrais da biologia (Bickham et al., 2000), considerando seu valor para a manutenção e sustentabilidade das populações (Solé-Cava, 2001; Avise, 2004). Simultaneamente, os avanços nas técnicas moleculares aumentaram a disponibilidade de diferentes marcadores baseados no DNA, que se tornaram ferramentas eficientes em estudos genéticos de conservação de uma grande variedade de organismos (Haig, 1998; Sunnucks, 2001; Avise, 2004). Esses marcadores podem ser classificados em duas principais categorias: os marcadores genéticos clássicos (que englobam os marcadores morfológicos, marcadores citológicos e marcadores de natureza proteica ou isoenzimática) e os marcadores moleculares ou de DNA, cujas técnicas envolvem por vezes o sequenciamento das amostras, conhecimento aprofundado do genoma e uso de equipamentos mais avançados e de maior custo (Kadirvel et al., 2018).

A utilização de marcadores de DNA fornece um número praticamente ilimitado de informações, que estão distribuídas ao longo do genoma, tornando os marcadores genéticos e moleculares são componentes altamente valorizados em diversas áreas que envolvem genética. Áreas como as da biologia molecular e biotecnologia, tais como genética de populações, filogeografia, filogenia molecular, mapeamento genético, diagnósticos de doenças, testes de paternidade, em investigações acerca das relações entre o genótipo e o fenótipo dos organismos e inúmeros outros (Turchetto-Zolet et al., 2017).

Até meados da década de 1960, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram aqueles controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, que permitiam pontuar as diferenças encontradas nos organismos de acordo com os padrões de polimorfismo expressos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Contudo, como os variantes fenotípicos são raros, as populações eram frequentemente classificadas como geneticamente homogêneas, o que ocorria geralmente de forma errônea (Futuyma, 1992).

Nos anos seguintes popularizou-se entre os pesquisadores a técnica de eletroforese de proteínas, demonstrada inicialmente por Harris (1966). Posteriormente, a mesma foi demonstrada em um dos primeiros ensaios de diversidade genética de populações com a utilização de um marcador, no trabalho clássico de Lewontin e Hubby (1966). Neste estudo, os autores avaliaram polimorfias em populações de *Drosophila pseudoobscura*. Mas de fato, a revolução neste quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos (Ferreira e Grattapaglia, 1998), a partir da descoberta de enzimas de restrição no ano de 1968, publicada concomitante e independentemente por Linn e Arber (1968) e Meselson e Yuan (1968).

Nas décadas subsequentes à descrição da estrutura da molécula de DNA (Watson e Crick, 1953), as áreas genéticas puderam experimentar avanços significativos, com o surgimento das primeiras metodologias para amplificação e sequenciamento de amostras (Turchetto-Zolet et al., 2017). Com o desenvolvimento da técnica de amplificação em cadeia utilizando uma sequência de DNA polimerase (PCR) (Mullis e Faloona, 1987; Saiki et al., 1988), houve um impulso na genética, que carregou à descrição de outros grupos de marcadores clássicos e moleculares (Ferreira e Grattapaglia, 1998). As diferentes técnicas desenvolvidas a partir do surgimento da PCR, permitiram amplificar grande quantidade de uma sequência específica de DNA sem a necessidade de clonagem, partindo apenas de algumas moléculas da sequência alvo, o que facilitou a caracterização e identificação a nível genômico de inúmeras espécies (Turchetto-Zolet et al., 2017).

As diferentes classes de marcadores produzidas revolucionaram as áreas da genética como as conhecíamos. Em termos de genética clássica e molecular, em que os diferentes métodos desenvolvidos e testados ao nível de polimorfismos, frequências alélicas, amplificação, clonagem, sequenciamento e demais características qualitativas, quantificáveis e manipuláveis de DNA, forneceram um grande número de marcadores. Estas técnicas impulsionaram o surgimento de novas formas de avaliar a diversidade e os processos evolutivos por trás dos recursos genéticos de todos os tipos de formas vivas (Morin et al., 2004; Chistiakov et al., 2006; Narum et al., 2008; Väli et al., 2010).

1.3 O gênero *Hypostomus* - Diversidade, importância ecológica e econômica

Os seres vivos são incrivelmente variados na estrutura macroscópica e microscópica de seus corpos, sendo igualmente variados em seus modos de vida, e, ainda assim, a extensão da diversidade e de suas características fisiológicas e bioquímicas permanece imperfeitamente explorada (Mayr, 1982). Os peixes se constituem em recursos naturais importantes, sua vasta biodiversidade não supre apenas necessidades nutricionais através das espécies comercialmente exploradas, mas estes organismos também possuem um papel ecológico reconhecidamente importante, atuando na gestão e manutenção do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (Ormerod, 2003). O número atual de espécies de peixes nominalmente registrados de acordo com o *Fish Base* é de 33.970, sendo que deste total, 15.493 são de espécies de peixes de água doce (Froese e Pauly, 2018a).

No Brasil, há registro de ocorrência de 3.449 espécies, sendo 3.417 formalmente descritas (Froese e Pauly, 2018b). Estas espécies estão distribuídas em 39 famílias e, entre elas, encontra-se família Loricariidae (Ordem Siluriformes), cujos representantes são, na maioria, peixes bentônicos que se alimentam de algas e micro-organismos aderidos ao substrato compactado ou mesmo na camada composta por lama dos fundos de rios (Hirschmann et al., 2011). Loricariidae é uma das famílias mais diversas da Região Neotropical, possuindo sete subfamílias: Delturinae, Hypoptomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae, Neoplecostominae e Otothyrinae (Armbruster, 2004; Chiachio et al., 2008).

Na subfamília Hypostominae, está presente o gênero *Hypostomus* Lacépède, que inclui 203 espécies validas descritas (Froese e Pauly, 2018c), sendo conhecidas popularmente como cascudos. Estes peixes ocupam habitats variados e apresentam alta plasticidade ambiental devido a atributos como respiração realizada por sistema branquial

e pelas paredes vascularizadas do estômago, o que lhes confere a capacidade de resistir fora da água por curtos períodos ou em locais de baixa oxigenação por períodos mais longos (Giuliano-Caetano, 1998).

Este grupo é considerado o mais diversificado e complexo dos peixes da família Loricariidae (Weber, 2003; Reis et al., 2003; Jerep et al., 2007; Hollanda Carvalho et al., 2010), com espécies distribuídas da América Central até a América do Sul (Zawadzki et al., 2010), entre as principais bacias cisandinas e transandinas de todo o continente sul-americano, incluindo as bacias dos rios Magdalena, Atrato e lago de Maracaibo (Armbruster, 2003 e 2004; Maldonado-Ocampo et al., 2006). No Brasil, várias espécies deste gênero têm sua ocorrência registrada nos afluentes das bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai e Amazonas, representando, portanto, um grande componente da ictiofauna dulcícola (López e Miquelarena, 1991; Cardoso et al., 2012).

Os cascudos estão inclusos na lista dos peixes relacionados a capturas pela atividade pesqueira desenvolvida no Brasil e, também, estão presentes na lista de espécies produzidas pela piscicultura nacional (MPA, 2010). Outro fator de importância econômica está relacionado ao valor dos representantes de *Hypostomus* como peixes ornamentais e, apesar do número reduzido de estudos, são considerados uma opção potencial para estes fins de cultivo (Baldisserotto, 2009). Registros comerciais das áreas de produção ornamental indicam que estes espécimes possuem grande destaque, com alguns exemplares alcançando inclusive altos preços no mercado aquarístico (Prang, 2007; Gonçalves, 2011).

Os peixes do gênero *Hypostomus* podem ser encontrados em ambientes lênticos e lóticos de água doce, mas, de modo geral, são mais conhecidos por uma associação próxima com ambientes de fluxo rápido (Garavello e Garavello, 2004). Apresentam comportamento de base nas cadeias tróficas, onde seus hábitos bentônicos estão relacionados principalmente a uma dieta alimentar predominantemente herbívora e/ou detritívora (Casatti, 2002). Contudo, certas linhagens apresentam especializações morfológicas para o consumo de alimentos específicos, incluindo compostos celulósicos, fragmentos de madeira, sementes e até mesmo pequenos macroinvertebrados (Buck e Sazima, 1995; Garavello e Garavello, 2004; Lujan et al., 2011; Lujan et al., 2012).

Cascudos tendem a exibir comportamento não-migratório e, para a maioria das espécies descritas, é observado cuidado parental (Suzuki et al., 2000). Estes *taxa* englobam uma grande diversidade de formas e comportamentos (Burgess, 1989; Agostinho et al., 1995; Suzuki et al., 2000), mas na anatomia externa e interna característica de um

cascudo estão presentes a boca em forma de ventosa com ou sem barbilhões, o intestino geralmente longo e uma extensa armadura exoesquelética composta por placas ósseas e endosqueleto denso (Nelson, 2006; Takahashi et al., 2008). De acordo com Vanni et al. (2002), essa verdadeira “armadura” é composta principalmente por fósforo e é justamente esta característica que confere outra importante função ecológica ao grupo, pois os corpos destes loricarídeos provavelmente sequestram valores relativamente maiores de fosfato de cálcio do que outros peixes já avaliados em estudos semelhantes, o que os torna importantes reguladores da produção primária e dinâmica de nutrientes em rios de regiões neotropicais (Gneri e Angelescu, 1951; Knoll et al., 2009).

1.4 *Hypostomus commersoni*

A espécie *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836) pertence à ordem Siluriformes e à família Loricariidae, sendo caracterizada por corpo recoberto por placas ósseas, através de séries longitudinais (Rocha et al., 2015). De acordo com dados do *Fish Base* (2018d), a distribuição nativa da espécie abrange os rios da América do Sul, majoritariamente na Argentina e no Brasil e com alguns registros no Paraguai e Uruguai, estando presentes nas bacias médias e baixas do rio Paraná, bacias dos rios Uruguai e na bacia da Lagoa dos Patos. Na Argentina, a espécie é conhecida de San Pedro, no Baixo Rio Paraná (Cordiviola de Yuan e Hassan, 1985) até o Alto Paraná (López et al., 2005). No Brasil, é descrita principalmente em sistemas hídricos de afluentes da Lagoa dos Patos, rio Paraná (Weber, 2003; Garcia et al., 2003) e rio Uruguai (Zaniboni Filho et al., 2004).

Apesar de sua distribuição e o fato de ser encontrada em uma ampla gama de micro-habitats de água doce (Reis et al., 1990), é possível verificar que poucos estudos biológicos estão disponíveis, sendo que à nível genético existe uma lacuna ainda maior quanto as informações específicas deste grupo (Agostinho et al., 1991; Lorscheider et al., 2015). Diferentemente, outras espécies de *Hypostomus* já foram caracterizadas de forma recorrente em estudos da área. Ainda assim, existem informações biológicas relevantes a respeito de *H. commersoni*, como a de que a espécie aparentemente possui a capacidade de desenvolver seu ciclo reprodutivo inteiramente em ambiente lântico, de acordo com o que foi encontrado por Agostinho et al. (1991) no reservatório de Capivari-Cachoeira (PR-BR), no qual o autor indicou que representantes deste grupo provavelmente consigam adaptar-se melhor às modificações causadas por barramentos do que outras espécies de Loricariidae já estudadas.

Estudos como o de Bussolaro et al. (2012), avaliaram a biodisponibilidade de compostos organoclorados em vários níveis de policlorobifenilos (PCB) e poluentes orgânicos persistentes (OCP), medidos no fígado e no músculo de *H. commersoni*, investigando as correlações entre esses níveis e vários biomarcadores. Segundo os autores, este estudo demonstrou através de parâmetros bioquímicos e morfológicos que estes peixes provavelmente ativaram mecanismos protetores muito robustos que permitem sua sobrevivência em ambientes com diferentes graus de deturpação, o que supostamente explica a ampla distribuição deste grupo em uma grande variedade de habitats e ecossistemas impactados (Bussolaro et al., 2010).

Os dados disponíveis indicam que exemplares da espécie já foram avaliados através de ensaios enzimáticos, como os performados por Zawadzki et al. (1999, 2001) e através de análises filogenéticas, com foco em todo gênero, descritas por Montoya-Burgos et al. (2002, 2003) e Bueno et al. (2014), onde a espécie *H. commersoni* foi incluída. Outros estudos disponíveis são os de caracterização citológica, como os de Bueno et al. (2013) e Maurutto et al. (2013), em que avaliou-se três espécies do gênero *Hypostomus*, entre elas a espécie mencionada, sendo inclusive a primeira descrição de cariótipo para a mesma.

Já em Rubert et al. (2016), os autores investigaram a distribuição cromossômica do DNA ribossômico (rDNA) 18S em diferentes populações de 11 espécies de *Hypostomus*, incluindo *H. commersoni*, coletadas em importantes bacias brasileiras, aplicando a técnica de hibridização por fluorescência *in situ* (FISH). Este trabalho mostrou que espécies da bacia do Atlântico Sul, como *H. commersoni* coletado no rio Forquetinha (município de Canudos do Vale, RS/BR), apresenta uma tendência conservadora em relação ao seu número cromossômico diploide ($2n = 66$), embora possuam múltiplos loci de rDNA 18S. Segundo os autores, estas informações representam uma valiosa contribuição, que vêm a elucidar as questões relativas a evolução do DNA ribossomal neste grupo.

De comum acordo, os trabalhos disponíveis apontam a importância da espécie e a necessidade de se desenvolver estudos explorativos e que caracterizem-na de forma mais ampla. Estes mesmos parâmetros podem, inclusive, vir a servir de modelo para compreender também os padrões evolutivos de outras espécies do gênero e as interações ecológicas por elas carregadas nos ambientes aquáticos. Estas espécies distribuem-se ao longo dos rios de forma abrangente, contemplando uma alta diversidade de ecotipos, podendo portanto ajudar a clarificar as relações entre os padrões de distribuição do grupo e dos processos hidrogeológicos que ocorreram nos diferentes sistemas que habitam (Garcia et al., 2003; Reis et al., 1990; Agostinho et al., 1991; Rubert et al., 2016)

A espécie *H. commersoni* foi escolhida para ser analisada neste trabalho devido ao fato de que é amplamente distribuída nos rios da região alto uruguaí, onde a pesquisa foi desenvolvida. Da mesma forma, intui-se o incremento a respeito do conhecimento genético que se tem sobre a mesma, podendo servir de base para o desenvolvimento de estudos futuros.

A persistência de muitas espécies de peixes é atualmente desafiada por mudanças de habitat, como a fragmentação de matrizes vegetacionais no entorno de rios, poluição, introdução de novas espécies de fauna, mudanças climáticas e eutrofização de ambientes aquáticos (Gallardo et al., 2016; Nilsson et al., 2005). Níveis adequados de diversidade genética podem aumentar a resiliência das espécies a tais mudanças e aumentar a chance de que pelo menos alguns indivíduos em uma população sobrevivam e se reproduzam, gerando descendentes férteis (Hughes e Stachowicz, 2004). Entender quais mecanismos regulam a diversidade genética em populações de peixes pode, portanto, beneficiar fortemente o manejo e a proteção de espécies vulneráveis (Piccolo, 2016).

Neste sentido, os objetivos desta dissertação foram os de revisar o uso de marcadores genéticos e moleculares em trabalhos avaliando o gênero de peixes *Hypostomus* e analisar a eficiência de diferentes protocolos na extração de DNA genômico em exemplares de *H. commersoni*. Estes dados estão apresentados na forma de dois capítulos. O Capítulo I refere-se ao trabalho intitulado "Revisão do uso de marcadores genéticos e moleculares dentro do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae)", enquanto o Capítulo II refere-se ao trabalho de análise e descrição de metodologia, intitulado "Análise da eficiência de diferentes protocolos na extração de DNA de *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836)."

No primeiro capítulo, buscou-se explicar o conjunto de trabalhos publicados em revistas científicas e revisados por pares, compondo uma base de dados proveniente de uma pesquisa bibliográfica em plataforma científica específica, objetivando a busca de trabalhos onde foram aplicadas ferramentas genéticas ao estudo de espécies do gênero *Hypostomus*. Revisou-se as principais descobertas feitas pelos autores de cada artigo, onde destacou-se algumas das características das ferramentas genéticas utilizadas e comentou-se, ao final, quais as direções e perspectivas futuras na pesquisa em genética de peixes.

No segundo capítulo, avaliou-se a eficiência de diferentes metodologias, variáveis e tecidos-alvo na extração de DNA genômico em exemplares de *H. commersoni*. Ao todo, avaliou-se oito (8) protocolos, com extração a partir de nadadeiras caudal e dorsal, tecido muscular, brânquias, tecido ocular e amostras de sangue.

CAPÍTULO I

**Revisão do uso de marcadores genéticos e moleculares dentro do gênero
Hypostomus Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae).**

Revisão do uso de marcadores genéticos e moleculares dentro do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae).

Resumo: O gênero de peixes *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Loricariidae, Hypostominae) compreende um dos mais diversos e complexos da América-do-Sul. Estudos genéticos têm ajudado a elucidar questões taxonômicas e evolutivas neste grupo. Os marcadores genéticos são ferramentas poderosas, capazes de detectar a singularidade genética de indivíduos, populações e espécies. Neste capítulo, revisou-se os trabalhos que aplicaram ferramentas genéticas ao estudo de exemplares do gênero *Hypostomus*. O objetivo desta revisão foi o de discutir as principais descobertas, destacar algumas das características desses marcadores e comentar as direções futuras na pesquisa genética de peixes. O banco de dados compreendeu 49 artigos revisados por pares publicados nos últimos 50 anos (1968-2018) e aborda análises baseadas em marcadores genéticos clássicos (citológicos, bioquímicos) e moleculares (baseados em PCR e genotipagem). Rápidos avanços na genética e edição genômica tem levado ao desenvolvimento e uso de técnicas modernas, como os sistemas ZFN (*Zinc-Finger Nuclease*), TALEN (*Transcription Activator-like Effector Nuclease*) e CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), que vem sendo aplicados ao estudo de espécies de peixes em diversos níveis estruturais.

Palavras-chave: Peixes; Marcadores genéticos; Marcadores moleculares; citogenética; PCR; edição genômica.

Abstract: The fish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Loricariidae, Hypostominae) comprises one of the most diverse and complex in South-American. Genetic studies have helped to elucidate taxonomic and evolutionary issues in this group. Genetic markers are powerful tools capable to detect genetic uniqueness of individuals, populations and species. In this chapter, we review the works that has applied genetic tools to the study of the genus *Hypostomus*. The goals of this review were to discuss the major findings, to highlight some of the features of these markers and to comment future directions in genetic research of fishes. The database comprised 49 peer-reviewed papers published in the last 50 years (1968-2018) and addresses analyzes based on classical (cytological, biochemical) and molecular genetic markers (PCR-Based and genotyping). Rapid advances in genetic and genomic edition have led to the development and use of modern techniques such as the systems ZFN (*Zinc-Finger Nuclease*), TALEN (*Transcription Activator-like Effector Nuclease*) and CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), which has been applied to study of fish species at various genetic and structural levels.

Keywords: Fish; genetic markers; molecular markers; cytogenetic; PCR; genomic editing.

Introdução

Em conjunto com outras forças evolutivas, como seleção natural e deriva genética, a variação genética surge entre os indivíduos, levando à diferenciação à nível de

populações, espécies e grupos taxonômicos distintos (Chauhan e Rajiv, 2010). Apesar da importância da variabilidade genética para os organismos e sua influência em características evolutivas valiosas, como o desenvolvimento do potencial ecológico básico para a sobrevivência e obtenção de sucesso reprodutivo, sabe-se relativamente pouco sobre o alcance da diversidade genética de populações e espécies (Hughes et al., 2008). Ao longo dos anos, a genética e a genômica tornaram-se aspectos essenciais da ciência da conservação, à medida que procura-se gerenciar os três componentes básicos da biodiversidade: ecossistemas, espécies e genes (Byrne, 2018).

Estudos genéticos têm ajudado a elucidar questões taxonômicas e evolutivas para o gênero *Hypostomus*, detectando a diversidade dentro e entre populações geográficas, gerenciando o fluxo gênico e analisando os fatores que contribuem para o valor adaptativo ou *fitness* dos organismos (habilidade em sobreviver e reproduzir, deixando descendentes férteis), fatores estes relacionados aos caracteres ligados aos genótipos e fenótipos dos indivíduos (Woese et al., 1990; Vrijenhoek, 1998; Hibbett, 2016).

Considerando que os ecossistemas de água doce continuam se transformando e sofrendo influências de atividades antrópicas (Dudgeon et al., 2006; Strayer e Dudgeon, 2010), há a necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos por trás das ferramentas moleculares, capazes de permitir avaliar a diversidade genética entre populações de peixes de água doce e outros organismos (Galindo et al., 2015). Nesse sentido, os marcadores genéticos são ferramentas poderosas, capazes de detectar a singularidade genética de indivíduos, populações ou espécies, e vêm revolucionando o poder analítico necessário para explorar a diversidade genética em qualquer nível taxonômico ou molecular (Linda et al., 1995; Hillis et al., 1996; Paltchamy et al., 2015).

Na presente revisão de literatura, utilizou-se as palavras-chave “*Hypostomus*” e “*genetic*”. A plataforma de busca utilizada foi a *ScienceDirect* (Elsevier) e a base de dados retornou 70 publicações, sendo que destas 21 foram removidas por conter análises que não se enquadravam no escopo pretendido (não eram sobre espécies do gênero em estudo) e/ou não utilizavam nenhum tipo de marcador genético. Ao final, contou-se com 49 artigos revisados por pares e publicados nos últimos 50 anos (1968-2018). Os principais dados estão disponíveis de forma resumida ao final deste capítulo (Tabela 2), de acordo com o marcador genético utilizado, as espécies analisadas, os principais objetivos e resultados do estudo e a referência por autor(es) e ano de publicação.

O gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) é um dos mais diversos da subfamília Hypostominae, possuindo cerca de 203 espécies validas descritas

(Froese e Pauly, 2018). Ainda assim, há uma lacuna a ser preenchida no que diz respeito ao conhecimento sobre como essas *taxa* se comportam em nível molecular. Cabe ressaltar que, até o momento, não há registro de publicações cujo objetivo tenha sido o de revisar os marcadores genéticos, clássicos ou moleculares, utilizados no estudo de exemplares do complexo gênero *Hypostomus*, o que vem a evidenciar a relevância deste trabalho para a área.

Nas seções seguintes, buscou-se explicar todo o conjunto de trabalhos que aplicaram ferramentas genéticas ao estudo do gênero de peixes *Hypostomus*, revisando-se as principais descobertas feitas pelos autores de cada artigo, destacando algumas das características destas ferramentas genéticas utilizadas e comentando, ao final, quais as direções e perspectivas futuras na pesquisa em genética de peixes.

Marcadores Genéticos Clássicos

Por marcador genético define-se toda e qualquer característica biológica, como os caracteres fenotípicos e genotípicos que podem ser oriundos de um gene expresso, tais como enzimas, proteínas, fragmentos ou segmentos específicos de DNA, correspondentes a regiões expressas ou não do genoma e que são passados de progenitores para seus descendentes (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Turchetto-Zolet et al., 2017). Essas características podem ser usadas para rastrear um indivíduo ou um gene, portanto chamados de "marcadores" (Sunnucks, 2001; Kadirvel et al., 2018).

Marcadores genéticos distintos (aloenzimas, DNA mitocondrial, DNA nuclear, etc.) podem variar em sua capacidade de detectar a estrutura genética de indivíduos e populações (Ruzzante et al., 1996). Estes marcadores podem ser classificados em duas principais categorias: os marcadores genéticos clássicos, que englobam os marcadores morfológicos, marcadores citológicos, marcadores de natureza proteica ou isoenzimática e os marcadores moleculares ou de DNA, cujas técnicas envolvem por vezes o sequenciamentos das amostras, conhecimento amplo do genoma e o uso de equipamentos e técnicas mais avançados (O'Brien, 1991; Kadirvel et al., 2018).

O uso destes marcadores para estudar espécies e populações de peixes pode ser considerado uma ferramenta importante, uma vez que carrega o potencial para estimar a extensão da biodiversidade através de diversos parâmetros genéticos que podem ser analisados também sob os espectros ecológicos e estatísticos, de forma qualitativa ou quantitativa (Cardoso et al., 2011).

Marcadores morfológicos

Marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligações gênicas e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Eles foram os primeiros a serem utilizados e são ainda hoje a base do melhoramento genético convencional, em que características desejáveis são selecionadas nos genitores para os cruzamentos (Turchetto-Zolet et al., 2017).

O uso de caracteres fenotípicos para distinguir populações ou mesmo indivíduos foi e ainda tem sido a classe de marcadores mais utilizados para o manejo de populações de peixes naturais e também a base para programas de melhoramento genético de animais domésticos (Hiltsdorf, 2013). Trabalhos publicados nas décadas de 1940 (Mchugh, 1942) e de 1950 (Royce, 1957) já demonstravam a utilidade de características morfológicas na delimitação de populações de peixes para fins de manejo pesqueiro.

Marcadores morfológicos são fáceis de serem aplicados, pois não requerem equipamentos específicos ou técnicas bioquímicas e moleculares avançadas (Muhammad et al., 2018). Reprodutores usaram este tipo de marcadores com sucesso em programas de melhoramento de diversas espécies (Karakoy et al., 2014). Ainda assim, as principais desvantagens dos marcadores morfológicos estão na sua limitação em número e o fato de que podem gerar dados que caracterizam condições passageiras ou expressas apenas no momento da coleta e análise, uma vez que são fortemente influenciados pelos fatores ambientais (físicos ou químicos) e até mesmo pelos estágios de desenvolvimento dos organismos em estudo (Eagles et al., 2001).

O gênero *Hypostomus* é o mais especioso e largamente distribuído dentre os peixes da América do Sul, sendo considerado um dos mais complexos da ictiofauna neotropical por apresentarem, entre outras características, uma ampla variedade morfológica quanto ao seu padrão de cores (Weber, 2003). Consequentemente, a caracterização taxonômica do grupo é considerada complexa e inúmeros são os trabalhos estruturando e revisando a classificação taxonômica e morfológica em populações de *Hypostomus* (Boeseman, 1968 e 1969; Lilyestrom, 1984; Reis et al., 1990; Mazzoni et al., 1994; Le Bail et al., 2000; Oyakawa et al., 2005; Armbruster e Souza, 2005; Borba, 2011; Cardoso et al., 2012; Zawadzki et al., 2017; Ramos et al., 2017; Perez, 2018; Pfeil et al., 2018; Dias e Zawadzki, 2018). Por esta razão, não revisamos de forma extensa e aprofundada o uso de marcadores

morfológicos estudados no grupo, tampouco citamos em nossa base de dados os trabalhos revisando e classificando taxonomicamente as espécies do gênero.

Marcadores citogenéticos e bioquímicos

Os marcadores citológicos são utilizados na investigação das variações nos números, padrões de bandas, tamanho, forma, ordem e posição dos cromossomos (Paltchamy et al., 2015). Estudos citogenéticos em diversas espécies de peixes vêm destacando a diversidade genômica desse grupo. Estes trabalhos demonstraram a ocorrência de cromossomos supranumerários, sistemas cromossômicos simples e múltiplos, polimorfismos e poliploidias, presença e distribuição de heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolos (NORs – *Nucleolus Organize Regions*) (Oliveira et al., 2009; Martinez, 2009). A citogenética contribuiu para estimar uma diversidade críptica nestes *taxa*, fornecendo dados importantes para estudos taxonômicos e evolutivos.

O gênero *Hypostomus* tem sido largamente estudado à nível citogenético (Giuliano-Caetano, 1998; Cereali et al., 2008), apresentando um número cromossômico variável, com dados apontando valores de $2n = 54$ em *H. plecostomus* (Muramoto et al., 1968, em Artoni e Bertollo, 2001) até $2n = 84$ em *Hypostomus* sp. 2 e *Hypostomus* sp. 3 (Cereali et al., 2008). No banco de dados formado, encontrou-se vinte e cinco (25) trabalhos analisando cariótipos e outros dados citológicos. A primeira publicação, data de 1968 (Muramoto e Ono), enquanto o artigo mais recente foi publicado em 2018 (Brandão et al., 2018). A lista de todas as espécies analisadas citologicamente em nível cariotípico é apresentada na Tabela 1, organizada em ordem crescente, de acordo com o táxon alvo, o número diploide e o número da referência de autoria e ano.

Além da formula cromossômica, outros sistemas citogenéticos também foram analisados, como os padrões do cromossomo sexual em algumas espécies (por ex.: a ocorrência de sistema sexual no “complexo *H. plecostomus*” das espécies amazônicas, em Oliveira et al. (2015) e a primeira descrição de um sistema ZZ/ZW para *Hypostomus* aff. *ancistroides*, em Kamei et al., (2017)), bem como múltiplos NORs, constituintes da heterocromatina constitutiva e mapeamentos cromossômico de múltiplos genes de DNA/RNA ribossômico 5S/18S.

Em Rubert et al. (2016), os autores investigaram a distribuição cromossômica do DNA ribossomal através dos sítios 18S (rDNA) em diferentes populações naturais, avaliando o total de 11 espécies de *Hypostomus* (*H. cochliodon*, *H. commersoni*, *H.*

hermanni, *H. regani*, *H. albopunctatus*, *H. paulinus*, *Hypostomus* aff. *paulinus*, *H. iheringii*, *H. mutucae*, *H. strigaticeps*, *H. nigromaculatus*) com aplicação da técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). Como resultado, cada espécie exibiu padrões distintos de AgNORs (*Argyrophilic NORs*) e distribuição única dos sítios 18S (rDNA), podendo ser considerados marcadores citogenéticos do gênero e contribuindo para a filogenia do grupo.

Brandão et al. (2018) estudaram espécimes de *H. affinis* Steindachner, 1877 coletados na bacia do rio Paraíba do Sul. Os autores observaram grandes variações na localização física dos genes de rDNA 5S e 18S no cariótipo destes exemplares, com base nos resultados da técnica FISH. Os fenótipos encontrados para o rDNA 18S mostraram pequenas alterações em relação ao número de sítios entre as regiões de drenagem inferior e superior da bacia hidrográfica avaliada. Para os espécimes provenientes da região superior da bacia de drenagem, houve grande diferença no número de sítios encontrados, o que juntamente com os dados da literatura pode representar uma dinâmica populacional em que a expansão dos sítios 5S do rDNA podem fornecer um citótipo extinto ou não amostrado.

Ao todo, 37 complexos de espécies foram caracterizadas citologicamente, sendo que os representantes nominais formalmente descritos foram 21, sendo eles *H. plecostomus*, *H. cochliodon*, *H. faveolus*, *H. commersoni*, *H. ancistroides*, *H. derbyi*, *H. topavae*, *H. regani*, *H. goyazensis*, *H. heraldoi*, *H. hermanni*, *H. strigaticeps*, *H. paulinus*, *H. albopunctatus*, *H. nigromaculatus*, *Hypostomus* aff. *agna*, *H. iheringi*, *H. auroguttatus*, *Hypostomus* aff. *unae*, *H. topavae*, *H. mutucae*.

Tabela 1. Cariótipos disponíveis para *Hypostomus*, organizado em ordem crescente de número diploide.

<i>Espécies</i>	<i>2n</i>	<i>Formula cromossômica</i>	<i>Referências</i>
<i>H. plecostomus</i>	54	24m + 24sm + 12st + 18a	1
<i>H. prope plecostomus</i>	68	12m + 16sm + 12st + 28a	13
<i>H. cf. plecostomus</i> (♂)	68	14m + 24sm + 14st + 16a	21
<i>H. cf. plecostomus</i> (♀)	68	15m + 24sm + 14st + 15a	21
<i>H. cochliodon</i>	64	12m + 16sm + 16st + 20a	15
<i>H. cochliodon</i>	64	16m + 20sm + 28st + 28a	23
<i>H. aff. cochliodon</i>	64	18m + 20sm + 26st + 26a	18
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-1	64	32m + 32sm + 32st + 32a	7
<i>H. faveolus</i>	64	18m + 8sm + 22st + 16a	15
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-3	65	38m + 38sm + 26st + 26a	7
<i>H. affinis</i>	66	14m + 14sm + 12st + 26a	3
<i>H. affinis</i>	66	12m + 12sm + 14st + 28a	25
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu-2	66	32m + 32sm + 34st + 34a	7
<i>Hypostomus</i> aff. <i>ancistroides</i>	66	12m + 16sm + 10st + 28a	17
<i>H. ancistroides</i>	68	16m + 18sm + 34st + 34a	2
<i>H. ancistroides</i>	68	18m + 10sm + 12st + 28a	4

<i>H. ancistroides</i>	68	14m + 14sm + 8st + 32a	19
<i>H. ancistroides</i>	68	16m + 18sm + 34st + 34a	22
<i>H. ancistroides</i>	68	10m + 26sm + 32st + 32a	10
<i>H. ancistroides</i>	68	14m + 12sm + 18st + 24a	11
<i>H. ancistroides</i>	68	16m + 12sm + 18st + 22a	11
<i>H. ancistroides</i>	68	8m + 10sm + 18st + 32a	11
<i>H. ancistroides</i>	68	16m + 4sm + 16st + 32a	13
<i>H. ancistroides</i>	68	10m + 20sm + 10st + 28a	16
<i>Hypostomus</i> aff. <i>ancistroides</i> (♀)	68	16m + 13sm + 22st + 17a	24
<i>Hypostomus</i> aff. <i>ancistroides</i> (♂)	68	16m + 12sm + 22st + 18a	24
<i>H. commersoni</i>	66	10m + 16sm + 40st + 40a	23
<i>H. commersoni</i>	68	12m + 12sm + 14st + 28a	15
<i>H. commersoni</i>	68	12m + 12sm + 8st + 36a	17
<i>H. derbyi</i>	66	6m + 10sm + 20st + 30a	17
<i>Hypostomus</i> sp.	68	6m + 6sm + 32st + 24a	9
<i>Hypostomus</i> sp. A	70	18m + 14sm + 38st + 38a	2
<i>Hypostomus</i> aff. <i>topavae</i> (<i>Hypostomus</i> sp. A in Ref. 2)	70	18m + 14sm + 38st + 38a	22
<i>Hypostomus</i> cf. <i>topavae</i>	80	6m + 8sm + 42st + 24a	9
<i>H. topavae</i>	80	14m + 40sm + 26st + 30a	15
<i>H. topavae</i>	80	14m + 10sm + 26st + 30a	19
<i>H. topavae</i>	80	14m + 30sm + 18st + 18a	24
<i>Hypostomus</i> sp. B	72	12m + 18sm + 42st + 42a	2
<i>H. regani</i>	72	10m + 20sm + 42st + 42a	2
<i>H. regani</i>	72	12m + 18sm + 26st + 16a	4
<i>H. regani</i>	72	10m + 20sm + 42st + 42a	8
<i>H. regani</i>	72	12m + 18sm + 26st + 16a	8
<i>H. regani</i>	72	8m + 16sm + 20st + 28a	8
<i>H. regani</i>	72	6m + 6sm + 32st + 28a	9
<i>H. regani</i>	72	10m + 18sm + 44st + 44a	10
<i>H. regani</i>	72	12m + 14sm + 26st + 20a	15
<i>H. regani</i>	72	12m + 8sm + 10st + 42a	19
<i>H. regani</i>	72	10m + 20sm + 42st + 42a	22
<i>H. regani</i>	72	10m + 20sm + 42st + 42a	23
<i>H. regani</i>	72	12m + 22sm + 38st + 38a	23
<i>Hypostomus</i> sp. C	72	10m + 18sm + 44st + 44a	2
<i>Hypostomus</i> sp. D ₍₁₎	72	10m + 26sm + 36st + 36a	2
<i>Hypostomus</i> sp. D ₍₂₎	72	14m + 20sm + 38st + 38a	2
<i>H. goyazensis</i>	72	10m + 16sm + 10st + 36a	4
<i>Hypostomus</i> cf. <i>heraldoi</i>	72	6m + 6sm + 26st + 34a	9
<i>Hypostomus</i> sp. (<i>Hypostomus</i> sp. D ₍₁₎ in Ref. 2)	72	10m + 26sm + 36st + 36a	22
<i>H. hermanni</i>	72	10m + 8sm + 32st + 22a	15
<i>H. hermanni</i>	72	8m + 18sm + 46st + 46a	23
<i>H. aff. hermanni</i>	72	12m + 22sm + 18st + 20a	24
<i>H. strigaticeps</i>	72	10m + 16sm + 46st + 46a	10
<i>H. strigaticeps</i>	72	10m + 14sm + 18st + 30a	11
<i>H. strigaticeps</i>	72	12m + 12sm + 18st + 30a	15
<i>H. strigaticeps</i>	72	10m + 18sm + 18st + 26a	16
<i>H. strigaticeps</i>	72	12m + 12sm + 18st + 30a	20
<i>H. strigaticeps</i> (<i>Hypostomus</i> sp. B in Ref. 2)	72	12m + 18sm + 42st + 42a	22
<i>H. paulinus</i> (<i>Hypostomus</i> sp. C in Ref. 2)	72	10m + 18sm + 44st + 44a	22
<i>Hypostomus</i> aff. <i>paulinus</i>	74	10m + 12sm + 20st + 32a	15
<i>H. paulinus</i>	76	10m + 18sm + 44st + 44a	10
<i>H. prope paulinus</i>	76	6m + 18sm + 12st + 40a	13
<i>H. paulinus</i>	76	6m + 16sm + 54st + 54a	23

<i>Hypostomus</i> aff. <i>paulinus</i>	76	8m + 18sm + 50st + 50a	23
<i>H. albopunctatus</i>	72	10m + 20sm + 44st + 44a	2
<i>H. albopunctatus</i>	74	10m + 20sm + 16st + 28a	13
<i>H. albopunctatus</i>	74	8m + 14sm + 16st + 36a	15
<i>H. albopunctatus</i>	74	10m + 20sm + 44st + 44a	22
<i>H. albopunctatus</i>	74	10m + 20sm + 44st + 44a	23
<i>Hypostomus</i> aff. <i>agna</i>	74	8m + 10sm + 32st + 24a	9
<i>Hypostomus</i> sp.	74	12m + 20sm + 42st + 42a	18
<i>H. nigromaculatus</i>	74	8m + 22sm + 44st + 44a	23
<i>H. nigromaculatus</i>	76	8m + 20sm + 48st + 48a	5
<i>H. nigromaculatus</i>	76	8m + 18sm + 20st + 30a	16
<i>H. prope iheringi</i>	74	10m + 14sm + 20st + 30a	13
<i>H. iheringii</i> (<i>Hypostomus</i> aff. <i>auroguttatus</i> in Ref. 2)	76	8m + 30sm + 38st + 38a	22
<i>H. iheringii</i>	80	8m + 16sm + 28st + 28a	12
<i>H. iheringii</i>	80	8m + 14sm + 58st + 58a	23
<i>H. aff. auroguttatus</i>	76	8m + 20sm + 38st + 38a	2
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	12m + 16sm + 48st + 36a	14
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	12m + 20sm + 44st + 44a	14
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	10m + 14sm + 52st + 52a	14
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	10m + 20sm + 46st + 46a	14
<i>Hypostomus</i> sp. E	80	8m + 16sm + 56st + 56a	2
<i>H. topavae</i> (<i>Hypostomus</i> sp. E. in Ref. 2)	80	8m + 16sm + 56st + 56a	22
<i>Hypostomus</i> sp 3-Corrego Salobrinha	82	10m + 32sm + 42st + 42a	6
<i>H. mutuae</i>	82	4m + 18sm + 60st + 60a	23
<i>Hypostomus</i> sp-3-Corrego Salobrinha	84	10m + 32sm + 42st + 42a	6
<i>Hypostomus</i> sp-2-Rio Perdido	84	6m + 16sm + 62st + 62a	6

*2n = número diploide; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico. Referências: (1) Muramoto e Ohno, 1968; (2) Artoni e Bertollo, 1996; (3) Kavalco et al., 2004; (4) Alves et al., 2006; (5) Rubert et al., 2008; (6) Cereali et al., 2008; (7) Milhomem et al., 2010; (8) Mendes-Neto et al., 2011; (9) Martinez et al., 2011; (10) Rubert et al., 2011; (11) Endo et al., 2012; (12) Traldi et al., 2012; (13) Alves et al., 2012; (14) Bitencourt et al., 2012; (15) Bueno et al., 2013; (16) Pansonato-Alves et al., 2013; (17) Maurutto et al., 2013; (18) Becker et al., 2014; (19) Bueno et al., 2014; (20) Baumgartner et al., 2014; (21) Oliveira et al., 2015; (22) Lorscheider et al., 2015; (23) Rubert et al., 2016; (24) Kamei et al., 2017; (25) Brandão et al., 2018.

Os marcadores bioquímicos, por sua vez, são capazes de quantificar e qualificar qualquer mudanças mensuráveis, como por exemplo respostas biológicas que podem estar relacionadas à exposição ou a efeitos tóxicos de estressores ou produtos químicos ambientais (Van der Oost et al., 2003). As diferenças na composição de aminoácidos das isoenzimas e proteínas solúveis podem ser usadas para investigar a variação genética dentro das espécies e as relações filogenéticas entre as espécies (Buvanendran e Finney, 1967). Contudo, a aplicação desses marcadores foi limitada porque as proteínas e isoenzimas não são materiais genéticos e sim produtos de expressão gênica, podendo, portanto, serem afetadas por fatores ambientais (Drinkwater e Hetzel, 1991). Além disso, outras desvantagens dos marcadores bioquímicos estão relacionadas ao fato de que estes marcadores demonstram baixo grau de polimorfismos e as várias classes genotípicas são

indistinguíveis no nível fenotípico devido ao efeito de dominância do marcador e a baixa cobertura do genoma (Montaldo e Meza-Herrera, 1998).

Em termos biológicos, um dos parâmetros utilizados para avaliar as alterações causadas por agentes genotóxicos é através da análise de fragmentos de material genético, conhecidos como micronúcleos, que avalia o efeito de agentes clastogênicos, os quais podem provocar quebras cromossômicas (Normann et al., 2008). Em peixes, trabalhos demonstraram respostas de sensibilidade à marcadores bioquímicos selecionados frente a exposição de poluentes manipulados em laboratório (Leon et al., 2007; Thorpe et al., 2009) e em coletas de dados realizadas *in situ* (Hecker et al., 2002; Lavado et al., 2006; Randak et al., 2009).

Ghisi et al. (2016) realizaram uma análise multivariada e integrativa afim de avaliar a resposta de *H. ancistroides* sobre um gradiente de poluição no principal reservatório de abastecimento de água doce do noroeste do Estado do Paraná (Brasil). Os autores avaliaram o teste do micronúcleo, as anormalidades nucleares dos eritrócitos, o ensaio cometa, a dosagem da enzima acetilcolinesterase em tecidos cerebrais e musculares e performaram a análise histopatológica do fígado e brânquias. A análise geral multivariada indicou alteração em todos os parâmetros biológicos e variações nas taxas destes de acordo com a época do ano avaliada, sendo mais expressiva na primavera. Os resultados evidenciaram a importância de análises integradas, avaliando diversos parâmetros biológicos e a possibilidade de usar as respostas dos organismos como marcador frente aos níveis de poluentes no meio ambiente.

Normann et al. (2008) estudaram o efeito do dicromato de potássio na eritropoiese de exemplares de *H. plecostomus*, utilizando o teste de micronúcleo. Trinta exemplares e 30 peixes do grupo controle foram submetidos a 12 mg/L de dicromato de potássio e os resultados confirmaram o efeito clastogênico do dicromato de potássio. Apesar das ressalvas quanto ao uso de marcadores bioquímicos, a sensibilidade ao íon avaliado e a importância econômica e ecológica de espécies de cascudos como *H. plecostomus* mostram que há relevância em utilizar estes organismos no monitoramento e avaliação de efeitos agudos frente a derramamentos e contaminação por poluentes metálicos em rios de água doce.

Marcadores enzimáticos

Estes marcadores também são considerados bioquímicos, mas o termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (Moss, 1982). A análise de marcadores enzimáticos, como as aloenzimas ou isoenzimas, foi por muito tempo uma das abordagens mais populares no exame da genética de populações e estrutura de estoque em peixes (Suneetha, 2000). Em sistemas enzimáticos, as diferenças nas frequências relativas dos alelos são usadas para quantificar a variação genética e distinguir entre unidades genéticas nos níveis de populações, espécies e designações taxonômicas mais altas (Liu e Cordes, 2004).

O princípio básico da técnica reside no uso de eletroforese em gel de poliacrilamida (Smithies, 1955) e na visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos (Hunter e Markert, 1957). Estudos clássicos de genética de populações como o de Lewontin e Hubby (1966), por exemplo, tiveram um efeito significativo na disseminação da técnica de análise isoenzimática, a qual foi aplicada em um grande número de organismos com o objetivo de responder às mais diversas questões genéticas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Análises com isoenzimas permitiram avaliar, entre outros fatores, o isolamento reprodutivo e a variabilidade genética entre populações de peixes (Limeira et al., 2009; Philippsen et al., 2009; Renesto et al., 2007; Zawadzki et al., 2004).

Na base de dados analisada, encontrou-se nove artigos (1999-2016) onde foram avaliadas espécies de peixes do gênero *Hypostomus* através de sistemas enzimáticos. O trabalho mais antigo foi publicado por Zawadzki et al. (1999), onde os autores aliaram análises morfométricas a quatorze sistemas isoenzimáticos (fosfatase ácida, álcool desidrogenase, aspartato aminotransferase, glicose desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, isomerase glicose-6-fosfato, glicerol-3-fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, lactato desidrogenase, malato desidrogenase, enzima málica, peroxidase, fosfoglucomutase, superóxido dismutase) para examinar as espécies *H. myersi*, *Hypostomus* aff. *commersoni* e *H. derbyi*. Como resultado, os coeficientes de distância genética e identidade de Nei (Nei, 1978) indicaram que as duas espécies morfologicamente mais similares, *Hypostomus* aff. *commersoni* e *H. derbyi*, também foram as menos divergentes geneticamente. *H. myersi*, por sua vez, se mostrou geneticamente mais distante de *Hypostomus* aff. *commersoni* e *H. derbyi*.

Vieira e Renesto (2016) avaliaram a variabilidade genética em três populações de *H. hermanni*, pertencentes à três bacias hidrográficas distintas, com a utilização de oito sistemas enzimáticos (aspartato aminotransferase, isomerase de glicose-6-fosfato, glicerol-

3-fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, desidrogenase 1-lactato, malato desidrogenase, malato desidrogenase NADP⁺ e fosfoglucomutase). O principal resultado encontrado, indicado pelos valores de identidade genética de Nei, mostrou que as três populações foram determinadas como sendo geneticamente muito semelhantes.

As espécies estudadas nos outros sete (7) artigos presentes na base de dados deste trabalho de revisão foram as seguintes: *Hypostomus* aff. *commersoni*, *H. derbyi* e *H. myersi* (Zawadzki et al., 2001); *H. strigaticeps*, *Hypostomus* sp. 1 e *Hypostomus* sp. 2 (Paiva et al., 2005); *Hypostomus* sp. 1, *Hypostomus* sp. 2 e *Hypostomus* sp. 3 (Renesto et al., 2007); *H. ancistroides*, *H. iheringi*, *H. margaritifera* e *H. regani* (Zawadzki et al., 2008a); *H. regani* (Zawadzki et al., 2008b); *H. nigromaculatus* e *Hypostomus* cf. *nigromaculatus* (Ito et al., 2009); *H. albopunctatus*, *H. hermanni*, *H. regani* e *Hypostomus* sp. 1/NUP 5612 (Paiva et al., 2013). Todos os artigos também estão descritos na Tabela 2, ao final deste capítulo, contendo os principais achados de cada estudo, elencando os métodos utilizados e as referências de cada artigo.

Marcadores Moleculares/DNA

As técnicas moleculares desempenham um papel importante na compreensão das bases do polimorfismo presente nas espécies, no diagnóstico de espécies e na diferenciação populacional (Avice et al., 1996). Os marcadores moleculares baseiam-se nas mutações da sequência nucleotídica no genoma dos organismos (Yang et al., 2013), sendo passíveis de serem investigados através do polimorfismo presente entre as sequências de diferentes indivíduos (Segman et al., 2006). Eles podem ser observados através de variações que ocorrem em uma determinada porção do DNA e comparado entre os indivíduos de uma espécie. Estas variações podem ser provenientes de diferentes formas de mutações, como inserções, deleções e substituições ou até mesmo devido a erros na replicação do DNA repetitivo em tandem (O'Brien, 1991; Kadirvel et al., 2018).

Marcadores moleculares são ferramentas úteis em estudos de variabilidade genética, fornecendo meios eficientes para ligar variações fenotípicas e genotípicas inter/intraespecíficas (Varshney et al., 2005), pois acessam informações genômicas, evitando o efeito ambiental e consequentemente erros de identificação (Borba et al., 2005). Os marcadores moleculares geralmente utilizados em trabalhos de conservação genética incluem os de sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares e genotipagem de diferentes loci nucleares, como os microssatélites (SSRs – *Simple Sequence Repeats*),

AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) (Aitken et al., 2004), PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction e Restriction Fragment Length Polymorphism*), análises de polimorfismo de DNA amplificadas ao acaso (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*) e, mais recentemente, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPS – *Single Nucleotide Polymorphisms*) (Piorski et al., 2008).

Marcadores moleculares são frequentemente utilizados para estudos onde o objetivo é a avaliação da diversidade genética e caracterização genética de populações. Os dados gerados pelo emprego de marcadores moleculares são altamente informativos e podem ser avaliados em interação com os processos evolutivos das espécies (Sales et al., 2001). Eles permitem estimar a distribuição da variabilidade dentro e entre as populações naturais e estoques, bem como fazer estimativas indiretas de fluxo gênico, que são particularmente importantes para otimizar programas de conservação *in situ* (Dawson et al., 1997; He et al., 2004, Godoy et al., 2018).

PCR (Polymerase Chain Reaction)

A grande maioria dos marcadores moleculares recentes são baseados na reação em cadeia da polimerase, que revolucionou todo o campo da genética. De forma resumida, a PCR é um método simples e automatizado para produzir muitas cópias de um fragmento específico de DNA (Conner e Hartl, 2004). Para isto, oligonucleotídeos curtos (normalmente 20 a 30 nucleotídeos de comprimento) que são complementares às duas extremidades do fragmento a ser amplificado, são sintetizados para serem utilizados como *primers* para a síntese de DNA de regiões variáveis do genoma (Conner e Hartl, 2004; Teneva, 2009).

A PCR é uma técnica poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Esta técnica de amplificação é rápida e simples, sendo que uma de suas maiores vantagens é o fato de requerer pouca quantidade de DNA inicial, já que são feitas várias cópias do material genético no processo (Conner e Hartl, 2004). Além disso, é adequada para uso com vários marcadores de DNA, como os AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Erlich, 1991; Sunnucks, 2001; Freeman et al., 2006).

Marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

O uso da técnica de RFLP visa detectar diferenças na sequência de DNA entre indivíduos distintos cujo DNA foi extraído e submetido a clivagem por enzima de restrição (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Para efetuar a detecção dos marcadores RFLP, os fragmentos separados no gel de agarose pela eletroforese são transferidos para uma membrana, geralmente de nitrocelulose, por capilaridade ou vácuo através de um processo denominado "*Southern Blot*" (Southern, 1975) e em seguida visualizados por métodos químicos ou radiográficos.

A RFLP foi a primeira técnica a ganhar ampla utilização na genética de populações. Nesta técnica, uma amostra de DNA é misturada com enzimas de restrição, que clivam o DNA em locais de restrição com sequências curtas específicas de DNA. Os marcadores RFLPs têm as vantagens de serem codominantes e terem sido desenvolvidos para muitos organismos, mas são consideravelmente mais trabalhosos e requerem mais DNA do que as técnicas baseadas em PCR (Conner e Hartl, 2004).

Com o avanço das tecnologias, as possibilidades em análises genéticas também evoluíram, sendo possível desenvolver a técnica de PCR-RFLP, uma associação da técnica de RFLP (Grodzicker et al., 1974) com a técnica de PCR, caracterizando uma terceira técnica que permitiu acessar as regiões específicas do genoma nuclear e do genoma mitocondrial (Rodrigues, 2010). Isso trouxe uma vantagem em relação à técnica de RFLP original utilizando principalmente o genoma mitocondrial completo, devido ao baixo custo e a minimização da presença de erros nos resultados obtidos, já que a PCR-RFLP constitui uma técnica mais simples e rápida (Garcez, 2006).

Em peixes, a combinação destas técnicas vem sendo utilizada em pesquisas de variabilidade genética populacional, bem como na identificação de espécies, na identificação de híbridos e em estudos filogenéticos (Wolf, 2000). Apesar disso, não foram encontrados até a presente data, trabalhos utilizando a técnica em exemplares do gênero *Hypostomus*, apenas em outros gêneros da família Loricariidae. Em 2010, Rodrigues avaliou doze populações de diferentes espécies do gênero *Rineloricaria* foram estudadas através de análises de PCR-RFLP e sequenciamento mitocondrial, onde os dados gerados diferiram ligeiramente das topologias baseadas em dados de sequenciamento. O autor encontrou que muitos grupos foram recuperados com as mesmas relações internas e em uma mesma posição na árvore filogenética, indicando que estas análises, mesmo sendo

menos refinadas do que as de sequenciamento, recuperam praticamente as mesmas relações filogenéticas propostas a partir de sequências do gene. De acordo com a autora, trata-se de uma técnica muito mais barata e extremamente eficiente, permitindo analisar um maior número de indivíduos simultaneamente.

Marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Um dos principais avanços na área de marcadores genéticos baseados em PCR ocorreu em 1990, com a possibilidade de se utilizar *primers* mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade de conhecimento prévio do genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1998). O DNA polimórfico amplificado ao acaso é uma técnica simples e direta, baseada em PCR que utiliza sequências nucleotídicas arbitrárias para a amplificação de regiões discretas do genoma (Williams et al., 1990). A amplificação do DNA genômico através de marcadores RAPD permite a detecção de níveis elevados de polimorfismos (Williams et al., 1990; Welsh e McClelland, 1990). A técnica de RAPD detecta tanto sequências de DNA codificadoras quanto não-codificadoras, já que muitas das sequências polimórficas mais informativas são aquelas derivadas de sequências repetitivas (não-codificadoras) no genoma das espécies (Haymer, 1994).

As vantagens dos marcadores RAPD são o seu baixo custo, o fato de serem um método onde um grande número de bandas é produzido não havendo a necessidade de conhecimento prévio das sequências nucleotídicas que se deseja amplificar, além de não demandar grandes quantidades de DNA inicial (Hadrys et al., 1992; Vignal et al., 2002; Mburu e Hanotte, 2005). Entretanto, o uso deste marcador é limitado por diversas características, como o aparecimento de bandas não parentais na progênie restringindo o uso para mapeamento molecular (Riedy et al., 1992). Além disso, esse marcador apresenta comportamento dominante e de baixa reprodutibilidade entre diferentes laboratórios e experimentos, podendo resultar em uma baixa especificidade ou até mesmo no não anelamento do *primer* (Schierwater e Ender, 1993; Skroch e Nienhuis, 1995).

O RAPD é uma das ferramentas moleculares mais simples para a análise genética e sistemática de vários organismos e foi aplicado com sucesso no estudo de espécies de bagres (Bartish et al., 2000). Esta técnica oferece uma maneira rápida e barata de analisar, distinguir, monitorar peixes selvagens e criados em incubadoras (Brahmare et al., 2006). Os marcadores RAPD ganharam considerável atenção particularmente na genética de

populações (Lu e Rank, 1996) para caracterização e diferenciação de espécies e subespécies, para identificação de peixes ginogenéticos (Chen e Leibenguth, 1995; Corley-Smith et al., 1996) e para estudos de mapeamento genético em peixes (Postlethwait et al., 1994; Kazianis et al., 1996).

Marcadores RAPD mostraram estar geneticamente ligados a características de interesse, podendo ser usados na identificação de indivíduos e linhagens genéticas, diagnóstico patogênico e seleção de características em programas de melhoramento genético (Yoon e Kim, 2001). Estudos sobre a conservação genética de populações de peixes em rios da América do Sul aplicaram com sucesso esses marcadores para acessar a diversidade genética de diferentes espécies (Almeida et al., 2001; Dergam et al., 2002; Wasko e Galetti Jr, 2002; Almeida et al., 2003; Leuzzi et al., 2004; Matoso et al., 2004; Wasko et al., 2004). Apesar das qualidades desses marcadores no estudo de peixes, foi possível encontrar apenas um trabalho em que esta ferramenta foi aplicada ao estudo de exemplares de *Hypostomus*.

Em Sofia et al. (2008), os autores aplicaram marcadores RAPD para analisar a diversidade genética em populações de *H. ancistroides*, coletadas em quatro locais ao longo de um riacho urbano no sul do Brasil. Os 11 *primers* utilizados na análise de RAPD amplificaram 147 loci, dos quais 76 (51,7%) foram polimórficos. As proporções de loci polimórficos observados nas quatro unidades amostrais foram: 29,93% (S1), 31,97% (S2), 23,81% (S3) e 38,77% (S4). A análise de variância molecular (AMOVA) indicou diferenciação genética moderada entre os cascudos amostrados nestas quatro localidades. Contudo, os baixos níveis de diferenciação genética que foram detectados em todos os grupos estudados podem estar relacionados a diferentes fatores, incluindo o hábito sedentário desses peixes, o que pode ter implicado na baixa variação genética encontrada para as populações avaliadas e verificada também à nível individual nos representantes de *H. ancistroides* de cada localidade.

Marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP é uma técnica híbrida de RFLP e RAPD que combina muitas das vantagens de cada um, onde o genoma do organismo do estudo é clivado com enzimas de restrição (como em RFLP) e então alguns desses fragmentos são seletivamente amplificados com sequências aleatórias provenientes da PCR (como em RAPD) (Mueller e Wolfenbarger, 1999). Marcadores AFLP são mais reprodutíveis do que os RAPDs porque os *primers*

usados para amplificação são tipicamente cerca de duas vezes mais longos, fazendo com que erros na ligação ao DNA modelo sejam menos frequentes. Tanto os RAPD quanto os AFLP revelam a variação genética em uma população ao rastrear a presença ou ausência de uma sequência de DNA aleatória ou parcialmente aleatória (Conner e Hartl, 2004).

A maior vantagem do AFLP é que ele é capaz de produzir um grande número de bandas polimórficas em uma única análise, reduzindo significativamente o custo de análise por marcador (Vos et al., 1995). O polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado é uma das metodologias de DNA *fingerprinting*, ou seja de impressão digital genética, mais utilizadas e tem sido amplamente adotada como fonte de marcadores moleculares para mapeamento genômico (Hanley et al., 2002), genética ecológica (Bensch e Akesson, 2005), avaliação de germoplasma e de variedades (Zhou et al., 2005) e estudos de filogenia e especiação (Emelianov et al., 2004; Bussell et al., 2005).

Entre os vertebrados, Razzoli et al. (2003) demonstraram o poder da discriminação e a adequação das AFLPs para detectar a diferenciação genética em um grupo de roedores domésticos endogâmicos. No entanto, a mesma abordagem e a aplicação destes marcadores às espécies de peixes e outros taxa aquáticos ainda são limitadas, sendo possível encontrar apenas alguns poucos trabalhos publicados (Maldini et al., 2006). Não há registros de estudos avaliando espécies do gênero *Hypostomus* através destes marcadores, mas é possível encontrar trabalhos avaliando espécies de bagres da ordem Siluriformes (Wang et al., 2000), a mesma em que este gênero está inserido. Liu et al. (1998 e 1999) observaram a herança e segregação dos marcadores AFLP em duas espécies de bagres (*Ictalurus punctatus* e *I. furcatus*), indicando o potencial destes marcadores na construção de uma ligação genética e mapas quantitativos de traços (QTL - *Quantitative Trait Loci*), bem como para a seleção assistida por marcadores e o potencial de AFLP (*fingerprinting*) em fornecer marcadores moleculares para distinguir diferentes populações de peixes (Takagi et al. 1998).

Em Maldini et al. (2006), os autores avaliaram o uso potencial da tecnologia AFLP em espécies de peixes e frutos do mar provenientes de produtos comerciais processados e estoques domésticos. O estudo gerou uma base de dados de peixes, moluscos e crustáceos, com o objetivo de identificar espécies de origem comercial por padrões de AFLP previamente definidos. Diferentes enzimas de restrição e *primers* foram selecionados a partir de 20 combinações rastreadas em relação ao número total de fragmentos detectados e polimórficos. A comparação de marcadores informativos entre produtos desconhecidos congelados ou frescos e amostras de referência permitiu a

identificação precisa de 32 espécies. A caracterização taxonômica foi realizada a nível de espécie ou de população, já que, de acordo com os autores, a variação da AFLP no nível populacional é particularmente útil para a rastreabilidade das linhagens domésticas. Os resultados de BSI (*Band Sharing Index*) e a porcentagem de fragmentos polimórficos são apresentados e discutidos em relação à ampla aplicabilidade de AFLPs tanto para segurança alimentar relacionada ao comércio de peixes e frutos do mar quanto para testes de autenticidade em áreas relativas à rastreabilidade de alimentos, manejo e repovoamento de estoques.

Dado o seu poder de diferenciação, as potenciais aplicações de AFLP em espécies de peixes incluem – mas não estão limitadas – à identificação de estoques pesqueiros, análise de recursos genéticos, identificação de híbridos, estimativa de contribuição relativa em programas de melhoramento genético, discriminação e identificação de peixes cativos e selvagens, parentalidade ou análise forense, taxonomia e sistemática baseadas nas relações de aglomerados de bandas AFLP, estudos comportamentais, avaliação de desempenho e mapeamento QTL (Vos et al. 1995; Liu et al. 1998, Liu et al., 1999).

Marcadores VNTRs (VNTRs Variable Number Tandem Repeats)

Marcadores VNTRs são regiões não codificantes do genoma que consistem em algumas ou várias cópias da mesma sequência nucleotídica. A sequência repetida pode ter de dois a 64 nucleotídeos de comprimento. As sequências mais longas (10-64 nucleotídeos) são chamadas de minissatélites, enquanto repetições mais curtas (2-9 nucleotídeos) são chamadas de microssatélites (Conner e Hartl, 2004).

Além da possibilidade de classificação de acordo com o tamanho da unidade repetida, essas sequências também podem mostrar um número diferente de repetições intraespecíficas, gerando moléculas com tamanhos distintos (Ludwig et al., 2000; Ravago et al., 2002; Shui et al., 2008; Abahyankar et al., 2009). Há registro de estudos examinando a região controle de peixes teleósteos e identificando sequências VNTRs em domínios mitocondriais (Terencio et al., 2012), indicando a aplicabilidade destes marcadores na caracterização ictiofaunística.

Marcadores microssatélites (Simple Sequence Repeats - SSRs)

Os marcadores microssatélites baseiam-se na amplificação via PCR de regiões específicas do genoma, utilizando um par de *primers* loci-específicos (Taylor et al., 1994). Os microssatélites são abundantes no genoma, fáceis de automatizar, codominantes, multi-alélicos, robustos e reprodutíveis (Revaldaves et al., 2005). Os padrões de polimorfismo exibidos pelos SSRs são maiores do que em qualquer outro sistema de marcadores contemporâneos (Turchetto-Zolet et al., 2017). O advento da NGS (*Next Generation Sequencing* ou Sequenciamento de Nova Geração) simplificou muito o processo de isolamento de microssatélites, facilitando o desenvolvimento de alto rendimento de marcadores mesmo em espécies não-modelo em curto espaço de tempo e com bom custo-benefício (Csencsics et al., 2010).

Este marcador tem obtido destaque devido a atributos como hipervariabilidade, natureza multialélica, herança codominante, reprodutibilidade, cobertura ampla do genoma, localização cromossômica específica e genotipagem de alto rendimento (Parida et al., 2006). Sequências de DNA que flanqueiam microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (Borém e Caixeta, 2006).

Em peixes, os SSRs têm sido utilizados para o monitoramento genético, por meio de sistemas de cruzamento, fluxo gênico e estrutura genética de estoques pesqueiros (Yue e Orban, 2002). Apesar das vantagens dos marcadores microssatélites na investigação genética populacional de várias espécies, estudos sobre o desenvolvimento, caracterização e uso de loci microssatélites em espécies de peixes neotropicais ainda são escassos (Carvalho-Costa et al., 2006; Morelli et al., 2007; Batista et al., 2009).

Para o gênero *Hypostomus*, ainda é possível observar uma grande lacuna no que diz respeito a trabalhos desenvolvendo e avaliando marcadores microssatélites. A base de dados avaliada neste capítulo retornou apenas dois trabalhos, onde Telles et al. (2010) e Galindo et al. (2015) desenvolveram loci microssatélites para *H. gymnorhynchus* (Norman, 1926) e *H. ancistroides*, respectivamente, e representam os dois únicos estudos, até o momento, focados no desenvolvimento de microssatélites em espécies de *Hypostomus*.

Em Telles et al. (2010), 10 loci microssatélites foram isolados e caracterizados em *H. gymnorhynchus*. Vinte e quatro *primers* foram desenvolvidos e 14 indivíduos coletados no rio Caiapó, no centro do Brasil, foram genotipados usando estes *primers* para analisar o polimorfismo em cada locus. Todos os loci apresentaram baixo polimorfismo, com baixo número de alelos por locus (1 ou 2), exceto em Hg_E19, onde foram registrados 11 alelos.

As heterozigosidades esperadas variaram de 0,182 a 0,901, e todos os loci polimórficos divergiram significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A probabilidade combinada de identidade foi alta (0,0026) e a probabilidade de exclusão de paternidade foi baixa (0,857). Os autores concluem que, de acordo com os dados encontrados, estudos posteriores sobre análise de parentesco e estrutura genética exigirão a busca de um novo conjunto de loci polimórficos para a espécie analisada.

Galindo et al (2015) detalharam 13 novos loci microssatélites polimórficos em *H. ancistroides* e avaliaram sua utilidade para estudos genéticos populacionais. A análise de 30 indivíduos revelou um total de 99 alelos diferentes (variando de dois a 15 alelos por loco). Um dos 13 loci apresentou desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (a condição da população caracterizada pelas frequências genotípicas produzidas por combinação (acasalamento) aleatório), provavelmente devido à presença de alelos nulos, inferidos a partir do excesso de homozigotos na amostra. Os autores ressaltam que os 13 marcadores desenvolvidos e validados em seu estudo devem mitigar a falta de marcadores genéticos adequados para estudos genéticos populacionais para *H. ancistroides* e as amplificações intraespecíficas bem-sucedidas de alguns loci destacam o uso potencial desses marcadores para outras espécies do gênero.

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)

Em 1996, Lander propôs uma nova tecnologia de marcadores moleculares chamada SNP. Quando um único nucleotídeo (Adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G)) na sequência do genoma é alterado, isso representará o SNP (Al-Samarai e Al-Kazaz, 2015). Em outras palavras, refere-se a um polimorfismo de sequência causado por uma única mutação - incluindo transições em uma única base, transversões, inserções e deleções - de nucleotídeo em um locus específico na sequência do DNA (Jarne e Lagoda, 1996; Yang et al., 2013). Um polimorfismo de nucleotídeo único é uma variação de sequência de DNA que ocorre quando um único nucleotídeo difere em um par de cromossomos homólogos (Ding e Guo, 2018). Um dos objetivos de examinar os dados do SNP é descobrir regras subjacentes ocultas nos dados, pois estes contêm muitas informações, incluindo mutação causativa, histórico evolutivo e diferenças populacionais (Cai et al., 2009; Ding e Guo, 2018).

Os SNPs são amplamente distribuídos dentro do genoma e podem ser encontrados em regiões codificantes e não-codificantes de genes ou ainda entre dois genes (região

intergênica) com diferentes frequências (Sobrino et al., 2005; Xu, 2010). Diferentes tipos de ensaios de genotipagem de SNPs foram desenvolvidos com base em diferentes mecanismos moleculares, sendo os mais importantes a extensão de *primers* (sequências iniciadoras), clivagem invasiva, ligação de oligonucleotídeos e hibridização alelo-específica (Sobrino et al., 2005). Métodos recentes de genotipagem de alto rendimento como NGS (*Next-Generation Sequencing*) e GBS (*Genotyping by Sequencing*) fazem com que os SNPs sejam os marcadores mais atraentes para a genotipagem (Jing et al., 2007).

Apesar de não terem sido encontrados até o momento estudos avaliando espécies do gênero *Hypostomus* através de marcadores SNPs, eles são causados por mutações pontuais distribuídas por todo o genoma e têm sido frequentemente utilizadas em estudos genéticos de peixes (Vera et al. 2013; Zhang et al. 2015; Liu et al. 2016). Mastrochirico-Filho et al. (2016) identificaram e validaram SNPs associados a genes do transcriptoma hepático do peixe popularmente conhecido como pacu (*Piaractus mesopotamicus*), através de análises genéticas em uma população natural (Rio Paraná-BR). Trinta e dois SNPs polimórficos foram genotipados e validados com sucesso, alguns deles relacionados a genes do sistema imune. Os valores de heterozigosidade observada e esperada variaram de 0,059 a 0,706 e 0,058 a 0,507, respectivamente. Todos os loci estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (0,05). Os resultados mostraram recursos genômicos úteis para o pacu, com aplicabilidade em fins de conservação e indústria aquícola, utilizando marcadores SNPs.

Em outro estudo, Kawase et al. (2018) identificaram SNPs associados aos padrões sexuais da espécie de peixe *Seriola dumerili* usando informações de SNP de 10 machos e 10 fêmeas por um teste de associação, determinando que os SNPs associados ao sexo estavam no cromossomo 12 e cobertos principalmente com dois "*scaffolds*" (em genômica, o primeiro conjunto de sequência completo, a partir do qual novas leituras são alinhadas). Os genótipos de SNPs associados ao sexo indicaram que as fêmeas são o sexo heterogâmico (ZZ / ZW). Além disso, os autores compararam a estrutura genômica de *S. dumerili* com as de *S. quinqueradiata*, *S. dorsalis* e medaka (*Oryzias latipes*). Os alinhamentos do genoma completo e a análise de sintenia (presença simultânea no mesmo cromossomo de dois ou mais loci genéticos determinados em um indivíduo ou espécie, independentemente de seu ligamento genético) indicaram que o sistema de determinação do sexo de *S. dumerili* é fortemente diferente do de medaka e subentende que o sistema de determinação do sexo é conservado nas espécies de *Seriola* avaliadas de forma bem sucedida através desta tecnologia.

Os SNPs estão localizados em todo o genoma e podem ser descobertos em regiões genéticas com divergência acima da média (Nosil et al., 2009), aumentando sua utilidade para a identificação de estoques genéticos. Além disso, os SNPs não sofrem muitas das desvantagens do uso de outros marcadores moleculares, como os microssatélites: os marcadores SNP são receptivos à genotipagem automatizada de alto rendimento necessária para grandes projetos, as taxas de erro de genotipagem são muito baixas e os testes normalmente não exigem padronização entre os laboratórios e, portanto, uma linha de base de sequenciamento por SNP é imediatamente útil para qualquer grupo ou agência em que genótipos de uma amostra é avaliada com os marcadores utilizados nesta base de referencia (Seeb et al., 2011) .

Novas gerações de tecnologias genômicas, como técnicas de sequenciamento de molécula única e de sequenciamento baseado em nanoestruturas, apresentam o potencial para alcançar formas cada vez mais rápidas, baratas, precisas e confiáveis de produzir dados sequenciais (Zhou et al., 2010).

Next Generation Sequencing (NGS)

O sequenciamento de DNA tornou-se possível em 1975, quando foi descrito o método para determinar a ordem precisa dos nucleotídeos dentro de uma molécula de DNA (Sanger e Coulson, 1975; Sanger et al., 1977). Depois que a nova forma de sequenciamento, representada pelos SNPs, provou ser uma excelente maneira de tipificar polimorfismos de nucleotídeo único, ou mutações pontuais, na sequência do DNA (Malmström et al., 2010), a primeira década do século XX viu a introdução da tecnologia NGS. A partir da qual, as limitações do método anteriormente disponíveis foram suprimidas e a possibilidade de fazer milhões de leituras, sequenciadas em paralelo - em vez do procedimento onde uma molécula de DNA é sequenciada de cada vez - se tornou realidade (Linderholm, 2016).

Nos últimos anos, houve surgimento de microarranjos, uma tecnologia de sequenciamento que tem sido amplamente aplicada ao estudo de genomas e transcriptomas (Sotiriou e Pusztai, 2009; Correa e Reis-Filho, 2009). No entanto, o perfil de expressão baseado nesta tecnologia apresenta limitações, uma vez que o perfil de expressão dessas ferramentas fornece apenas uma avaliação semiquantitativa da expressão gênica, sendo limitado pela natureza das sondas incluídas na plataforma de sequenciamento e sua sensibilidade e especificidade (Reis-Filho, 2009). Há algum tempo, testemunhamos mais

uma revolução molecular, que supera as mudanças de paradigma trazidas pela introdução dos *microarrays*: o advento do sequenciamento de nova geração (Correa e Reis-Filho, 2009). Essa tecnologia permite o acréscimo de informações qualitativas e quantitativas sobre qualquer ácido nucleico e com um rendimento superior aos outros métodos, enquanto incorre em custos relativamente limitados (Correa e Reis-Filho, 2009, Wang et al., 2009).

Todas as disciplinas biológicas que dependem de dados de sequência de DNA foram fundamentalmente alteradas nos últimos anos pela introdução de NGS (Egan et al., 2012). Além da capacidade de sequenciar o DNA, a tecnologia NGS pode ser aplicada ao sequenciamento de RNA (Wang et al., 2009). Quatro aplicações principais já foram desenvolvidas - sendo elas a expressão gênica digital, o sequenciamento de RNA, o sequenciamento de RNA final pareado e o sequenciamento de RNA pequeno e não-codificante (Morozova e Marra, 2008; Wang et al., 2009).

Pesquisadores que estudam biologia de peixes podem obter uma grande quantidade de *insights* usando plataformas de NGS para aprender mais sobre o controle de processos biológicos em todo o genoma e transcriptoma, descobrir novos biomarcadores para aplicações ecotoxicológicas, caracterizar vias de toxicidade e investigar questões evolutivas em maior grau de resolução do que anteriormente fornecido pelos marcadores genéticos clássicos (Wang et al., 2009).

Diversas espécies já tem seus genomas sequenciados, inclusive diversas espécies de peixe (*Salmo solar* em Quinn et al., 2008; *Zoarcetes viviparus* em Kristiansson et al., 2009; *Danio rerio* em Soares et al., 2009; *Amphilophus* sp. em Elmer et al., 2010; *Oryzias latipes* em Li et al., 2010; *Acipenser fulvescens* em Hale et al., 2010; *Oncorhynchus mykiss* em Salem et al., 2010; *S. trutta* em Keller et al., 2011; *Gadus morhua* em Star et al., 2011; *Hypophthalmichthys* sp. em Chi et al., 2011; *Ictalurus* sp. em Liu et al., 2011; *Oncorhynchus keta* em Seeb et al., 2011; *Limanda limanda* em Mirbahai et al., 2011; *Fundulus grandis* em Whitehead et al., 2011).

Ainda assim, na base de dados avaliada encontrou-se apenas um trabalho que fez uso desta tecnologia para acessar o genoma de espécies do gênero *Hypostomus*. Neste, Liu et al. (2014) sequenciaram o genoma mitocondrial completo de *H. plecostomus* sem o processamento prévio da amostra ou o desenho de *primers*. A análise de bioinformática resultou em toda a sequência do genoma mitocondrial com comprimento de 16.523 bp, constituído por 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes tRNA, 2 genes rRNA e 1 região de controle, mostrando a estrutura típica da molécula circular do genoma mitocondrial como em outros vertebrados. A composição total do genoma foi estimada em

31,8% A, 27,0% T, 14,6% G e 26,6% C, com um viés de A/T de 58,8%. De acordo com os autores, ao fornecer a sequência completa do genoma mitocondrial de *H. plecostomus* através do uso de plataforma NGS, este trabalho torna-se valioso para a identificação de espécies, análise filogenética e estudos de conservação genética em cascudos.

Filogenia/Filogeografia/ DNA mitocondrial (mtDNA)

Um dos objetivos centrais da biologia evolutiva é compreender por que os padrões de riqueza das espécies e sua diversidade fenotípica estão distribuídas de forma desigual através da extensa árvore da vida (Stanley, 1998; Mace et al. 2003; Venditti et al., 2010; Rabosky et al., 2012). As causas dessa disparidade podem variar amplamente e ser classificadas entre os mecanismos que aceleram as taxas de especiação e/ou diversificação fenotípica (radiação adaptativa, anéis de mimetismo) e aquelas que não exigem diferenças nas taxas subjacentes, como as variações na idade do clado ou na taxa de extinção dos taxa (Silva et al., 2016).

Apenas recentemente, com o advento de análises moleculares de baixo custo, rápidas e abrangentes (Boubli et al., 2012; Rabosky et al., 2012; Sorenson et al., 2014) e uma crescente pletera de técnicas estatísticas comparativas (Ricklefs, 2007; Alfaro et al., 2009; Paradis, 2011; Revell, 2012; Rabosky, 2014), é que foi possível desenvolver estudos filogenéticos e filogeográficos robustos, capazes de abordar e identificar através de diversas técnicas a complexa gama de mecanismos genéticos e ecológicos atrelados a este campo de pesquisa. Ferramentas moleculares, incluindo o sequenciamento de múltiplos genes, ajudaram a identificar padrões filogenéticos e filogeográficos de espécies de peixes (Favarato et al., 2016; Ponzetto et al., 2017).

As radiações adaptativas amplamente distribuídas dos peixes de água doce podem ser excelentes sistemas para investigar as ligações entre a diversificação biológica e os processos geomorfológicos que moldam estes ambientes (Silva et al., 2016). As filogenias dos peixes de água doce refletem esses eventos (Smith, 1981; Hocutt e Wiley, 1986; Mayden, 1988; Lundberg et al., 1998; Cardoso e et al., 2012; Lujan et al., 2015; Tagliacollo et al., 2015), uma vez que os processos envolvidos tanto na divisão de populações anteriormente contíguas quanto na geodispersão passiva de espécies entre bacias de drenagens podem ser correlacionados à especiação e diversificação de peixes (Grant et al., 2007; Muneeppeerakul et al., 2008; Winemiller et al., 2008; Bertuzzo et al. al. 2009; Albert e Crampton 2010).

As taxas evolutivas das espécies podem apresentar variações entre as diversas regiões do DNA mitocondrial. Cada região codificadora possui sua própria taxa evolutiva, que depende das restrições funcionais do gene e de sua composição nucleotídica (Meyer, 1993). A região controle do mtDNA, conhecida como D-loop, é a mais variável de todo genoma mitocondrial. A taxa de evolução da D-loop é de 2 a 5 vezes maior do que os genes codificadores de proteínas, por exemplo (Aquadro e Greenberg, 1983). Em razão desta característica, esta região é a mais indicada para estudos populacionais, especificamente na primeira metade do D-loop mitocondrial, a partir do gene do RNA transportador da prolina, pois esta é a região com maior taxa de substituição nucleotídica, e por isso a mais adequada para estudos comparativos intraespecíficos (Lee et al., 1995).

A região mitocondrial D-loop é frequentemente usada para responder a uma ampla gama de questões biológicas relativas a processos populacionais, filogeografia (Cardoso e Montoya-Burgos, 2009) e identificação de espécies (Cardoso et al., 2011). Análises filogenéticas podem ser ferramentas poderosas ao usar os marcadores moleculares certos para os níveis taxonômicos corretos. O mtDNA animal é geralmente eficaz para resolver relações filogenéticas em nível de espécie e gênero entre linhagens, dadas as taxas relativamente rápidas de substituição alélica (Hare, 2001; Rubinoff e Holland, 2005). De acordo com os resultados apresentados por Montoya-Burgos et al. (2002), Montoya-Burgos (2003) e Cardoso et al. (2012), a árvore filogenética do gênero *Hypostomus* pode ser dividida em quatro clados principais.

A árvore filogenética fornecida por Montoya-Burgos et al. (2002) indicou que o gênero *Hypostomus* não é monofilético. No entanto, entre as 23 espécies analisadas, apenas duas foram excluídas desta formação (*H. emarginatus* e *H. squalinus*). Em Montoya-Burgos (2003), as relações filogenéticas de 51 representantes do gênero *Hypostomus* foram inferidas usando sequências de haplótipos da região D-loop. As principais inter-relações encontradas com estes dados mitocondriais, foram confirmadas com um subconjunto de 21 espécies usando as sequências completas da região interna do espaçador transcrito (ITS). A análise biogeográfica histórica de cada um desses clados permitiu a identificação de sete grandes eventos cladogênicos. Usando relógios moleculares calibrados das regiões D-loop e ITS, as estimativas de datas aproximadas foram atribuídas a cada um desses eventos cladogênicos, permitindo uma ligação entre quatro deles com alterações hidrogeológicas documentadas.

Em Cardoso et al. (2012), análises filogenéticas sugeriram que, na bacia do rio Paraná, a diversidade de espécies no gênero *Hypostomus* foi moldada por dois processos:

1) pela diversificação inter-bacias, gerando grupos de espécies que habitam diferentes bacias, como resultado dos eventos de dispersão; e 2) através da especiação intra-bacia, como resultado da fragmentação da bacia devido a transgressões marinhas passadas, que produziram grupos de espécies dentro de uma bacia. Usando a região D-loop como um relógio molecular, cada evento de diversificação foi datado e vinculado a eventos hidrológicos documentados ou às mudanças no nível do mar.

Borba et al. (2013) estudaram as sequências da ATP (adenosina trifosfato) sintase do mtDNA (subunidades 6/8) de 27 espécimes de *H. strigaticeps*, pertencentes a 10 populações. A análise filogeográfica mostrou a existência de oito haplótipos distintos (A-H), e a distribuição de espécimes de *H. strigaticeps* não se restringiu à bacia onde o haplótipo ancestral foi encontrado. Os haplótipos A, B e F foram os mais frequentes. A análise filogenética mostrou que as populações de *H. strigaticeps* na verdade formaram uma unidade monofilética compreendendo duas linhagens distintas. Os resultados da análise filogenética não corroboraram a hipótese de existência de espécies crípticas e as respostas obtidas com as análises filogeográficas confirmaram a presença de *H. strigaticeps* em três sub-bacias do Alto rio Paraná (Grande, Peixe e Paranapanema).

Em Silva et al. (2016), os autores buscaram testar a hipótese de que a dispersão geográfica via eventos geomorfológicos em escala de paisagem acelerou taxas de diversificação de linhagens (cladogênese), tamanho máximo do corpo (MBS – *Maximum Body Size*) e forma do corpo dentro de Hypostominae, particularmente no gênero *Hypostomus*. Para este fim, geraram uma filogenia molecular espécie-densa e cronologicamente calibrada, cujo cronograma resultante foi usado para estimar as faixas de amplitudes geográficas ancestrais dos exemplares avaliados, bem como para inferir taxas históricas de cladogênese e diversificação no habitat desses organismos, além do tamanho e forma do corpo. Neste trabalho, os dados de relações filogenéticas dentro de Hypostominae, os resultados apoiaram a monofilia de seis dos nove clados de nível de tribo identificados por Lujan et al. (2015). A respeito das taxas de especiação, os autores sugerem uma linha do tempo indicando que as taxas de especiação ao longo de Hypostominae começaram a aumentar há aproximadamente 15 milhões de anos atrás, coincidindo com a origem do gênero *Hypostomus*.

O gênero *Hypostomus* tem sua origem na ecorregião Amazônia/Orinoco e historicamente se dispersou pela América do Sul, mais precisamente ao leste da Cordilheira dos Andes. As linhagens contemporâneas de *Hypostomus* do rio Paraná são menos ricas em número de espécies, mas são mais diversas fenotipicamente do que suas

congêneres nos outros lugares onde há registro de distribuição para estes peixes. O afastamento geográfico da bacia do rio Paraná, sua história recente de incursões marinhas e sua contínua exclusão de espécies que estão amplamente disseminadas em outros rios e bacias hidrográficas da América do Sul, sugerem que a oportunidade ecológica desempenhou um papel importante na facilitação das acelerações evolutivas observadas na diversificação deste grupo.

*Síntese dos estudos genéticos com *Hypostomus**

Conforme mencionado no início deste capítulo, a Tabela 2, disposta a seguir, traz um resumo de todos os artigos que compuseram a base de dados utilizada neste trabalho. Nesta tabela os dados estão organizados em ordem cronológica de publicação, sendo que o primeiro artigo é o de autoria de Muramoto e Ohno, publicado em 1968 e o último artigo é de Brandão et al., publicado no ano de 2018. Os dados aqui agrupados estão organizados de acordo com a classe de marcador utilizado e/ou do tipo de análises performadas, descrição da(s) espécie(s) de interesse, resumo contendo os principais objetivos e resultados de cada trabalho e, por fim, as referências de acordo com o(s) autor(s) e ano de publicação de cada um dos 49 artigos que contemplam todas as classes de marcadores genéticos e moleculares aqui discutidas e que avaliaram distintas espécies do gênero *Hypostomus* nos últimos 50 anos, de acordo com os trabalhos encontrados na busca realizada para a composição da base de referência desta revisão bibliográfica.

Tabela 2. Dados genéticos de *Hypostomus*, organizado por marcador(es), espécie(s) analisada(s), objetivo/resultados e referência de acordo com autor(es) e ano de publicação.

Marcador(es)	Espécie(s) analisada(s)	Objetivo/Resultados	Referências
Citológico Cariótipo	<i>H. plecostomus</i> ; 6 sp de outros gêneros.	A fim de avaliar quantas mudanças nos valores de DNA e nos complementos cromossômicos ocorreram entre os membros diploides da ordem Ostariophysi, os autores avaliaram membros das subordens Cyprinidea (famílias Cyprinidae, Cobitidae e Characinidae) e Siluroidea (famílias Ictarulidae e Loricariidae). Os valores comparativos de DNA das sete espécies foram obtidos medindo o teor de corantes de Feulgen dos núcleos dos eritrócitos utilizando o microdensitômetro de integração de Deeley, incorporando um condensador de lise. Os números de cromossomos diploides variaram de 50 a 98 e os valores de DNA de 27 a 51% entre os organismos. Segundo os autores, os membros diploides de Ostariophysi foram submetidos a rearranjos cromossômicos extensos, bem como a constantes aumentos no conteúdo de DNA por duplicação regional de segmentos cromossômicos. A espécie <i>H. plecostomus</i> apresentou $2n = 54$.	Muramoto e Ohno, 1968.
Citológico Cariótipo	<i>H. ancistroides</i> ; <i>H. regani</i> ; <i>H. albopunctatus</i> ; <i>H. aff. auroguttatus</i> ; <i>Hypostomus</i> sp. 1;	Espécies de <i>Hypostomus</i> da Bacia do Alto Paraná (SP) foram estudadas citogeneticamente. O número de cromossomos diploides variou de $2n = 68$ a $2n = 80$, com uma estrutura cariotípica consideravelmente variável entre as espécies, mas não foram observadas diferenças cromossômicas entre machos e fêmeas. As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) também foram bastante variáveis intra e interespecificamente em termos de número e tamanho. Em geral, a heterocromatina constitutiva não foi abundante e estava geralmente localizada em pequenos blocos. Os dados sugerem que rearranjos cromossômicos Robertsonianos e inversões pericêntricas foram importantes para a evolução cariotípica de <i>Hypostomus</i> .	Artoni e Bertollo, 1996.
Isoenzimas	<i>H. commersoni</i> ; <i>H. derbyi</i> ; <i>H. myersi</i> ;	Três espécies de <i>Hypostomus</i> da bacia do Rio Iguaçu (<i>H. aff commersoni</i> , <i>H. derbyi</i> e <i>H. myersi</i>) foram examinadas por análise multivariada, PCA e análise canônica discriminante isenta de tamanho, pelo método da rede de treliça de caracteres externos e eletroforese de isoenzimas. Vinte e seis loci gênicos de 14 sistemas isoenzimáticos (AAT, ACP, ADH, GDH, G3PDH, G6PDH, GPI, IDHP, LDH, MDH, ME, PGM, PER e SOD) foram pontuados pela primeira vez para estas espécies. Uma baixa heterozigosidade média foi observada.	Zawadzki, Renesto e Bini, 1999.
Isoenzimas	<i>H. commersoni</i> ; <i>H. derbyi</i> ; <i>H. myersi</i> ;	Quatorze sistemas enzimáticos (ADH, ATA, ACP, PGM, G3PDH, GCDH, G6PDH, GPI, ICDH, LDH, MDH, MDHP, PER e SOD) foram investigados em tecidos do músculo esquelético, fígado e coração de 3 espécies da bacia do rio Iguaçu (Brasil). Embora os padrões tenham sido semelhantes para as três espécies, os dados mostraram a presença de expressões teciduais diferenciais para as isoperoxidases, o que pode ser devido à combinação preferencial ou associação de subunidades polipeptídicas. Os padrões detectados para isoenzimas de SOD mostraram que as estruturas quaternárias destas enzimas estavam em desacordo com o número de subunidades reportado para a maioria dos outros grupos de vertebrados. A restrição específica de tecido na formação de heterotetrâmeros também foi descrita para isoenzimas LDH e MDHP.	Zawadzki, Machado e Renesto, 2001.
Filogenia mtDNA D-loop	<i>Hypostomus</i> sp. 1 e sp. 2; 20 espécies nominais de <i>Hypostomus</i> ; 12 sp G.E.;	A sequência D-loop completa foi obtida para 23 espécies de <i>Hypostomus</i> e 12 outras espécies pertencentes a outros dois gêneros (<i>Cochliodon</i> e <i>Ancistrus</i>). A análise filogenética indica que o gênero <i>Hypostomus</i> é polifilético devido à exclusão de <i>H. emarginatus</i> e <i>H. squalinus</i> do clado principal deste gênero. E que este clado inclui todas as espécies de <i>Cochliodon</i> examinadas no trabalho, indicando que o gênero pode ser considerado como um sinônimo júnior subjetivo de <i>Hypostomus</i> . A conclusão também é apoiada pela colocação de <i>H. fonchii</i> no clado <i>Cochliodon</i> , implicando que caracteres sinapomórficos que diagnosticam <i>Cochliodon</i> são infundados. Uma nova visão filogenética do gênero é proposta.	Montoya-Burgos et al., 2002.

Filogenia mtDNA D-loop	24 espécies nominais de <i>Hypostomus</i> ; 24 <i>Hypostomus</i> sp. N.I.; 6 espécies G.E.;	As relações filogenéticas de 51 representantes do gênero <i>Hypostomus</i> foram inferidas utilizando sequências mitocondriais haplotípicas da região D-loop e sequências completas da região ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>). As análises filogenéticas indicaram que o gênero <i>Hypostomus</i> pode ser dividido em quatro clados monofiléticos. As análises biogeográficas de cada um desses clados permitiu a identificação de 7 eventos cladogênicos principais. Utilizando os dados de D-loop, as estimativas de datas foram atribuídas a cada um destes eventos, permitindo conectá-los com mudanças hidrogeológicas documentadas.	Montoya-Burgos, 2003.
Citológico DNA nuclear	4 <i>Hypostomus</i> sp. N.I.; 16 Siluriformes;	Vinte espécies de peixes da ordem Siluriformes foram analisadas para determinação do conteúdo de DNA nuclear e comparar esses dados com seu número diploide. Além disso, investigou-se a extensão e importância das mudanças ocorridas durante o processo de diversificação dos representantes neotropicais do grupo. Os resultados mostraram que as mudanças no conteúdo de DNA frequentemente não são seguidas por mudanças no número diploide. Este fato permite sugerir que, além dos rearranjos cromossômicos estruturais, outros mecanismos, incluindo deleções, duplicações e poliploidias, podem estar envolvidos no processo de diferenciação de espécies nos representantes desta ordem.	Fenerich e Oliveira, 2004.
Citológico Cariótipo 5S rDNA FISH	<i>H. affinis</i> ; 3 sp. Loricariidae; 4 sp. Characiformes;	A técnica FISH (<i>Fluorescence in Situ Hybridization</i>) foi utilizada para mapear os sítios 5S (rDNA) nos cromossomos de oito espécies de peixes neotropicais da bacia do rio Paraíba do Sul sendo quatro deles pertencentes à ordem Characiformes, família Characidae, gênero <i>Astyanax</i> (<i>A. scabripinnis</i> , <i>A. parahybae</i> , <i>A. giton</i> e <i>A. intermedius</i>) e quatro à ordem Siluriformes, família Loricariidae (<i>Neoplecostomus microps</i> , <i>Harttia loricariformis</i> , <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Upsilodus</i> sp.). Aspectos de evolução cariotípica dos grupos analisados são discutidos. <i>H. affinis</i> 2n = 66.	Kavalco et al., 2004.
Aloenzimas	<i>H. strigaticeps</i> ; 2 morfotipos de <i>Hypostomus</i> ;	Exemplares do Ribeirão Maringá, um pequeno afluente do Rio Pirapó, um efluente do alto rio Paraná. As três populações foram analisadas por eletroforese de aloenzimas que permitiram a pontuação de 25 loci de 14 sistemas enzimáticos (ACP, ADH, ATA, GCDH, G3PDH, G6PDH, GPI, ICDH, LDH, MDH, MDHP, PER, PGM e SOD). Vários loci diagnósticos e diferenças fixas foram observados para cada população. Todas as populações foram geneticamente distintas, embora houvesse muitos alelos comuns. Os dados indicam que os dois morfotipos são espécies distintas de <i>H. strigaticeps</i> .	Paiva, Renesto e Zawadzki, 2005.
Citológico Cariótipo Cromossomo sexual	<i>H. ancistroides</i> ; <i>H. regani</i> ; <i>H. goyazensis</i> ; 3 Pterygoplichthini; 2 Ancistrini;	Análises citogenéticas foram conduzidas em sete espécies (três Hypostomini, três Pterygoplichthini e duas Ancistrini) do Brasil e da Venezuela. Em Pterygoplichthini, todas as espécies apresentaram 2n = 52 cromossomos. Em Hypostomini, <i>H. ancistroides</i> apresentou 2n = 68, <i>H. regani</i> 2n = 72 e <i>H. goyazensis</i> 2n = 72 cromossomos. Em Ancistrini, <i>Ancistrus</i> sp. 1 obteve 2n = 39/40 com um sistema cromossômico sexual do tipo XX/X0, que é uma novidade para os peixes neotropicais, e <i>Ancistrus</i> sp. 2 tem 2n = 52. Seis espécies apresentaram AgNORs únicas e duas AgNORs múltiplas. As possíveis relações citogenéticas entre as espécies de Hypostominae são discutidas.	Alves et al., 2006.
Aloenzimas	<i>H. boulengeri</i> ; <i>H. cochliodon</i> ; <i>H. latifrons</i> ; <i>H. regani</i> ; <i>H. cf. latirostris</i> ; 3 <i>Hypostomus</i> sp. N.I.; 1 sp. G.E.;	Nove populações de Hypostomini do reservatório de Manso (Rio Manso e Rio Cuiabá, bacia do alto rio Paraguai, Brasil) foram estudadas usando eletroforese de aloenzimas. Três exemplares não foram identificados ao nível de espécie e foram designados como <i>Hypostomus</i> sp. 1, <i>Hypostomus</i> sp. 2 e <i>Hypostomus</i> sp. 3. A pesquisa resultou em 25 loci de 14 sistemas enzimáticos. Os dados permitiram o registro de marcadores diagnóstico para todas as espécies. Os valores de heterozigosidade média esperada foram variáveis (0,029 a 0,079). Hipóteses para explicar essa variação são discutidas. As frequências alélicas e os valores de identidade genética de Nei mostraram que <i>Hypostomus</i> sp. 1, <i>Hypostomus</i> sp. 2 e <i>Hypostomus</i> sp. 3 devem ser consideradas espécies biológicas verdadeiras, e distintas das outras espécies estudadas.	Renesto, Zawadzki e Paiva, 2007.

Aloenzimas	<i>H. ancistroides</i> ; <i>H. iheringi</i> ; <i>H. margaritifera</i> <i>H. regani</i> ; 6 <i>Hypostomus</i> sp. N.I.;	Dez populações de <i>Hypostomus</i> da bacia do Rio Corumbá foram estudadas, revelando 25 loci pertencentes a 14 sistemas enzimáticos (ADH, AAT, ACP, PGM, G3PDH, GCDH, G6PDH, GPI, ICDH, LDH, MDH, MDHP, PER e SOD). Os dados revelaram marcadores diagnósticos para as 4 espécies nominais analisadas e para as 6 possíveis espécies não descritas em nível taxonômico. As populações geneticamente mais semelhantes ($I=0,954$) foram as das espécies <i>H. iheringi</i> e dos <i>taxa</i> classificados como <i>Hypostomus</i> sp. 2; os mais divergentes ($D=0,839$) foram <i>H. iheringi</i> e <i>H. ancistroides</i> .	Zawadzki, Renesto e Mateus, 2008.
RAPD	<i>H. ancistroides</i>	Quatro populações coletadas ao longo de um riacho urbano no sul do Brasil, foram avaliadas por 11 <i>primers</i> RAPD, amplificando 147 loci, dos quais 76 (51,7%) foram polimórficos. A heterozigosidade média variou de 0,1230 a 0,1526 e as distâncias genéticas de 0,0253 a 0,0445. AMOVA particionou 90,85% da variação total dentro das amostras e 9,15% entre as amostras. Em geral, os valores de FST indicaram diferenciação genética moderada entre as amostras.	Sofia et al., 2008.
Aloenzimas	<i>H. regani</i>	Três populações amostradas (1: reservatório de Corumbá (Goiás-BR), 2: reservatório de Itaipu (PR-BR), 3: reservatório de Manso (MT-BR)). Eletroforese de aloenzimas (tecidos do fígado, coração e músculos), permitiu a marcação de 25 loci de 14 sistemas (ACP, ADH, ATA, GCDH, G3PDH, G6PDH, GPI, ICDH, LDH, MDH, MDHP, PGM, PER e SOD). Nenhum loci diagnóstico encontrado; alguns alelos raros exclusivos registrados para as três populações. As populações geneticamente mais semelhantes foram as de Corumbá e Itaipu e as mais distantes foram as de Manso e Corumbá. Os dados das aloenzimas mostraram três populações estruturadas pertencentes à mesma espécie <i>H. regani</i> ($FST = 0,173$).	Zawadzki et al., 2008.
Citológico Cariótipo	<i>H. nigromaculatus</i>	Três populações coletadas em afluentes do rio Tibagi, Paraná e Cachoeira de Emas, rio Mogi-Guaçu, São Paulo, foram estudadas. Cromossomos submetidos à coloração convencional (Giemsa), impregnação por nitrato de prata, bandamento-C e coloração com os fluorocromos CMA ₃ e DAPI. Exemplares apresentaram $2n = 76$; houve diferença quanto às fórmulas cariotípicas e distribuição/composição da heterocromatina constitutiva. O nitrato de prata detectou NORs múltiplas, porém com diferenças quanto à localização nos cromossomos. CMA ₃ = correspondente aos cromossomos AgNORs; DAPI = observadas bandas não coradas. O padrão de distribuição da heterocromatina foi diferente para as amostras Mogi-Guaçu e Tibagi, sugerindo que essas amostras estejam atualmente isoladas e que outras análises são necessárias para determinar se as amostras analisadas são populações distintas ou trata-se de espécies diferentes.	Rubert, Zawadzki, Giuliano-Caetano, 2008.
Bioquímicos Micronúcleo	<i>H. plecostomus</i> ;	Para avaliar o impacto do dicromato de potássio na eritropoiese de <i>H. plecostomus</i> , foi realizado o teste de micronúcleo. Exemplares de <i>H. plecostomus</i> ($n = 30$) + grupo controle ($n = 30$) submetidos a 12 mg/L de dicromato de potássio. Para cada 2.000 hemácias, observou-se $8,25 \pm 0,02\%$ das células com micronúcleos e $17 \pm 0,005$ mg/kg de cromo total nos tecidos (espectrofotometria de absorção atômica). No grupo controle = $0,75 \pm 0,03\%$ para micronúcleos e $1,08 \pm 0,04$ mg/kg de cromo. Resultados confirmam o efeito clastogênico do dicromato de potássio; a sensibilidade ao íon e sua relevância econômica, mostram que a espécie pode ser usada para monitorar efeitos agudos de derramamentos de poluentes metálicos.	Normann, Moreira e Cardoso, 2008.
Citológico Cariótipo	2 <i>Hypostomus</i> sp. N.I	<i>Hypostomus</i> sp. 3-Córrego Salobrinha NUP 4247 e <i>Hypostomus</i> sp. 2-Rio Perdido NUP 4249, coletados no Planalto da Bodoquena (Rio Paraguai – BR), foram caracterizados citogeneticamente. <i>Hypostomus</i> sp. 3 = dois números modais, não sendo possível definir o número diploide em quatro espécimes ($2n = 83$ e $2n = 84$ cromossomos em um indivíduo, e $2n = 82$, $2n = 83$ e $2n = 84$ cromossomos nos demais), revelando um mosaico genético na espécie. <i>Hypostomus</i> sp. 2 mostrou $2n = 84$, $FN = 106$ com heteromorfismo de tamanho em um par de cromossomos corados com AgNORs. Em ambas as espécies, a bandagem C mostrou padrão de distribuição da heterocromatina com pequenas bandas nas regiões centromérica e pericentromérica. Estes foram os primeiros dados citogenéticos publicados para <i>Hypostomus</i> da bacia do rio Paraguai.	Cereali et al., 2008.

Aloenzimas	<i>H. nigromaculatus</i> ; <i>H. cf. nigromaculatus</i> ;	Dois morfotipos do gênero <i>Hypostomus</i> (Córrego Atlântico, PR) foram analisados através de 12 sistemas enzimáticos (AAT, ADH, EST, GCDH, G3PDH, GPI, IDH, LDH, MDH, ME, PGM e SOD), pontuando 20 loci e 30 alelos; 6 loci foram diagnósticos (Aat-2, Gcdh-1, Gpi-A, Idh-1, Ldh-A e Mdh-A), indicando isolamento reprodutivo interjacente. A ocorrência de poucos loci polimórficos reconhece dois morfotipos, com valores de heterozigose $He = 0,0291$ para <i>H. nigromaculatus</i> e $He = 0,0346$ para <i>H. cf. nigromaculatus</i> . A estatística FIS demonstrou fixação dos alelos nos dois morfotipos e a identidade genética (I) e a distância (D) de Nei foram $I = 0,6515$ e $D = 0,4285$, indicando diferenciação específica dos morfotipos.	Ito, Renesto e Zawadzki, 2009.
Microsatélite	<i>H. gymnorhynchus</i> ;	Dez loci microsatélites foram isolados e caracterizados, utilizando biblioteca genômica para obter sequências repetitivas; 24 <i>primers</i> desenvolvidos e 14 indivíduos do rio Caiapó, no Brasil central, foram genotipados. Todos os loci apresentaram baixo polimorfismo, com baixo número de alelos por loco (1 ou 2), exceto Hg_E19, que possuía 11 alelos. Os autores discutem que isto pode ser devido ao pequeno tamanho da amostra e ao pequeno tamanho dos loci microsatélite estudados.	Telles et al., 2010.
Citológico Cariótipo	3 <i>Hypostomus</i> sp. N.I.;	Espécimes do rio Xingu (região amazônica) foram analisados através de técnicas convencionais de coloração, incluindo bandejamento C, AgNORs, bandamento CMA ₃ e DAPI. <i>Hypostomus</i> sp. Xingu-1: $2n = 64$ (32M/SM, 32ST/A); <i>Hypostomus</i> sp. O Xingu-2: $2n = 66$ (32M/SM, 34ST/A) e <i>Hypostomus</i> sp. Xingu-3: $2n = 65$ (38M/SM, 26ST/A + 1B). Os três citótipos mostraram padrões similares de bandas C, CMA ₃ e DAPI. NORs, com rearranjos de fusão/fissão explicando a diferença no número diploide e no número de cromossomos M/SM e ST/A entre os citótipos $2n = 64$ e $2n = 66$ e cromossomo B explica a diferença entre os citótipos $2n = 64$ e $2n = 65$. Os 3 citótipos podem representar diferentes espécies.	Milhomem et al., 2010.
Citológico Cariótipo	<i>H. regani</i> ;	Foi realizada a análise citogenética comparativa de 3 populações: 2 da Bacia do Alto Rio Paraná e a 3ª, cujo cariótipo e espécie são descritos pela 1ª vez na bacia do rio São Francisco (Rio Piumhi). Características cariotípicas de populações dos rios Piracicaba e Tietê também são discutidas. Os dados revelaram diferenças na localização de AgNORs intrapopulacional, permitindo que os indivíduos dos 3 rios sejam distinguidos uns dos outros e indicando a possibilidade de variação geográfica fixando diferentes cariótipos, mesmo tendo a mesma bacia de origem.	Mendes-Neto et al., 2011.
Citológico Cariótipo NORs	<i>H. aff. agna</i> ; <i>H. cf. heraldoi</i> ; <i>H. regani</i> ; <i>H. cf. topavae</i> ; 1 <i>Hypostomus</i> sp. N.I.;	<i>H. cf. heraldoi</i> (Rio Mogi-Guaçu): $2n = 72$ e NOR em 1 par cromossômico. <i>H. regani</i> (Rio Mogi-Guaçu): $2n = 72$ e NORs em 2 pares cromossômicos. <i>Hypostomus</i> sp. (Rio Mogi-Guaçu): $2n = 68$ e NORs em 2 pares cromossômicos. <i>H. aff. agna</i> (Rio Cavalão): $2n = 74$ e NORs em 2 pares cromossômicos. <i>H. cf. topavae</i> (Córrego Carrapato): $2n = 8$ e NORs em 2 pares cromossômicos. Espécies demonstraram marcada diversidade na fórmula cariotípica, sugerindo a ocorrência de rearranjos Robertsonianos e inversões pericêntricas durante a história evolutiva do gênero; hipótese apoiada pela ocorrência de grande número de cromossomos de braço único e NORs em posição terminal como condição derivada nos Loricariidae.	Martinez et al., 2011.
Citológico Cariótipo FISH NORs	<i>H. ancistroides</i> ; <i>H. strigaticeps</i> ; <i>H. regani</i> ; <i>H. paulinus</i> ;	Espécies da Bacia do Rio Parapanema (BR) analisadas com diferentes técnicas de coloração (bandas C, nitrato de prata, CMA ₃ e DAPI) e FISH para detectar sítios 18S (rDNA). Todas as espécies apresentaram diferentes números diploides: $2n = 68$ (10m+26sm+32st-a) em <i>H. ancistroides</i> , $2n = 72$ (10m+16sm+46st-a) em <i>H. strigaticeps</i> , $2n = 72$ (10 m + 18 sm + 44 st-a) em <i>H. regani</i> e $2n = 76$ (6 m + 16 sm + 54 st-a) em <i>H. paulinus</i> . A coloração com nitrato de prata e FISH revelaram vários números e NORs localizadas terminalmente nos cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos (braço longo em <i>H. strigaticeps</i> e <i>H. paulinus</i> ; braço curto em <i>H. ancistroides</i> e <i>H. regani</i>). Diferenças na distribuição e composição da heterocromatina entre espécies; terminalmente em cromossomos st-a em <i>H. ancistroides</i> , <i>H. strigaticeps</i> e <i>H. paulinus</i> e intersticialmente nos cromossomos st-a, em <i>H. regani</i> . Os resultados indicam que rearranjos cromossômicos e composição de pares de bases de heterocromatina foram eventos significativos durante a diferenciação deste grupo.	Rubert et al., 2011.

Filogenia mtDNA D-loop	Gênero <i>Hypostomus</i> ;	A filogenia do gênero foi examinada usando dados da região D-loop do mtDNA. Análises filogenéticas sugerem que a diversidade de espécies foi moldada pela diversificação inter-bacias e pela especiação intra-bacia. D-loop foi usado como um relógio molecular para datar cada evento de diversificação de gênero. A espécie <i>H. arecuta</i> é descrita.	Cardoso et al., 2012.
Citológico Cariótipo	<i>H. aff. unae</i> ;	Quatro populações estudadas com coloração convencional, bandagem C, Ag-NOR, CMA ₃ /DAPI e FISH com sondas 18S (rDNA). Apesar de mesmo número diploide (2n = 76) e localização da NOR, cada pop. apresentou fórmulas cariotípicas exclusivas e padrões específicos de regiões heterocromáticas, indicando unidades evolutivas distintas na espécie.	Bitencourt et al., 2012.
Citológico Cariótipo	<i>H. iheringi</i> ;	Primeira descrição cariotípica de <i>H. iheringi</i> , em que 9 espécimes foram coletados no Córrego da Lapa (SP/BR): 2n = 80. Coloração nitrato de prata e FISH rDNA 18S = múltiplos NORs (pares 13, 20 e 34). FISH rDNA 5S = cístron presente apenas no par 2. Cariótipos foram comparados e polimorfismos heterocromáticos únicos foram detectados (pares 1 e 5). Resultados indicam que o cariótipo é diferenciado, confirmado pela heterocromatinização dos segmentos cromossômicos.	Traldi et al., 2012.
Citológico Cariótipo	<i>H. albopunctatus</i> ; <i>H. ancistroides</i> ; <i>H. iheringi</i> ; <i>H. paulinus</i> ; <i>H. plecostomus</i> ; <i>H. strigaticeps</i> ;	Para elucidar a relação e os padrões de evolução entre os cariótipos das espécies de <i>Hypostomus</i> , estudou-se citogeneticamente 6 espécies do Brasil e da Venezuela. Resultados mostram grande variedade nos números diploides (de 2n = 68 a 2n = 76), com predominância de cromossomos acrocêntricos. AgNORs localizadas em posição terminal em todas as espécies. Três espécies com AgNORs simples (<i>H. albopunctatus</i> , <i>H. prope plecostomus</i> e <i>H. prope paulinus</i>) e três com múltiplas AgNORs (<i>H. ancistroides</i> , <i>H. prope iheringi</i> e <i>H. strigaticeps</i>). Na evolução cariotípica do grupo, o principal tipo de rearranjo cromossômico se deu por fissões acrocêntricas, o que pode ter sido facilitado pela suposta origem tetraploide das espécies de <i>Hypostomus</i> . A relação entre as alterações cariotípicas e a evolução no gênero são discutidas.	Alves et al., 2012.
Citológico Cariótipo	10 espécies nominais de <i>Hypostomus</i> ;	As espécies de <i>Hypostomus</i> foram analisadas citogeneticamente através de coloração de Giemsa e impregnação com nitrato de prata, e os dados obtidos foram correlacionados com as análises biogeográficas e filogenéticas disponíveis para o gênero. Embora os AgNORs tenham variado significativamente entre as espécies, os números diploides foram correlacionados com a distribuição das espécies nas bacias dos rios norte e sul da América do Sul. Números diploides de cromossomos 2n = 66-68 e 2n = 70-84 foram correlacionados com dois clados principais dentro das bacias hidrográficas, e mostraram AgNORs variando em número e posição. Os resultados mostram que dados citogenéticos podem ser correlacionados à filogenia e biogeografia do gênero, ajudando a esclarecer sua complexa história evolutiva.	Bueno et al., 2013.
Citológico Cariótipo	<i>H. ancistroides</i> ; <i>H. regani</i> ; <i>H. strigaticeps</i> ; +1 sp. G.E.;	Três populações de <i>H. ancistroides</i> apresentaram 2n = 68, com distintas fórmulas cariotípicas. <i>H. regani</i> e <i>H. strigaticeps</i> apresentaram 2n = 72 com citótipos distintos. <i>Rinelepis aspera</i> apresentou 2n = 54. NORs múltiplas evidenciadas por coloração com nitrato de prata para as espécies de <i>Hypostomus</i> e NOR simples para <i>R. aspera</i> . A variação de número cromossômico, fórmulas cariotípicas e NORs são discutidas, sugerindo a existência de espécies crípticas com caracteres cromossômicos independentes, contribuindo para a discriminação das espécies e sua evolução cromossômica.	Endo et al., 2012.
Filogenia mtDNA ATP sintetase	<i>H. strigaticeps</i> ;	Análises em populações da bacia do alto rio Paraná. Sequências do mtDNA ATP sintetase (subunidades 6/8) de 27 espécimes de 10 populações (1 do rio Mogi-Guaçu, 5 do rio Paranapanema, 3 do rio Tietê e 1 do rio do Peixe). Análise filogeográfica = 8 haplótipos (A-H); apesar do haplótipo ancestral incluir apenas o rio Tietê, <i>H. strigaticeps</i> não se restringe a bacia. A análise filogenética mostrou que as populações formam uma unidade monofilética de duas linhagens: TG, com representantes do Tietê, Mogi-Guaçu e Peixe, e PP, com espécimes do Paranapanema. Os resultados da análise filogenética não suportam a hipótese da existência de espécies crípticas e a análise filogeográfica confirma a presença de <i>H. strigaticeps</i> em outras sub-bacias do alto rio Paraná: sub-bacias do rio Grande, rio do Peixe e rio Paranapanema.	Borba et al., 2013.

Citológico Cariótipo rDNA	<i>H. ancistroides</i> ; <i>H. strigaticeps</i> ; <i>H. nigromaculatus</i> ;	Espécies simpátricas de <i>Hypostomus</i> do córrego Hortelã (rio Paranapanema, Botucatu/SP/BR). As análises envolveram a caracterização citogenética e o mapeamento cromossômico de sequências repetitivas e comparações intra/interespecíficas utilizando sequências da subunidade citocromo C oxidase I. Resultados: <i>H. ancistroides</i> = 2n = 68, <i>H. strigaticeps</i> 2n = 72 e <i>H. nigromaculatus</i> 2n = 76. Também foram observadas variações nas fórmulas cariotípicas, quantidade de heterocromatina constitutiva e localização das NORs. O mapeamento citogenético (rDNA 5S/18S e histona H3), revelou um processo diferencial de dispersão entre as três espécies, suportando os dados citogenéticos e representando uma ferramenta adicional para a caracterização das espécies analisadas. Ainda, evidenciou-se que as variações cromossômicas não se restringem a diferenças no número diploide ou na macroestrutura cariotípica do gênero <i>Hypostomus</i> , indicando que a transposição de heterocromatina e segmentos de rDNA podem participar do processo de diferenciação das espécies.	Pansonato-Alves et al., 2013.
Citológico Cariótipo NORs	<i>H. aff. ancistroides</i> ; <i>H. commersoni</i> ; <i>H. derbyi</i> ;	Análises citogenéticas foram realizadas em três espécies de <i>Hypostomus</i> no estado do Paraná: uma da bacia do rio Tibagi (<i>H. aff. ancistroides</i>) e duas da bacia do rio Iguaçu (<i>H. commersoni</i> e <i>H. derbyi</i>). <i>H. aff. ancistroides</i> teve 2n = 66 (12m; 16sm; 10; 28a) e FN = 104, com grandes blocos heterocromáticos identificados em dois pares de cromossomos e NORs detectados em sete cromossomos da região complementar. A população de <i>H. commersoni</i> apresentou 2n = 68 (12m; 12sm; 8st; 36a) e FN = 100, com baixa heterocromatina pericentromericamente localizada e NORs detectados em apenas um par de cromossomos. A população de <i>H. derbyi</i> apresentou 2n = 66 cromossomos (6m; 10s; 20st; 30a), com grandes blocos heterocromáticos dispersos por todo o cariótipo e múltiplos locais com as NORs. Os marcadores cariotípicos se mostraram eficientes na separação das espécies estudadas e corroboram a evolução divergente do cariótipo no gênero <i>Hypostomus</i> .	Maurutto et al., 2013.
Aloenzimas	<i>H. ancistroides</i> ; <i>H. strigaticeps</i> ; <i>H. nigromaculatus</i> ; + 1 N.I. <i>Hypostomus</i> sp.	Espécies do rio Ivaí (PR-BR). Eletroforese de 9 sistemas enzimáticos (ADH, AAT, EST, ACP, G3PDH, GCDH, LDH, MDH e SOD) e 14 loci gênicos, revelaram alelos diagnósticos e exclusivos com uma baixa frequência. A heterozigosidade variou de 0,000 em <i>H. albopunctatus</i> a 0,199 em <i>H. hermanni</i> , a qual foi maior que a média para outras espécies de <i>Hypostomus</i> , como também para outros grupos de peixes já estudadas. <i>H. albopunctatus</i> e <i>H. regani</i> revelaram maior similaridade (I = 0,804), enquanto que <i>H. hermanni</i> e <i>Hypostomus</i> sp. 1/NUP 5612 mostraram a menor identidade genética (I = 0,569). Todas as populações foram geneticamente distintas apesar de apresentarem muitos alelos em comum. FST indicou diferenciação significativa entre as populações. <i>Hypostomus</i> sp. 1/NUP 5612 foi geneticamente diferenciada das três congêneres pelos loci Adh-A e G3pdh-B e por apresentar alelos raros exclusivos em outros seis sistemas enzimáticos.	Paiva et al., 2013.
Citológico Cariótipo FISH	<i>H. ancistroides</i> ; <i>H. iheringii</i> ; <i>H. nigromaculatus</i> <i>H. tapijara</i> ;	O cromossomo mitótico foi preparado usando (GATA)n e (TTAGGG)n. FISH com a sonda (GATA)n revelou que este elemento repetitivo é disperso sobre os cromossomos, com pequenas acumulações nas porções intersticiais e terminais dos cromossomos das quatro espécies estudadas. <i>H. iheringii</i> apresentou maior acúmulo dessa sequência no cromossomo.	Traldi et al., 2013.
Citológico Cariótipo FISH 5S; 18S rDNA	10 espécies nominais de <i>Hypostomus</i> ;	<i>H. faveolus</i> , <i>H. cochliodon</i> , <i>H. albopunctatus</i> , <i>H. aff. paulinus</i> e <i>H. topavae</i> apresentaram 1 par cromossômico no sítio 18S rDNA, enquanto <i>H. ancistroides</i> , <i>H. commersoni</i> , <i>H. hermanni</i> , <i>H. regani</i> e <i>H. strigaticeps</i> apresentaram sítios múltiplos de rDNA 18S. Em relação aos genes 5S rDNA, <i>H. ancistroides</i> , <i>H. regani</i> , <i>H. albopunctatus</i> , <i>H. aff. paulinus</i> e <i>H. topavae</i> tinham sítios 5S (rDNA) em apenas 1 par de cromossomos e <i>H. faveolus</i> , <i>H. cochliodon</i> , <i>H. commersoni</i> , <i>H. hermanni</i> e <i>H. strigaticeps</i> tinham múltiplos sítios 5S (rDNA). Os resultados discutidos com base nas filogenias do gênero, com comentários sobre possíveis mecanismos de dispersão para justificar a variabilidade dos sítios de rDNA em <i>Hypostomus</i> .	Bueno et al., 2014.
Citológico Cariótipo	<i>H. strigaticeps</i> ;	Foram analisadas 4 populações da bacia do rio Paraná, Brasil, 2 coletadas no principal canal da represa de Itaipu e as outras 2 nos trechos superiores dos afluentes do rio Paraná. Todas apresentaram 2n = 72 e sítios múltiplos de 5S rDNA (12m +	Baumgärtner et al., 2014.

5S; 18S rDNA		12sm + 18st + 30a), polimorfismos intra e interpopulacionais do sítio 18S (rDNA) com 2 a 3 pares acrocêntricos e em 3 pares de cromossomos (4, 21, e 28). A bandagem C revelou heterocromatina localizada nas regiões centroméricas e pericentroméricas da maioria dos cromossomos; entretanto, grandes blocos heterocromáticos (CMA ₃ -/DAPI+) no braço longo de cromossomos acrocêntricos identificaram polimorfismo intra e interpopulacional. A quantidade e distribuição de heterocromatina parecem estar correlacionadas com características biogeográficas de <i>H. strigaticeps</i> ao longo do rio Paraná. Resultados morfométricos também mostraram diversidade entre as populações, sugerindo plasticidade fenotípica. Abordagens evolucionárias, taxonômicas e biogeográficas da espécie e inter-relações em <i>Hypostomus</i> são discutidas.	
Citológico Cariótipo NORs	<i>H. aff. cochliodon</i> ; <i>Hypostomus</i> . sp.;	Dados citogenéticos de espécies de 2 tributários da bacia do Alto Rio Paraguai (MT-BR), são apresentados. <i>H. aff. cochliodon</i> apresentou 2n = 64 (18m+20sm+26st/a) e <i>Hypostomus</i> sp. 2n = 74 (12m+20sm+42st/a). NORs foram evidenciadas pela coloração de nitrato de prata. <i>H. aff. cochliodon</i> exibiu grandes segmentos de heterocromatina nas regiões terminais de 3 pares de cromossomos. Os autores discutem que estes resultados confirmam dados anteriores relativos ao gênero <i>Hypostomus</i> e reforçam a importância dos estudos da ictiofauna de riachos do estado de Mato Grosso.	Becker et al., 2014.
Next Generation Seq.	<i>H. plecostomus</i> ;	Genoma mitocondrial completo determinado por sequenciamento NGS. A análise de bioinformática resultou em toda a sequência do genoma mitocondrial com comprimento de 16.523 bp. O genoma mitocondrial de <i>H. plecostomus</i> é constituído por 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes tRNA, 2 genes rRNA e 1 região de controle, mostrando a estrutura típica da molécula circular do genoma mitocondrial como em outros vertebrados. A composição total do genoma foi estimada em 31,8% A, 27,0% T, 14,6% G e 26,6% C, com um viés de A/T de 58,8%.	Liu et al; 2014.
Filogenia Mitocondrial DNA nuclear	Subfamília Hypostomini;	Filogenia molecular das relações em nível de gênero de Hypostominae é fornecida com base no sequenciamento e análise de 2 loci mitocondriais e 3 nucleares (total 4293 bp). A maior descoberta sistemática em grande escala foi a de que a tribo Hypostomini, reconhecidamente irmã da tribo Ancistrini (base em dados morfológicos), foi agrupada em Ancistrini. Os resultados da análise apoiam a reavaliação e a restrição de vários gêneros historicamente problemáticos, incluindo <i>Baryancistrus</i> , <i>Cordylancistrus</i> , <i>Hemiancistrus</i> e <i>Peckoltia</i> . Grande parte da diversidade de linhagens profundas em Hypostominae é restrita às Guianas e às bacias de drenagem do norte dos Andes, com três clados em nível de tribo ainda amplamente restritos às Guianas. A análise de clados geográficos sugere que a diversificação inicial dos Hypostominae antecedeu o período do Mioceno na elevação andina e que exemplos de diversificação e convergência ecológica trófica nos Loricariidae suportam as 3 origens independentes de especializações morfológicas semelhantes e únicas para o grupo.	Lujan et al.; 2015.
Filogeografia mtDNA ATPase	<i>H. ancistroides</i> ;	O padrão filogeográfico é descrito, com utilização de sequências completas de mtDNA da ATPase 6/8 de 162 espécimes da bacia adjacente ao Ribeira do Iguape, inferir a distribuição de haplótipos, criando um relógio molecular bayesiano. Resultados sugerem que durante o quaternário, <i>H. ancistroides</i> passou por histórias filogeográficas sobrepostas, alternando entre o isolamento e a posterior fusão de diferentes populações. A ocorrência de uma população isolada na Ribeira de Iguape demonstrou ser um evento que remete ao Pleistoceno. Haplótipos amplamente distribuídos indicam diferenças genéticas e sugerem que as populações foram isoladas, mas não sofreram especiação devido à interrelação recorrente.	Hollanda Carvalho et al., 2015.
Microsatélite	<i>H. ancistroides</i> ;	O estudo detalha 13 novos loci microsatélites polimórficos. A análise de 30 indivíduos revelou um total de 99 alelos diferentes com uma média de 7.62 alelos por loco, com heterozigosidades observadas e esperadas variando de 0.103 a 0.931 e de 0.102 a 0.906, respectivamente. Um dos 13 loci apresentou desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, provavelmente devido à presença de alelos nulos, inferidos a partir do excesso de homozigotos.	Galindo et al.; 2015.

Citológico Cariótipo	<i>Hypostomus</i> ;	Este estudo revisou taxonomicamente os espécimes estudados por Artoni e Bertollo (1996) e agrupou as espécies de <i>Hypostomus</i> em três grupos, de acordo com suas características citogenéticas, vagilidade e ambientes de ocorrência.	Lorscheider et al., 2015.
Citológico Cariótipo	<i>H. cf. plecostomus</i> ;	O estudo apresenta a estrutura cariotípica de <i>H. cf. plecostomus</i> da bacia do rio Teles Pires (Alta Floresta, MT-BR). A espécie possui $2n = 68$ e a fórmula cariotípica $14m + 24sm + 14st + 16a$ (FN = 120) em machos e $15m + 24sm + 14st + 15a$ (FN=121) em fêmeas e cromossomos sexuais ZZ/ZW. AgNORs identificados em dois pares de cromossomos em diferentes posições: braço curto do par 21 e braço longo do par 27, combinando com os sinais exibidos pelo 18S FISH e indicando múltiplos NORs. A análise da banda C detectou poucos bloqueios de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos e nas regiões teloméricas de alguns pares, incluindo o par nucleolar 21. No entanto, grandes blocos no braço longo do par nucleolar 27 ainda se destacaram. A heterocromatina rica em GC (CMA ₃) foi visualizada apenas coincidentemente com locais nucleolares. O mapeamento dos sítios de 5S rDNA com FISH revelou marcações em oito cromossomos, demonstrando sintenia entre os sítios 18S e 5S. Os dados obtidos para <i>H. cf. plecostomus</i> são importantes para estudos taxonômicos deste complexo grupo da Amazônia " <i>H. plecostomus</i> ". A ocorrência de cromossomos sexuais em espécies amazônicas de <i>Hypostomus</i> sugere um evento evolutivo que é independente de outras espécies do grupo.	Oliveira et al., 2015.
Bioquímicos Micronúcleo	<i>H. ancistroides</i>	A resposta da espécie ao gradiente de poluição no principal corpo de água do noroeste do Paraná foi avaliada por meio de análise multivariada e integrativa. O fator de condição, teste de micronúcleo e anormalidades nucleares dos eritrócitos (ENA), ensaio cometa, análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em tecidos cerebrais e musculares e a análise histopatológica do fígado e das brânquias foram avaliadas em peixes de três locais do rio Pirapó durante as estações seca e chuvosa. A análise geral multivariada mostrou que a interação entre as estações do ano e os locais de coleta foi significativa, havendo variações nas taxas de alterações dos parâmetros biológicos dependendo da época avaliada.	Ghisi et al., 2016.
Isoenzimas	<i>H. hermanni</i> ;	A variabilidade genética em três populações dos afluentes dos rios Ivaí (Keller), Tietê (Piracicaba) e Sapucaí (Sapucaí-Mirim) foi determinada, através de oito sistemas enzimáticos (AAT, G3PDH, GPI, IDH, LDH, MDH, ME e PGM): 3 loci com 7 alelos, 8 loci com 20 alelos e 6 loci com 16 alelos foram obtidos nas populações Keller, Piracicaba e Sapucaí-Mirim, respectivamente. Indivíduos das 3 bacias apresentaram todos os loci polimórficos. Com base em valores de identidade e distâncias genéticas, as três populações foram determinadas como geneticamente muito semelhantes.	Vieira e Renesto; 2016.
Citológico 18S (rRNA) FISH	11 espécies nominais de <i>Hypostomus</i> ;	Populações coletadas em distintas bacias hidrográficas brasileiras (Atlântico Sul, Alto Paraná e Paraguai), aplicando a técnica FISH. <i>H. cochliodon</i> , <i>H. commersoni</i> , <i>H. hermanni</i> , <i>H. regani</i> , <i>H. albopunctatus</i> , <i>H. paulinus</i> , <i>H. aff. paulinus</i> , <i>H. iheringii</i> e <i>H. mutuae</i> apresentaram múltiplos sítios 18S (rDNA), enquanto <i>H. strigaticeps</i> e <i>H. nigromaculatus</i> exibiram um único par de cromossomos com sítios 18S (rDNA). As espécies estudadas apresentaram variações no número e posição desses locais. Os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos pela análise de AgNORs, revelando a mesma variabilidade interespecífica. Cada espécie exibiu padrões distintos de distribuição AgNORs e 18S, podendo ser considerados marcadores citogenéticos em cada espécie do gênero e ajudar a melhorar as discussões sobre a filogenia do grupo.	Rubert et al.; 2016.

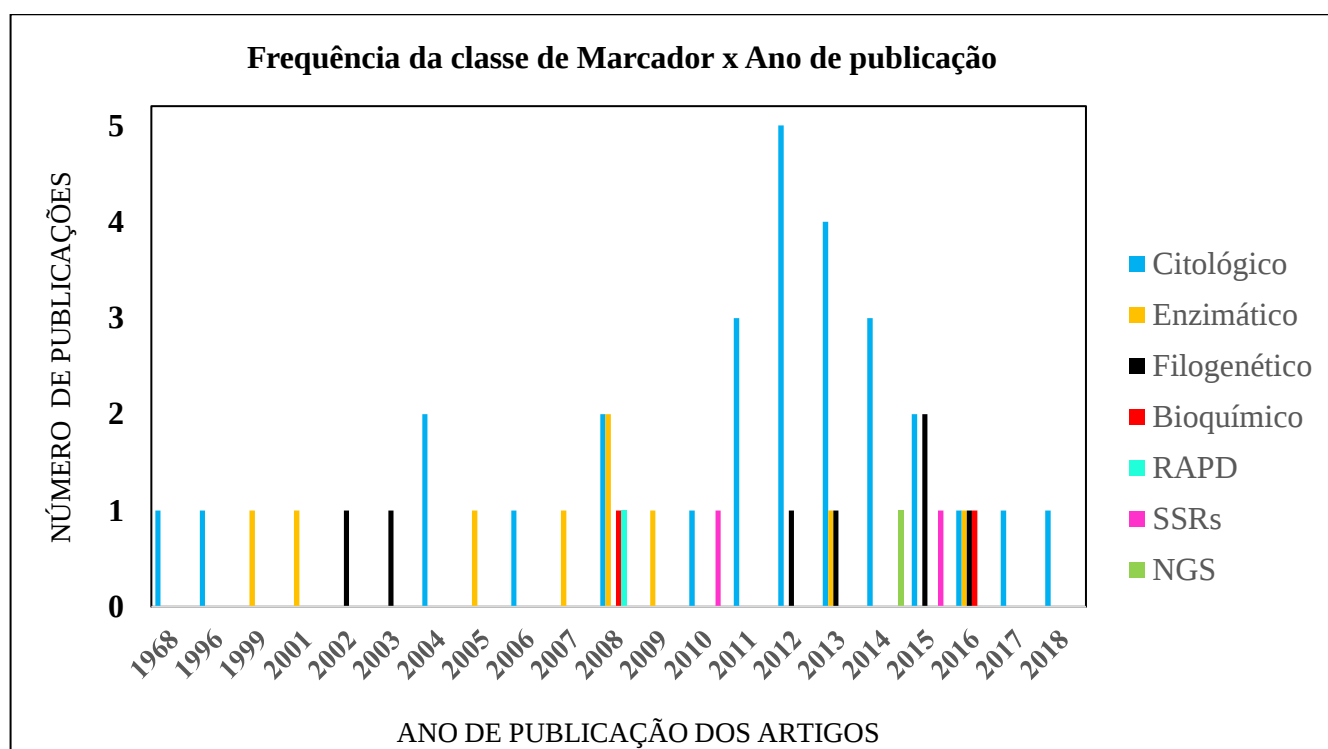
Filogenia	Subfamília Hypostomini; Gênero <i>Hypostomus</i> ;	A potencial influência da oportunidade ecológica sobre a radiação transcontinental de peixes de água doce da América do Sul foi investigada. Uma filogenia molecular espécie-densa e calibrada foi criada para a subfamília Hypostominae, com foco no gênero <i>Hypostomus</i> , rico em espécies e geograficamente extenso. O cronograma resultante foi usado para estimar as faixas geográficas ancestrais, inferir taxas históricas de cladogênese e diversificação no habitat e tamanho e forma do corpo destes táxons. Além de testar a hipótese de que invasões de drenagens de rios anteriormente desocupadas aceleraram a evolução e contribuíram para a radiação adaptativa do grupo. A especiação acelerada e as taxas de diversificação morfológica de <i>Hypostomus</i> da bacia do Rio Paraná são consistentes com a radiação adaptativa, sugerindo que a oportunidade ecológica desempenhou um papel importante na facilitação das acelerações evolutivas observadas na diversificação deste grupo.	Silva et al.; 2016.
Citológico Cariótipo Cromossomo sexual rDNA	<i>H. aff. ancistroides</i> ; <i>H. topavae</i> ; <i>H. aff. hermanni</i> ;	As espécies foram coletadas em um afluente do rio Ivaí (Rio Keller – Bacia do Alto rio Paraná). <i>H. aff. ancistroides</i> , <i>H. topavae</i> e <i>H. aff. hermanni</i> (2n = 68, 80 e 72 cromossomos, respectivamente). As espécies mostraram o mesmo número diploide de descrições anteriores, mas fórmulas cariotípicas diferentes. <i>H. aff. ancistroides</i> apresentou um sistema de cromossomo sexual ZZ/ZW. Múltiplos NORs e blocos de heterocromatina pericentromérica foram encontrados. Múltiplos sítios 5S (rDNA) foram detectados em <i>H. aff. ancistroides</i> e <i>H. topavae</i> , enquanto <i>H. aff. hermanni</i> apresentou apenas um par. Esta foi a primeira descrição de um sistema ZZ/ZW para <i>H. aff. ancistroides</i> , reforçando a hipótese de que podem corresponder a um complexo de espécies e ainda, confirmar a diversidade críptica desconhecida existente em pequenos rios.	Kamei et al.; 2017.
Citológico NORs rDNA	<i>H. affinis</i> ;	Esta espécie na bacia do rio Paraíba do Sul é única devido à sua distribuição do DNA repetitivo e sítios 5S e 18S (rDNA). Amostras identificadas e coleções registradas em museus brasileiros foram identificadas como sendo as mesmas espécies tipológicas, mesmo com grandes variações na localização física desses genes sendo observadas com FISH. Os fenótipos encontrados para os sítios 5S e 18S (rDNA) mostraram alterações em relação ao número destes sítios entre as bacias de drenagem inferior e superior do rio Paraíba do Sul. Estes resultados podem representar uma dinâmica populacional em que uma expansão dos sítios 5S do rDNA fornece um citótipo extinto ou não amostrado neste trabalho.	Brandão et al.; 2018.

**N.I.: Espécies Não Identificadas (Taxonomicamente); G.E.: Espécies pertencentes à Grupos Externos.*

A figura 1, apresentada a seguir, diz respeito a representação gráfica dos artigos que compõe a base de dados desta revisão de acordo com a classe do marcador utilizado em cada trabalho e os anos de publicação dos referidos artigos. Nela, estão apresentados os dados que na Tabela 2 são descritos de forma resumida, porém aqui, os distintos marcadores apresentados neste capítulo, e que foram utilizados em uma mesma área de pesquisa dentro da genética, foram agrupados em um item único para fins de proporcionar uma melhor visualização do panorama geral dos dados que compõe a base para a revisão.

É possível observar, de forma distinta, que os marcadores citológicos foram a classe de marcador utilizada na grande maioria dos trabalhos e ao longo de praticamente todos os anos da fração cronológica que esta revisão abrangeu, apresentando 27 artigos dos 49 que compuseram a base de dados obtida, como descrito no item que faz referência aos mesmos, na introdução deste trabalho. A segunda classe mais utilizada foi a dos marcadores enzimáticos, a qual apresentou o total de 9 artigos publicados entre os anos de 1999 a 2016. As demais classes distribuíram-se espaçadamente ao longo dos 50 anos de publicações avaliadas, compreendo desde os marcadores genéticos clássicos, até as classes mais recentes, englobando as ferramentas de sequenciamento, acesso e caracterização genômica.

Figura 1. Gráfico de frequência do uso de marcadores por ano de publicação dos artigos.



Perspectivas futuras

As recentes tecnologias de edição genômica, como os sistemas ZFN (*Zinc-finger Nuclease*), TALEN (*Transcription Activator-like Effector Nuclease*) e CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) são ferramentas poderosas e que estão redefinindo as barreiras das ciências biológicas (Gaj et al., 2013). Através destes sistemas, foi possível o desenvolvimento de estudos com edições genômicas eficientes e precisas de uma ampla gama de organismos (Gaj et al., 2013; Zhu e Ge, 2017). Em peixes, muitas características de grande importância na aquicultura puderam ser alvos de melhorias por meio da edição genômica, efetivando padrões de crescimento e desempenho reprodutivo, resistência a doenças, eficiência de conversão alimentar (razão da quantidade total de ração fornecida pelo ganho de peso dos indivíduos) e tolerância a estressores ambientais, como temperatura variações extremas de temperatura, salinidade e disponibilidade de oxigênio dissolvido na coluna d'água (Honorato et al., 2015; Abdelrahman et al., 2017).

A tecnologia ZFN fornece um meio de mutagênese eficiente e direcionada do DNA genômico tanto em células quanto em embriões (Swarthout et al., 2011). Em vertebrados, estas nucleases fornecem um sistema que permite a introdução de lesões genômicas em locais específicos das linhagens celulares (Porteus e Baltimore, 2003; Porteus e Carroll, 2005). Doyon et al. (2008) descreveram o uso de ZFNs para irrupção somática e germinal de genes em zebrafish (*Danio rerio*), onde a mutagênese alvo não era possível anteriormente. As ZFNs induziram uma quebra de cadeia dupla direcionada no genoma que foi reparada para gerar pequenas inserções e deleções. Os autores projetaram as ZFNs visando dois genes e, em ambos os casos, a frequência e precisão dos eventos de ruptura gênica observados, em combinação com a capacidade de projetar ZFNs contra qualquer locus, sugerem que a tecnologia ZFN pode ser amplamente aplicada a muitos organismos que permitem a liberação de mRNA ao ovo fertilizado.

Meng et al. (2008) adaptaram a tecnologia ZFN para criar mutações direcionadas na linhagem germinativa de zebrafish *in vivo*. As nucleases foram projetadas para reconhecer sequências no gene ortólogo (gene que divergiu por especiação) do receptor do fator de crescimento endotelial vascular de zebrafish. A co-injeção de mRNAs que codificam estas ZFNs em embriões de zebrafish em estágio de célula única levou a lesões mutagênicas no local alvo, que foram transmitidas com alta frequência através da linhagem germinativa. Assim, os autores concluíram que as ZFNs

modificadas podem introduzir mutações hereditárias no genoma de vertebrados. Ainda, destacaram a importância em ressaltar que essa abordagem de inativação gênica *in vivo* previne a necessidade de linhagens de células-tronco embrionárias e pode ser aplicável à maioria das espécies animais, especialmente nos casos em que os embriões em estágio inicial são facilmente acessíveis, como em peixes.

Estas nucleases quiméricas são compostas de módulos de DNA sequência-específicos, programáveis e ligados a um domínio de clivagem de DNA não específico (Gaj et al., 2013). ZFNs e TALENs permitem uma ampla gama de modificações genéticas por induzir quebras de fita dupla de DNA que estimulam junção endêmica não homogênea propensa a erro ou reparo dirigido por homologia em locais genômicos específicos (Gaj et al., 2013). A descoberta de um código modular simples de reconhecimento de DNA por proteínas efetoras do tipo ativador de transcrição (TALEN) (Boch et al., 2009; Moscou e Bogdanove, 2009) levou à expansão de uma plataforma alternativa para engenharia de proteínas programáveis de ligação ao DNA (Gaj et al., 2013).

Zu et al. (2013) direcionaram genes via recombinação homóloga em zebrafish, co-injetando ovos fertilizados com mRNAs TALEN e um vetor doador com braços longos e homólogos visando o locus da enzima tirosina hidroxilase (th). Como resultado, foi possível observar uma modificação genética efetiva que foi transmitida através da linhagem germinativa. Neste trabalho, os autores também direcionaram com sucesso dois genes adicionais e concluíram que a recombinação homóloga em zebrafish com um vírus dsDNA doador expande a utilidade deste organismo modelo na pesquisa de edição genética.

Radev et al. (2015) produziram a primeira linhagem de zebrafish com a mutação humana frequentemente encontrada em desordens relacionadas ao colágeno VI, como UCMD (*Ullrich Congenital Muscular Dystrophy*) e BM (*Bethlem myopathy*). Neste trabalho foi utilizado o sistema TALEN para projetar uma linha colágeno-específica (gene *col6a1*), contendo a mutação dentro de um sítio doador de splice essencial (splicing = processo que remove os *íntrons* e junta os *éxons* depois da transcrição do RNA), no intron 14 do gene *col6a1*, que provoca um salto *in-frame* do éxon 14 no mRNA processado. Esta mutação em um sítio doador de splice é o primeiro exemplo de uma modificação molde-independente do splicing induzido em zebrafish usando uma nuclease alvo. Segundo os autores, essa técnica é potencialmente expansível para outros organismos e pode ser útil em outros estudos sobre doenças genéticas.

Os rápidos avanços na edição genômica e o uso de técnicas modernas e de baixo custo, como CRISPR e suas proteínas associadas (Cas9), já foram aplicadas ao estudo da genética de peixes. O trabalho publicado por Irion et al. (2014) mostrou, por resgate fenotípico, que o sistema CRISPR/Cas9 pode ser usado para direcionar e reparar um códon de parada prematuro no locus albino em zebrafish com alta eficiência e precisão. De acordo com suas descobertas, a demonstração *in vivo* da transmissão germinal de uma troca precisa de um polimorfismo de DNA nestes peixes ressalta sua adequação como modelo para pesquisa genética.

A maioria dos experimentos de edição genômica até então foram realizados em três espécies de peixes mais populares para estes fins: zebrafish, medaka (*Oryzias latipes*) e tilápia (*Tilapia rendalli*) (Zhu e Ge, 2017). O sistema CRISPR/Cas9 permite a edição rápida e precisa do genoma e se tornou a técnica mais difundida em sistemas avaliando zebrafish e outros modelos com características similares, como a as altas taxas de reprodução e respostas que permitem a rápida avaliação de efeitos-teste em laboratório. Os fundamentos experimentais de CRISPR/Cas9 e aplicações gerais estão descritos em diversos artigos de revisão publicados anteriormente (Hsu et al., 2014; Barrangou e Doudna, 2016; Fellmann et al., 2017; Zhu e Ge, 2017).

Trubiroha et al. (2018) exploraram exemplares de zebrafish como modelo biológico para desenvolver uma estratégia de mutagênese com a técnica CRISPR/Cas9 de maneira rápida e escalonável, visando a identificação de genes envolvidos na morfogênese e função da tireoide. Os autores validaram com sucesso a estratégia de mutagênese-fenotipagem em experimentos visando genes com funções conhecidas na morfogênese da tireoide precoce. Eles propuseram a combinação de protocolos eficientes de mutagênese, fenotipagem não invasiva rápida e genotipagem sensível. Estes sistemas avaliados têm grande potencial para caracterizar sistematicamente a função de painéis maiores de genes candidatos durante o desenvolvimento da tireoide e são aplicáveis a outros órgãos e tecidos.

O sistema CRISPR-Cas9 está entre as ferramenta mais popular usada atualmente em edição de genoma (Liu e Lin, 2017). Entre outras características, este sistema se destacada em função do fato de que pode ser facilmente adotado em qualquer laboratório molecular típico. Outros sistemas baseados no uso de nucleases, como os TALENs, também são muito úteis, dado que alta eficiência e especificidade podem ser alcançadas e que o local alvo é fácil de encontrar no genoma em estudo (Joung e

Sander, 2013). As nucleases de edição genômica têm sido amplamente aplicadas em disciplinas das diversas áreas da ciências da vida e da medicina (Liu e Lin, 2017).

Não foram encontrados nas buscas bibliográficas trabalhos avaliando espécies do gênero *Hypostomus* através das ferramentas de edição genômica aqui citadas. Contudo, para a ordem Siluriformes, na qual o gênero está inserido, já existem dados. Com o objetivo de explorar os papéis do gene da miostatina (MSTN é um regulador negativo do crescimento muscular) no crescimento de peixes e criar uma linhagem de *Pelteobagrus fulvidraco* (Bagridae) com grande quantidade de massa muscular, Dong et al. (2011) realizaram disrupção direcionada do MSTN usando ZFNs. Empregando embriões de zebrafish como um sistema de triagem para identificar a atividade da ZFN, eles desenvolveram um par de ZFNs capazes de editar o MSTN no genoma de *P. fulvidraco*, obtendo com sucesso dois fundadores portadores do gene MSTN apresentando mutação em suas células germinativas, através de um alelo nulo com predição de codificar a função MSTN nula e um tipo complexo de mutação, previsto para codificar uma proteína sem dois aminoácidos no sinal de secreção N-terminal de MSTN. Segundo os autores, este é o primeiro *knockout* (inativação) de gene endógeno em peixes de aquicultura, ajudando a entender os papéis da expressão do gene MSTN.

A caracterização de organismos baseada em suas sequências genômicas é uma atividade relativamente jovem na ciência, que até então tem estudado principalmente organismos-modelo e genética humana, fornecendo um substrato para descobrir e entender os genes. Esse conhecimento fundamental agora está sendo aprimorado pela capacidade de coletar informações de sequências genômicas de maneira mais rápida e eficiente, e vários estudos já mostram o poder desse novo paradigma, ainda é necessário que o tempo e a engenhosidade determinem seus limites e sua consequente capacidade de transformar genética como a conhecemos.

Ainda assim, a evolução dos trabalhos desenvolvidos na área indica que estudos futuros devem se concentrar não apenas em documentar a presença de efeitos de diversidade genética, mas também em identificar os mecanismos subjacentes à nível genômico e prever quando tais efeitos podem ocorrer na natureza, podendo aplica-los também em populações estoque. Os peixes são o maior grupo de vertebrados do mundo, com a maior biodiversidade documentada. Desta forma, a disponibilidade e aplicação de tecnologias de edição de genoma em espécies de peixes podem fornecer informações e *insights* valiosos sobre as funções dos genes e sua evolução nos diferentes grupos de vertebrados do planeta.

Considerações Finais

Neste capítulo, revisou-se a utilização de marcadores genéticos e moleculares dentro do gênero *Hypostomus*. A base de dados formada foi composta por trabalhos que avaliaram espécimes do gênero *Hypostomus* através de metodologias clássicas, representadas por marcadores genéticos citológicos (27), enzimáticos (9) e bioquímicos (2) e ainda por marcadores desenvolvidos após o surgimento da técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR), sendo eles os marcadores RAPD (1), microsatélites (2), envolvendo técnicas filogenéticas e filogeográficas (6) e NGS (1). Descreveu-se as principais características, vantagens e desvantagens de cada um desses marcadores.

Discutiu-se também outras classes de marcadores para as quais não foram encontrados trabalhos avaliando exemplares de *Hypostomus*, mas que já foram aplicados em outros estudos envolvendo espécies de peixes ou ainda, que poderiam ser utilizados no estudo das mesmas em função de sua potencial aplicabilidade. Por fim, revisou-se quais as perspectivas futuras na área de genética de peixes, envolvendo principalmente tecnologias mais recentes como as de sequenciamento de amostras e de edição genômica.

Cada uma das tecnologias de marcadores moleculares tem suas vantagens e limitações. A escolha do marcador molecular a ser utilizada em determinado trabalho, depende estritamente das questões biológicas que são abordadas, da quantidade de DNA disponível para o experimento, dos conhecimentos técnicos do investigador, das considerações monetárias e do equipamento disponível no laboratório. Além disso, uma série de outros fatores relacionados com o organismo alvo e a complexidade do seu genoma também desempenham um papel importante na seleção do marcador ou tecnologia que melhor se adeque a responder as questões pretendidas.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências que apoiaram esta pesquisa, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim.

Referências Bibliográficas

- Abahyankar, A.; Park, H.B.; Tonolo, G.; Luthman, H. Comparative sequence analysis of the non-protein-coding mitochondrial DNA of inbred rat strains. *PLoS One*, v. 12, p. 1–6, 2009.
- Abdelrahman, H.; ElHady, M.; Alcivar-Warren, A.; Allen, S.; Al-Tobasei, R.; Bao, L.; Beck, B.; Blackburn, H.; Bosworth, B.; Buchanan, J.; Chappell, J.; Daniels, W.; Dong, S.; Dunham, R.; Durland, E.; Elasad, A.; Gomez-Chiarri, M.; Gosh, K.; Guo, X.; Hackett, P.; Hanson, T.; Hedgecock, D.; Howard, T.; Holland, L.; Jackson, M.; Jin, Y.; Kahlil, K.; Kocher, T.; Leeds, T.; Li, N.; Lindsey, L.; Liu, S.; Liu, Z.; Martin, K.; Novriadi, R.; Odin, R.; Palti, Y.; Peatman, E.; Proestou, D.; Qin, G.; Reading, B.; Rexroad, C.; Roberts, S.; Salem, M.; Severin, A.; Shi, H.; Shoemaker, C.; Stiles, S.; Tan, S.; Tang, K.F.; Thongda, W.; Tiersch, T.; Tomasso, J.; Prabowo, W.T.; Vallejo, R.; Van der Steen, H.; Vo, K.; Waldbieser, G.; Wang, H.; Wang, X.; Xiang, J.; Yang, Y.; Yant, R.; Yuan, Z.; Zeng, Q.; Zhou, T. Aquaculture genomics, genetics and breeding in the United States: current status, challenges, and priorities for future research. *Genomics*, v. 18, p. 191, 2017.
- Aitken, N., Smith, S., Schwarz, C.; Morins, P.A. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted-gene approach. *Molecular Ecology*, v. 13, n. 6, p. 1423-1431, 2004.
- Almeida F.S.; Fungaro, M.H.P.; Sodré, L.M.K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes, Pimelodidae) from the Tibagi river, *Brazilian Journal of Zoology*, v. 253, p. 113-120, 2001.
- Albert, J.S.; Crampton, W.G.R. The geography and ecology of diversification in Neotropical freshwaters. *Nature Education Knowledge*, n. 1, v. 1, p. 3–19, 2010.
- Alfaro, M.E.; Santini, F.; Brock, C. Nine exceptional radiations plus high turnover explain species diversity in jawed vertebrates. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the USA*, v. 106, p. 13410–13414, 2009.
- Almeida F.S.; Sodré, L.M.K.; Contel, E.P.B. Population structure of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetics Molecular Biology*, v. 26, p. 301-305, 2003.
- Al-Samarai, F.R. e Al-Kazaz, A.A. Molecular Markers: An Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, v. 9, n. 3, 2015.
- Alves, A.L.; Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado, A.; Foresti, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica*, v. 128, p. 1–9, 2006.
- Alves, A.L.; Borba, R.S.; Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado, A.; Foresti, F. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus*

Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comparative Cytogenetics*, v. 6, n. 4, p. 443–452, 2012.

Aquadro, C.F.; Greenberg, B.D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, v. 103, p. 287–312, 1983.

Armbruster, J. e Souza, L.S. *Hypostomus macushi*, a new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from Guyana. *Zootaxa*, v. 920, n. 920, p. 1–12, 2005.

Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C.; Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia*, v. 49, n. 1, p. 81–90, 1996.

Avise, J.C. Introduction: the scope of conservation genetics. In: Conservation genetics: case histories from nature (Avise JC and Hamrick JL, eds). *Chapman & Hall*, p. 1–9, 1996.

Barrangou, R. e Doudna, J.A. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnology*, v. 34, p. 933–941, 2016.

Bartish, I.V.; Garkava, L.P.; Rumpunen, K.; Nybom, H. Phylogenetic relationships and differentiation among and within populations of *Chaenomeles* Lindl. (Rosaceae) estimated with RAPDs and isozymes. *Theoretical Applied Genetics*, v. 101, p. 554–561, 2000.

Batista J.S.; Farias, I.P.; Formiga-Aquino, K.; Sousa, A.C.B. DNA microsatellite markers for “dourado” (*Brachyplatys tomarousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. *Conservation Genetics Resource*., 2009.

Baumgartner, L.; Paiz, L.M.; Zawadzki, C.H.; Margarido, V.P.; Castro, A.L.B.P. Heterochromatin Polymorphism and Physical Mapping of 5S and 18S Ribosomal DNA in Four Populations of *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1907) from the Paraná River Basin, Brazil: Evolutionary and Environmental Correlation. *Zebrafish*, v. 11, n.5, 2014.

Bitencourt, J.A.; Affonso, P.R.A.M.; Giuliano-Caetano, L.; Carneiro, P.L.S.; Dias, A.L. Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. *Genetics. Molecular Resource*, v. 11, n. 2, p. 933–943, 2012.

Becker, Q.M.C.; Castro, R.J.; Silva, A.M.; Vizzotto, P.C. Cytogenetic characterization of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) from tributaries of the Vermelho River, upper Paraguay River basin. *Biodiversidade*, v. 13, n. 1, 2014.

Bensch, S. e Akesson, M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology*, v. 14, p. 2899–2914, 2005.

Bertuzzo, E.; Muneeppeerakul, R.; Lynch, H.J.; Fagan, W.F.; Rodriguez-Iturbe, I.; Rinaldo, A. On the geographic range of freshwater fish in river basin. *Water Resources Research*, v. 45, p. 1–11, 2009.

Bezerra, B.S. Uma nova espécie de *Hypostomus* Lacépède (Siluriformes: Loricariidae) da bacia do rio Paraguaçu e redescritção de *Hypostomus unae* (Steindachner, 1978), Estado da Bahia, Brasil. *Dissertação* (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Diversidade Animal, Universidade Federal da Bahia, 2012.

Boch, J.; Scholze, H.; Schornack, S.; Landgraf, A.; Hahn, S.; Kay, S.; Lahaye, T.; Nickstadt, A.; Bonas, U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, v. 11, n. 326(5959), p. 1509-12, 2009.

Borba, R.S.; Garcia, M.S.; Kovalleski, A.; Oliveira, A.C.; Zimmer, P.D.; Branco, J.S.C.; Malone, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. *Neotropical Entomology*, v. 34, p. 565-569, 2005.

Borba, R.S.; Zawadzki, C.H.; Oliveira, C.; Perdices, A.; Parise-Maltempi, P.P.; Alves, A.L. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. *Neotropical Ichthyology*, v. 11, n. 1, p. 111-116, 2013.

Borém, A.; Caixeta, E.T. *Marcadores Moleculares*. Viçosa, MG, p. 374, 2006.
Boubli, J.P.; Rylands, A.B.; Farias, I.P.; Alfaro, M.E.; Alfaro, J.W.L. Cebus phylogenetic relationships: a preliminary reassessment of the diversity of the untufted capuchin monkeys. *American Journal Primatology*, v. 74, p. 381–393, 2012.

Brandão, K.O.; Rocha-Reis, D.A.; Garcia, C.; Pazza, R.; Almeida-Toledo, L.F.; Kavalco, K.F. Studies in two allopatric populations of *Hypostomus affinis* (Steindachner, 1877): the role of mapping the ribosomal genes to understand the chromosome evolution of the group. *Comparative Cytogenetics*, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2018.

Brahmane, M.P.; Das, M.K.; Sinha, M.R.; Sugunan, V.V.; Mukherjee, A. Use of RAPD fingerprint for delineating populations of hilsa shad *Tenualo sailisha* (Hamilton, 1822). *Genetic Molecular Research*, v. 5, n. 4, p. 643-652, 2006.

Boeseman, M. The genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, and its Surinam representatives (Siluriformes: Loricariidae). *Zoologische Verhandelingen, Rijksmuseum van Natuurlijke Historie te Leiden*, v. 99, p. 1-89, 1968.

Bueno, V.; Venere, P.C.; Zawadzki, C.H.; Margarido, V.P. Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. *Reviews in Fish Biology Fisheries*, v. 23, p. 103–112, 2013.

Bueno, V.; Venere, P.C.; Konerat, J.T; Zawadzki, C.H.; Vicari, M.R.; Margarido, V.P. Physical Mapping of the 5S and 18S rDNA in Ten Species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary Tendencies in the Genus. *Hindawi Publishing Corporation e Scientific World Journal*, 2014.

Bussell, J.D.; Waycott, M.; Chappill, J.A. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspectives on Plant Ecology Evolution Systematics*, v. 7, p. 3–26, 2005.

Buvanendran, V.; Finney, D.J. Linkage relationships of egg albumen loci in the domestic fowl. *British Poultry Science*, v. 8, p. 9–13, 1967.

Byrne, M. A molecular journey in conservation genetics. *Pacific Conservation Journey*, 2018.

Cai, Z.P.; Sabaa, H.; Wang, Y.N.; Goebel, R.; Wang, Z.Q.; Xu, J.F.; Stothard, P.; Lin, G.H. Most parsimonious haplotype allele sharing determination, *BMC Bioinformatics*, v. 10, p. 115, 2009.

Cardoso, Y.P., Montoya-Burgos J.I. Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region. *Molecular Ecology*, v. 18, p. 947–964, 2009.

Cardoso, Y.P.; Almirón, A.; Casciotta, J.; Alchino, D.; Lizarralde, M.S.; Montoya-Burgos, J.I. Origin of species diversity in the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) inhabiting the Paraná river basin, with the description of a new species. *Zootaxa*, v. 3453, p. 69–83, 2012.

Carvalho-Costa, L.F.; Hatanaka, T.; Galetti, P.M. Jr. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory fish *Prochilodus costatus*. *Molecular Ecology*, v. 6, p. 818-819, 2006.

Carvalho, P.H.; Lima, S.M.Q.; Zawadzki, C.H.; Oliveira, C.; Pinna, M. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region. *Mitochondria DNA*, 2015.

Cereali, S.S; Pomini, E.; Rosa, R.; Zawadzki, C.H.; Froehlich, O.L. Giuliano-Caetano, L. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 3, p. 583-591, 2008.

Chauhan, T.; Rajiv, K. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v. 1, p. 281-291, 2010.

Chen, H. e Leibenguth, F. Studies on multilocus fingerprints, RAPD markers, and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish *Carrasius auratusfibelio*. *Biochemical genetics*, v. 3, p. 297-306, 1995.

Chi, W.; Tong, C.; Gan, X.; He, S. Characterization and comparative profiling of miRNA transcriptomes in bighead carp and silver carp. *PLoS ONE*, v. 6, p. 235-249, 2011.

Conner, J.K. e Hartl, D.L. *A primer of ecological genetics*. Sinauer Associates, 2004.

Corley-Smith, G.E.; Lim, C.J.; Brandhorst, B.P. Production of androgenetic zebrafish *Danio rerio*. *Genetics*, v. 142, p. 265-276, 1996.

Correa, G.F.; Reis-Filho, J.S. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? *International Journal of Surgery Pathology*, v. 17, p. 285-302, 2009.

Csencsics, D.; Brodbeck, S.; Holderegger, R. Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *Journal of Heredity*, v. 101, p. 789–93, 2010.

Dawson, I.K.; Waugh, R.; Simons, J.; Powell, W. 1997. Simple sequence repeats provide a direct estimate of pollen-mediated gene dispersal in the tropical tree *Gliricidia sepium*. *Molecular Ecology* 6: 179–183.

Dergam, J.A.; Paiva, S.R.; Schaeffer, C.E., Godinho, A.L.; Veira, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics Molecular Biology*, v. 25, p. 379-387, 2002.

Dias, A. e Zawadzki, C.H. Identification key and pictures of the *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) from the rio Ivaí, upper rio Paraná basin. *Check List*, v. 14, n. 2, p. 393-414, 2018.

Ding, X. e Guo, X. A Survey of SNP Data Analysis. *Big Data Mining and Analytics*, v.1, n. 3, p. 173-190, 2018.

Dong, Z.; Ge, J.; Li, K.; Xu, Z.; Liang, D.; Li, J.; Li, J.; Jia, W.; Li, Y.; Dong, X.; Cao, S.; Wang, X.; Pan, J.; Zhao, Q. Heritable targeted inactivation of myostatin gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) using engineered zinc finger nucleases. *PLoS One*, v. 6, n. 12, 2011.

Doyon, Y.; McCammon, J.M.; Jeffrey C Miller, Faraji, F; Ngo, C.; Katibah, G.E.; Amora, R.; Hocking, T.D.; Zhang, L.; Rebar, E.J.; Gregory, P.D.; Urnov, F.D.; Amacher, S.L. Heritable Targeted Gene Disruption in Zebrafish Using Designed Zinc Finger Nucleases. *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 6, p. 702–708, 2008.

Drinkwater, R.D. e Hetzel, D.J.S. Application of molecular biology to understanding genotype-environment interactions in livestock production. In Proc. of an International Symposium on Nuclear Techniques in Animal Production and Health. IAEA, FAO, v. 437, n. 452, p. 15–19, 1991.

Dudgeon, D.; Arthington, A.H.; Gessner, M.O.; Kawabata, Z.I.; Knowler, D.J.; Lévêque, C.; Naiman, R.J.; Prieur-Richard, A.H.; Soto, D.; Stiassny, M.L.J.; Sullivan, C.A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, v. 81, p. 163–182, 2006.

Eagles H.A.; Bariana, H.S.; Ogbonnaya, F. Implementation of markers in Australian wheat breeding. *Crop Pasture Science*, v. 52, n.12, p. 1349–1356, 2001.

Egan, A.N.; Schlueter, J.; Spooner, D.M. Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American Journal of Botany*, v. 99, p. 175–185, 2012.

Elmer, K.R.; Fan, S.; Gunter, H.M.; Jones, J.C.; Boekhoff, S.; Kuraku, S.; Meyer, A. Rapid evolution and selection inferred from the transcriptomes of sympatric crater lake cichlid fishes. *Molecular Ecology*, v. 19, p. 197–211, 2010.

Emelianov, I.; Marec, F.; Mallet, J. Genomic evidence for divergence with gene flow in host races of the larch bud moth. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Science*, v. 271, p. 97–105, 2004.

Endo, K.S.; Martinez, E.R.M.; Zawadzki, C.H.; Paiva, L.R.S.; Junior, H.F.J.J. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 34, n. 2, p. 181-189, 2012.

Erlich, H.A. PCR Technology: principles and applications for DNA amplification. *W.H. Freeman and Company*, 1991.

Favarato, R.M.; Silva, M.; Oliveira, R.R.; Artioni, 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, p. 103-111, 2016.

Fellmann, C.; Gowen, B. G.; Lin, P. C.; Doudna, J. A.; Corn, J. E. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nature Reviews in Drug Discovery*, v. 16, p. 89–100, 2017.

Ferreira, M.E. e Grattapaglia, D. Introduction to the use of molecular markers in genetic analysis. *Embrapa-Cenargem*, 1998.

Fenerich, P.C.; Foresti, F.; Oliveira, C. Nuclear DNA content in 20 species of Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi) from the Neotropical region. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, n. 3, p. 350-354, 2004.

Freeman, A.R.; Bradley, D.G.; Nagda, S.; Gibson, J.P.; Hanotte, O. Combination of multiple microsatellite data sets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle. *Animal Genetics*, v. 37, p. 1-9, 2006.

Gaj, T.; Gersbach, C.A.; Barbas III, C.F. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 7, p. 397–405, 2013.

Galindo, B.A.; Ferreira, D.G.; Almeida, F.S.; Carlsson, J.; Sofia, S.H. Isolation and characterization of 13 polymorphic microsatellite loci in *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) and cross-amplification in related species. *Journal of Fish Biology*, 2015.

Garcez, R. Análise da estrutura genética populacional do curimbatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do rio Grande, SP *Dissertação* (Mestrado), Instituto de Biociências de São Paulo, USP, 2006.

Ghisi, N.C.; Oliveira, E.C.; Mota, T.F.M.; Vanzeto, G.V.; Roque, A.A.; Godinho, J.P.; Bettim, F.L.; Assis, H.C.S.; Prioli, A.J. Integrated biomarker response in catfish *Hypostomus ancistroides* by multivariate analysis in the Pirapo River, southern Brazil. *Chemosphere*, v. 161, p. 69-79, 2016.

Giuliano-Caetano, L. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae). *Tese* (Doutorado). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, 1998.

Godoy, F.M.R.; Lenzi, M.; Ferreira, B.H.S.; Silva, L.V.; Zanella, C.M.; Paggi, G.M. High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 20, p. 1-17, 2018.

Grant, C.E.H.; Lowe, W.H.; Fagan, W.F. Living in the branches: population dynamics and ecological processes in dendritic networks. *Ecology Letters*, v. 10, p. 165–175, 2007.

Grodzicker, T.; Williams, J.; Sharp, P.; Sambrook, J. Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology*, v. 39, p. 439-446, 1974.

Hale, M.C.; Jackson, J.R.; Dewoody, J.A. Discovery and evaluation of candidate sex-determining genes and xenobiotics in the gonads of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Genetica*, v. 138, p. 745–756, 2010.

Hanley, S.; Barker, J.H.A.; Van Ooijen, J.W.; Aldam, C.; Harris, S.L.; Ahman, I.; Larsson, S.; Karp, A. A genetic linkage map of willow *Salix viminalis* based on AFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetic*, v. 105, p. 1087–1096, 2002.

Hare, M.P.; Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, p. 700-706, 2001.

Hadrys, H.; Balick, M.; Schierwater, B. Applications of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, v. 1, p. 55-63, 1992.

Haymer, D.S. Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: What are they, and can they tell us anything we don't already know? *Annals of Entomological Society of American*, v. 87, p. 717-722, 1994.

He T.; Krauss, S.L.; Lamont, B.B.; Miller, B.P.; Enright, N.J. Long-distance dispersal in a metapopulation of *Banksia hookeriana* inferred from a population allocation analysis of amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Ecology*, v. 13, p. 1099–1109, 2004.

Hecker, M.; Tyler, C.H.R.; Hoffmann, M.; Maddix, S.; Karbe, L. Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany. *Environmental Science Technology*, v. 32, p. 2311– 2321, 2002.

Hibbett, D.; Abarenkov, K.; Kõljalg, U.; Öpik, M.; Chai, B.; Cole, J.; Wang, Q.; Crous, P.; Robert, V.; Helgason, T.; Herr, JR.; Kirk, P.; Lueschow S.; O'Donnell, K.; Nilsson, R.H.; Oono, R.; Schoch, C.; Smyth, C.; Walker, D.M.; Porras-Alfaro, A.; Taylor, J.W.; Geiser, D.M. Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia*, p. 16-130, 2016.

Hilsdorf, A.W.S. Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil. Tese (Doutorado). USP, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2013.

Hillis, D.M., Mable, B.K. and Moritz, C. Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. In: Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. Eds., *Molecular systematics*, p. 515-543, 1996.

Hocutt, C.H.; Wiley, E.O. *The zoogeography of North American freshwater fishes*, 1986.

Honorato, C.A.; Ushizima, T.T.; Santamaria, F.M.; Flores-Quintana, C.I.; Marcondes, V.M.; Nascimento, C.A. Desempenho produtivo e econômica de surubins (*Pseudoplatystoma* sp.) alimentados com níveis de proteína e estocados em tanque-rede. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica*, v.67, n.5, p.1408-1414, 2015.

Hsu, P. D.; Lander, E. S.; Zhang, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, v. 157, p. 1262–1278, 2014.

Hughes, A.R.; Inouye, B.D.; Johnson, M.T.; Underwood, N; Vellend, M. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, v. 11, n.6, p. 609-623, 2008.

Hunter, R.L. e Markert, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, v. 125, p. 1294-1295, 1957.

Irion, U.; Krauss, J.; Nusslein-Volhard, C. Precise and efficient genome editing in zebrafish using CRISPR/Cas9 system. *Development*, v. 141, p. 4827-4830, 2014.

Ito, K.F.; Renesto, E.; Zawadzki, C.H. Biochemical comparison of two *Hypostomus* populations (Siluriformes, Loricariidae) from the Atlântico Stream of the upper Paraná River basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, n. 1, p. 51-57, 2009.

Jarne, P. e Lagoda, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.

Jing, R.; Bolshakov, V.; Flavell, A.J. The tagged microarray marker (TAM) method for high-throughput detection of single nucleotide and indel polymorphisms. *Nature Protocols*, v. 2, n. 1, p. 168-177, 2007.

Joung, J.K. e Sander, J.D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, v. 14, p. 49-55, 2013.

Kamei, M.C.S.L.; Baumgartner, L.; Paiva, S.; Zawadzki, C.H.; Martins-Santos, I.C.; Portela-Castro, A.L.B. Chromosomal Diversity of Three Species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from the Parana River Basin, Brazil: A Species Complex in *Hypostomus ancistroides* Reinforced by a ZZ/ZW Sex Chromosome System. *Zebrafish*, v. 14, n. 4, 2017.

Karakoy T.; Baloch, F.S; Toklu, F. Variation for selected morphological and quality-related traits among 178 faba bean landraces collected from Turkey. *Plant Genetic Resources.*, v. 12 , n. 01, p. 5–13, 2014.

Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C; Moreira-Filho, O. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenetic Genome Research*, v. 106, p. 107–110, 2004.

Kazianis, S.; Morizot, D.C.; McEntire, B.B.; Nairn, R.S.; Borowsky, R.L. Genetic mapping in *Ziphophorus* hybrid fish: assignment of 43 AP-PCR RAPD and isozyme markers to multipoint linkage groups. *Genome Resolution*, v. 6, p. 280-289, 1996.

Kawase, J.; Aoki, J.; Hamada, K.; Ozaki, A.; Araki, K. Identification of Sex-associated SNPs of Greater Amberjack (*Seriola dumerili*). *Journal of Genomics*, v. 6, 2018.

Keller, I.; Taverna, A.; Seehausen, O. A pyrosequencing assay for the rapid discrimination of mitochondrial lineages in the *Salmo trutta* species complex. *Molecular Ecology Resources*, v. 11, p. 196–199, 2011.

Kristiansson, E.; Asker, N.; Förlin, L.; Larsson, D.G. Characterization of the *Zoarcas viviparus* liver transcriptome using massively parallel pyrosequencing. *BMC Genomics* DOI: 1034510.1186/1471-2164-10-345, 2009.

Lavado, R.; Thibaut, R.; Raldua, D.; Martin, R.; Porte, C. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology Applied Pharmacology.*, v. 196, p. 247–257, 2004.

Le Bail, P.Y.; Keith, P.; Planquette, P. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane, tome 2, fasc. 2. *Collection Patrimoines Naturels*, v. 43, n 2, MNHN/SPN, 307.p, 2000.

Leon, A; The, S.J.; Hall, L.C.; Tech, F.C. Androgen disruption of early development in Qurt strain medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology.*, v. 82, p. 195–203, 2007.

Lee, W.J.; Conroy, J.; Howell, W.H.; Kocher, T.D. Structure and evolution of teleost mitochondrial control region. *Journal of Molecular Evolution*, v. 41, p. 54-66, 1995.

Leuzzi, M.S.P.; Almeida, F.S.; Orsi, M.L.; Sodr , L.M.K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema river Brazil. *Genetic Molecular Biology*, v. 27, p. 355-362, 2004.

Lewontin, R.C. e Hubby, J. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. In: Amounts of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v. 54, p. 595-609, 1966.

Li, S.C.; Chan, W.C.; Ho, M.R.; Tsai, K.W.; Hu, L.Y.; Hsu, C.N.; Hwang, P.P.; Lin, W.C. Discovery and characterization of medaka miRNA genes by next generation sequencing platform. *BMC Genomics*, v. 11, n. 4, 8 p., 2010.

Lilyestrom, H.G. Consideraciones sobre la taxonomia del género *Cochliodon* Heckel en Venezuela (Pisces, Loricariidae). *Revista UNNELLEZ de Ciencia y Tecnologia*, v. 2, p. 41-53, 1984.

Limeira, D.M.; Renesto, E.; Zawadzki, C.H. Allozyme comparison of two populations of *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) from the Ivaí river, upper Paraná river basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, n. 2, p. 431-435, 2009.

Linda, K.P. e Paul, M. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. In: G.R. Carvalho and T.J. Pitcher. *Molecular Genetics in Fisheries*, p. 1-28, 1995.

Linderholm, A. Ancient DNA: the next generation – chapter and verse. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 117, n. 1, p. 150, 2016.

Liu, Z.; Nichols, A.; Li, P.; Dunham, R.A. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue catfish (*I. furcatus*). *Molecular and General Genetics*, v. 258, p. 260-268, 1998.

Liu, Z.; Li, P.; Kucuktas, H.; Nichols, A.; Tan, G. Development of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers suitable for genetic linkage mapping of catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 128, p. 317-327, 1999.

Liu, Z.J. e Cordes, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, v. 238, p. 1-37, 2004.

Liu, S.; Zhou, Z.; Lu, J.; Sun, F.; Wang, S.; Liu, H.; Jiang, Y.; Kucuktas, H.; Kaltenboeck, L.; Peatman, E.; Liu, Z. Generation of genome-scale gene-associated SNPs in catfish for the construction of a high-density SNP array. *BMC Genomics*, v. 12, n. 53, 2011.

Liu, S.; Zhang, L.; Yao, J.; Liu, Z. The complete mitochondrial genome of the armored catfish, *Hypostomus plecostomus* (Siluriformes: Loricariidae). *Mitochondria DNA*, 2014.

Liu, S.; Palti, Y.; Gao, G.; Rexroad, C.E. III. Development and validation of a SNP panel for parentage assignment in rainbow trout. *Aquaculture*, v. 452, p. 178–182, 2016.

Liu, Y., e Lin, H. Genetic analysis of the reproductive axis in fish using genome-editing nucleases. *Science Bulletin*, v. 62, n. 4, v. 302–308. 2017.

Lorscheider, C.A.; Zawadzki, C.H.; Vicari, M.R.; Martins-Santos, I.C.; Artoni, R.F. Karyotypic diversity of the armored catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes:

Loricariidae) in the context of its occurrence and distribution. *Journal of Fish Biology*, v. 87, p. 1099–1110, 2015.

Ludwig, A.; May, B.; Debus, L.; Jennecken, I. Heteroplasmy in mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso*, *Scaphirhynchus*). *Genetics*, v. 156, p. 1933–1947, 2000.

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

Lujan, N.K.; Meza-Vargas, V.; Barriga-Salazar, R. Two new Chaetostoma group (Loricariidae: Hypostominae) sister genera from opposite sides of the Andes Mountains in Ecuador, with the description of one new species. *Copeia*, v. 103, p. 651–663, 2015.

Lundberg, J.G.; Marshall, L.G.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M.C.S.L.; Wesselingh, F. The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (eds Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, CAS), p. 13–48, Edipucrs, Porto Alegre. *Mayden*, 1988.

Lu, R.; Rank, G.H. Use of RAPD analysis to estimate population genetic parameters in the Alfalfa leaf cutting bee, *Megachitero tundate*. *Genome*, v. 39, p. 655–663, 1996.

Mace, G.M.; Gittleman, J.L.; Purvis, A. Preserving the tree of life. *Science*, v. 300, p. 1707–1709, 2003.

Maldini, M.; Marzano, F.N.; Fortes, G.G.; Papa, R.; Gandolfi, G. Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture*, v. 261, p. 487–494, 2006.

Martinez, E.R.M. Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e sequências de DNA. *Tese* (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009.

Martinez, E.R.M.; Zawadzki, C.H.; Foresti, F.; Oliveira, C. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 34, n. 4, p. 562–568, 2011.

Mastrochirico-Filho, V.A.; Hata, M.E.; Sato, L.S.; Jorge, P.H.; Foresti, F.; Rodriguez, M.V.; Martínez, P.; Porto-Foresti, F.; Hashimoto, D.T. SNP discovery from liver transcriptome in the fish *Piaractus mesopotamicus*. *Conservation Genetic Resources*, 2016. DOI 10.1007/s12686-016-0521-3.

Matoso, D.A.; Artoni, R.F.; Galetti Jr, P.M. Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. *Hydrobiologia*, v. 527, p. 223–225, 2004.

Maurutto, F.A.M.; Manvailer, L.F.S.; Szczepanski, M.M.C.; Artoni, R.F. Cytogenetic characterization of three allopatric species of *Hypostomus* Lacépède (1803) (Teleostei, Loricariidae). *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, v. 65, n. 4, p. 340–346, 2012.

Mazzoni, R.; Caramaschi, U.; Weber, C. Taxonomical revision of the species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) from the Lower rio Paraiba do Sul, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revue Suisse de Zoologie*, v. 101, n. 1, p. 3-18, 1994.

Mburu, D.; Hanotte, O. A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. ILRI Biodiversity project A manual prepared for the IAEA/ILRI training course on molecular characterization of small ruminant genetic resources of Asia, October-December 2005, *ILRI*, Nairobi, Kenya, 2005.

Mchugh, J.L. Vertebral number of young herrings in southern British Columbia. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, v. 5, p. 474-484, 1942.

Mendes-Neto, E.O.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. *Comparative Cytogenetics*, v. 5, n. 2, p. 133–142, 2011.

Meng, X.; Noyes, M.B.; Zhu, L.J.; Lawson, N.D.; Wolfe, S.A. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc finger nucleases. *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 6, p. 695–701, 2008.

Meyer, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka, P.W.; Mommsen, T.P. (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier Science Publications, p. 1-38, 1993.

Milhomem, S.S.R.; Castro, R.R.; Nagamachi, C.Y.; Souza, A.C.P.; Feldberg, E.; Pieczarka, J.C. Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). *Comparative Cytogenetics*, v. 4, n. 1, p. 45-54, 2010.

Mirbahai, L.; Yin, G.; Bignell, J.P.; Li, N.; Williams, T.D.; Chipman, J K. DNA methylation in the liver tumorigenesis in fish from the environment. *Epigenetics*, v. 6, p. 1319–1333, 2011.

Moss, D.W. Isoenzymes. *Chapman & Hall*, London & New York, 1982.

Montaldo, H.H.; Meza-Herrera, C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Journal of Biotechnology*, v. 1, n. 2, p. 1-7, 1998.

Montoya-Burgos, J.I., Weber, C., Le Bail, P.Y. Phylogenetic relationships within *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and related genera based on mitochondrial D-loop sequences. *Revue Suisse de Zoologie*, v. 109, p. 369–382, 2002.

- Montoya-Burgos, J.I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 1855–1867, 2003.
- Morelli, K.A.; Revaldaves, E.; Oliveira, C.; Foresti, F. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, v. 7, p. 32-34, 2007.
- Moscou, M.J.; Bogdanove, A.J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, v. 11, n. 326(5959), p. 1501, 2009.
- Morozova, O.; Marra, M.A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, v. 92, p. 255-264, 2008.
- Mueller, U.G. e Wolfenbarger, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 14, n. 10, p. 389–394, 1999.
- Muhammad, A.N.; Muhammad, A.N.; Muhammad, Q.S.; Yıldız, D.; Gonul, C.; Mehtap, Y.; Rüştü, H.; Fiaz, A.; Ahmad, A., Nitin, L., Hakan, Ö., Gyuhwa, C.; Faheem, S.B. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v.; 32, n. 2, p. 261-285, 2018.
- Muneepeerakul, R.; Bertuzzo, E.; Lynch, H.J.; Fagan, W.F.; Rinaldo, A.; Rodriguez-Iturbe, I. Neutral metacommunity models predict fish diversity patterns in Mississippi-Missouri basin. *Nature*, v. 453, p. 453–222, 2008.
- Muramoto, J. and Ono, S. On the Diploid State of the Fish Order Ostariophysi. *Chromosoma*, v. 24, p. 59-66, 1968.
- Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, v. 89, p. 583-590, 1978.
- Normann, C.A.B.M.; Moreira, J.C.F.; Cardoso, V.V. Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecostomus* exposed to potassium dichromate. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 7, p. 893-896, 2008.
- Nosil, P.; Funk, D.; Ortiz-Barrientos, D. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology*, v.18, p. 375–402, 2009.
- Oliveira, L.C.; Ribeiro, M.O.; Dutra, E.S.; Zawadzki, C.H.; Portela-Castro, A.L.B.; Martins-Santos, I.C. Karyotype structure of *Hypostomus* cf. *plecostomus* (Linnaeus, 1758) from Tapajós River basin, Southern Amazon: occurrence of sex chromosomes (ZZ/ZW) and their evolutionary implications. *Genetic Molecular Research*, v. 14, n. 2, p. 6625-6634, 2015.
- Oyakawa, O.T.; Akama, A.; Zanata, A.M. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Ribeira do Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Zootaxa*, v. 921, p. 1-27, 2005.

Paiva, S.; Renesto, E.; Zawadzki, C.H. Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 3, p. 370-375, 2005.

Paiva, S.; Zawadzki, C.H.; Ruvulo-Takasusuki, M.C.C.; Lapenta, A.S.; Renesto, E. Allozyme analysis of the four species of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the Ivaí river, upper Paraná river basin, Brazil. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 35, n. 4, p. 571-578, 2013.

Paltchamy, K.; Senthivel, S.; Geethajali, S.; Sujatha, M.; Varaprasad, K.S. Genetic Markers, Trait Mapping and Marker-Assisted Selection in Plants Breeding. *Plant Biology and Biotechnology*, v. 2, 2015.

Pansonato-Alves, J.C.; Serrano, E.A.; Utsunomia, R.; Scacchetti, P.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Reviews in Fish Biology Fisheries*, 2013.

Parida, S.K.; Kalia, S.K.; Sunita, K.; Dalal, V.; Hemaprabha, G.; Selvi, A.; Pandit, A.; Singh, A.; Gaikwad, K.; Sharma, T.R.; Srivastava, P.S.; Singh, N.K.; Mohapatra, T. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 118, n. 2, p. 327-338, 2006.

Perez, C.F. Estudo taxonômico das espécies do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) de rios do leste do Brasil. *Dissertação* (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, UFSCAR, SP, 2018.

Pfeil, F.; Zawadzki, C.H.; Silva, H.P.; Troy, W. Redescription of *Hypostomus latirostris* (Regan, 1904) with the recognition of a new species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin, Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 2018. DOI: 10.23788/IEF-1079.

Philippsen, J.S.; Renesto, E.; Gealh, A.M.; Artoni, R. F.; Shibatta, O.A.; Zawadzki, C.H. Genetic variability in four samples of *Neoplecostomus yapo* (Teleostei: Loricariidae) from the river Paranapanema basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 7, n. 1, p. 25-30, 2009.

Piorski, N.M.; Garavello, J.C.; Arce, H.M.; PÉREZ, M.H.S. *Platydoras brachylecis*, a new species of thorny catfish (Siluriformes: Doradidae) from northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, n. 3, p. 481-494, 2008.

Porteus, M.H.; Baltimore, D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*, v. 300, p. 763, 2003.

Porteus, M.H. e Carroll, D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nature Biotechnology*, v. 23, p. 967-973, 2005.

Ponzetto, J.M.; Alves, A.L.; Varela, E.S.; Villela, L.C.V.; Caetano, A.R.; 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.

Postlethwait, J.H.; Johnson, S.L.; Midson, C.N.; Talbot, W.S.; Gates, M.A. Genetic linkage map for the Zebrafish. *Science*, v. 264, p. 699-705, 1994.

Quinn N. L.; Levenkova, N.; Chow, W.; Bouffard, P.; Boroevich, K.A.; Knight, J.R.; Jarvie, T.P.; Lubieniecki, K.P.; Desany, B.A.; Koop, B.F.; Harkins, T.T.; Davidson, W.S. Assessing the feasibility of GS FLX pyrosequencing for sequencing the Atlantic salmon genome. *BMC Genomics*, DOI: 9404 10.1186/1471-2164-9-404, 2008.

Rabosky, D.L.; Slater, G.J.; Alfaro, M.E. Clade age and species richness are decoupled across the eukaryotic tree of life. *PloS Biology*, v. 10, 2012.

Rabosky, D.L. Automatic detection of key innovations, rate shifts, and diversity-dependence on phylogenetic trees. *PLoS One*, v. 9, 2014.

Radev, Z.; Hermel, J.M.; Elipot, Y.; Breteau, S.; Arnould, S.; Duchateau, P.; Ruggiero, F.; Joly, J.S. Sohm, F. A TALEN-Exon Skipping Design for a Bethlem Myopathy Model in Zebrafish. *PLoS One*, v. 10, n. 7, 2015.

Randak T, Zlabek V, Kolarova J, Svobodova Z, Hajslova J, Siroka Z. Biomarkers detected in chub (*Leuciscus cephalus* L.) to evaluate contamination of the Elbe and Vltava Rivers, Czech Republic. *Bull Environmental Contamination Toxicology*, v. 76, p. 233–241, 2006.

Ramos, T.P.A.; Zawadzki, C.H.; Ramos, R.T.C.; Britski, H.A. Redescription of *Hypostomus johnii*, a senior synonym of *Hypostomus eptingi* (Siluriformes: Loricariidae), Northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 15, n. 2, 2017.

Ravago, R.G.; Monje, V.D.; Juino-Menez, M.A. Length and sequence variability in mitochondrial control region of the milkfish, *Chanos chanos*. *Marine Biotechnology*, v. 4, p. 40–50, 2002.

Razzoli, M.; Papa, R.; Valsecchi, P.; Nonnis Marzano, F. AFLP to assess genetic variation in laboratory gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Heredity*, v. 94, p. 507–511, 2003.

Reis, R.E.; Weber, C.; Malabarba, L.R. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces: Siluriformes: Loricariidae). *Revue Suisse de Zoologie*, v. 97, n.3, p. 729-766, 1990.

Renesto, E.; Zawadzki, C.H.; Paiva, S. Allozyme differentiation and relationships within *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the upper Paraguay River basin, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 35, p. 869-876, 2007.

Revaldaves, E.; Pereira, L.H.G.; Foresti, F.; Oliveira, C. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, v. 5, p. 463-465, 2005.

Revell, L.J. Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, v. 3, p. 217–223, 2012.

- Ricklefs, R.E. Estimating diversification rates from phylogenetic information. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 22, p. 601–610, 2007.
- Riedy, M.F.; Hamilton III, W.J.; Aquadro, C.F. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 20, p. 918, 1992.
- Rodrigues, R.M. Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva. *Dissertação* (Mestrado), Instituto de Biociências de São Paulo, USP, 2010.
- Royce, W.F. Statistical comparison of morphological data. In: MARR, J.C. (ed.) *Contributions to the Study of Subpopulations of Fishes*. Spec. Sci. Rep. Fisheries series, *Fish and Wildlife Services*, v. 208, p. 7-28, 1957.
- Rubert, M.; Zawadzki, C.H.; Giuliano-Caetano, L. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, v. 6, n. 1, p. 93-100, 2008.
- Rubert, M.; Rosa, R.; Jerep, F.C.; Bertollo, L.A.C.; Giuliano-Caetano, L. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *Comparative Cytogenetics*, v. 5, p. 5, p. 397–410, 2011.
- Rubert, M.; Rosa, R.; Zawadzki, C.H.; Mariotto, S.; Moreira-Filho, O.; Giuliano-Caetano, L. Chromosome Mapping of 18S Ribosomal RNA Genes in Eleven *Hypostomus* Species (Siluriformes, Loricariidae): Diversity Analysis of the Sites. *Zebrafish*, v. 13, n. 4, 2016.
- Rubino, D.; Holland, B.S. Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Systematic Biology*, v. 54, p. 952-961, 2005.
- Ruzzante, D.E. ; Taggart, C.T. ; Cook, D; Goddard, S. Genética diferenciação entre o bacalhau Atlântico (*Gadus morhua*) da costa e do alto mar da Terra Nova: variação do DNA de microssatélites e nível de anticongelante. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 53, p. 634-645, 1996.
- Salem, M.; Rexroad, C.E. III; Wang, J.; Thorgaard, G.H.; Yao, J. Characterization of the rainbow trout transcriptome using Sanger and 454-pyrosequencing approaches. *BMC Genomics*, DOI: 11564 10.1186/1471-2164-11-564, 2010.
- Sales E.; Nebauer, S.G.; Mus, M.; Segura, J. Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. *American Journal of Botany*, v.88, p. 1750–1759, 2001.
- Sanger, F.; Coulson, A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, v. 94, p. 441–448, 1975.

Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, p. 5463–5467, 1977.

Schierwater, B.; Ender, A. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 4647, p. 8, 1993.

Seeb, J.E.; Carvalho, G.; Hauser, L.; Naish, K.; Roberts, S.; Seeb, L.W. Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Molecular Ecology Resource*, v. 11, p. 1–8, 2011.

Seeb, J.E.; Pascal, C.E; Grau, E.D.; Seeb, L.W.; Templin, W.D.; Harkins, T.; Roberts, S.B. Transcriptome sequencing and high-resolution. melt analysis advance single nucleotide polymorphism discovery in duplicated salmonids. *Molecular Ecology. Resource*, v. 11, p. 335–348, 2011.

Semagn, K.; Bjørnstad, A.; Ndjioudjop, M.N. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, v. 2540, p. 25-68, 2006.

Shui, B.N.; Han, Z.Q.; Gao, T.X.; Miao, Z.Q. Tandemly repeated sequence in 50 end of mtDNA control region of Japanese Spanish mackerel *Scomberomus niphonius*. *African Journal of Biotechnology*, v. 24, p. 4415–4422, 2008.

Silva, G.S.C.; Roxo, F.F.; Lujan, N.K.; Tagliacollo, V.A.; Zawadzki, C.H.; Oliveira, C. Transcontinental dispersal, ecological opportunity and origins of an adaptive radiation in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Ecology*, v. 25, p. 1511–1529, 2016.

Skroch, P., Neinhuis, J. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theoretical Applied Genetics*, v. 91, n. 1086, p. 91, 1995.

Smith, G.R. Late Cenozoic freshwater fishes of North America. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 12, p. 163–193, 1981.

Smithies, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal*, v. 61, p. 629-641, 1955.

Soares, A.R.; Pereira, P.M.; Santos, B.; Egas, C.; Gomes, A.C.; Arrais, J.; Oliveira, J.L.; Moura, G.R.; Santos, M.A. Parallel DNA pyrosequencing unveils new zebrafish micro RNAs. *BMC Genomics*, DOI: 1019510.1186/1471-2164-10-195, 2009.

Sobrinho, B.; Brion, M.; Carracedo, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*, v. 154, n. 2, p. 181–194, 2005.

Sofia, S.H.; Galindo, B.A; Paula, F.M.; Sodré, L.M.K.; Martinez, C.B.R. Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, n. 1, p. 317-323, 2008.

Sorenson, L.; Santini, F.; Alfaro, M.E. The effect of habitat on modern shark diversification. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 27, p. 1536–1548, 2014.

Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, v. 98, p. 503–517, 1975.

Sotiriou, C.; Pusztai, L. Gene-expression signatures in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 360, p. 790–800, 2009.

Stanley S.M. Macroevolution. Pattern and Process. *The Johns Hopkins University Press*, 1998.

Star, B.; Nederbragt, A. J.; Jentoft, S.; Grimholt, U.; Malmstrøm, M.; Gregers, T.F.; Rounge, T.B.; Paulsen, J.; Solbakken, M.H.; Sharma, A.; Wetten, O.F.; Lanzén, A.; Winer, R.; Knight, J.; Vogel, J.H.; Aken, B.; Andersen, O.; Lagesen, K.; Tooming-Klunderud, A.; Edvardsen, R.B.; Tina, K.G.; Espelund, M.; Nepal, C.; Previti, C.; Karlsen, B.O.; Moum, T.; Skage, M.; Berg, P.R.; Gjøl, T.; Kuhl, H.; Thorsen, J.; Malde, K.; Reinhardt, R.; Du, L.; Johansen, S.D.; Searle, S.; Lien, S.; Nilsen, F.; Jonassen, I.; Omholt, S.W.; Stenseth, N.C.; Jakobsen, K.S. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature*, v. 477, p. 207–210, 2011.

Strayer, D.L. e Dudgeon, D. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, v. 29, p. 344–358, 2010.

Suneetha, B.K. Interspecific and inter specific genetic variation in selected mesopelagic fishes with emphasis on microgeographic variation and species characterization. Dr. Scient. *Dissertation*, Department of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen, Bergen, Norway, 2000.

Sunnucks, P. Efficient genetic markers for population biology. *Tree*, v. 15, p. 199–203, 2001.

Swarthout, J.T.; Raisinghani, M.; Cui, X. Zinc Finger Nucleases: A new era for transgenic animals. *Annals of Neurosciences*, v. 18, n. 1, p. 1–4, 2011.

Tagliacollo, V.A.; Roxo, F.F.; Duke-Sylvester, S.M.; Oliveira, C.; Albert, J.S. Biogeographical signature of river capture events in Amazonian lowlands. *Journal of Biogeography*, v. 42, p. 2349–2362, 2015.

Takagi, M.; Sogabe, G.; Taniguchi, N. Genetic variability and divergence of ayu *Plecoglossus altivelis* using AFLP fingerprinting. *Suisan Ikushu*, v. 26, p. 55–61, 1998.

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 4407–4414, 1995.

Venditti, C.; Meade, A.; Pagel, M. Phylogenies reveal new interpretation of speciation and the Red Queen. *Nature*, v. 46, p. 349–352, 2010.

Taylor, A.C.; Sherwin, W.B.; Wayne, R.K. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: The northern hairy-nosed wombat *Lasiorninus krefftii*. *Molecular Ecology*, v. 3, n. 4, p. 277-290, 1994.

Telles, M.P.C.; Resende, L.V.; Brondani, R.P.V.; Collevatti, R.G.; Costa, M.C.; Silva Júnior, N.J. Isolation and characterization of microsatellite markers in the armored catfish *Hypostomus gymnorhynchus* (Loricariidae). *Genetics Molecular Research*, v. 9, n. 3, p. 1770-1774, 2010.

Teneva, A. Molecular markers in animal genome analysis. *Biotechnology in Animal Husbandry*, v. 25, n.5-6, p. 7267-1284, 2009.

Terencio, M.L.; Scheneider, C.H.; Gross, M.C.; Feldberg, E.; Porto, J.I.R. Structure and organization of the mitochondrial DNA control region with tandemly repeated sequence in the Amazon ornamental fish. *Mitochondrial DNA*, v. 1, p. 1–9. 2012.

Thorpe, K.L.; Maack, G.; Benstead, R.; Tyler, C.H.R. Estrogenic wastewater treatment works effluents reduce egg production in fish. *Environment Science Technology*, v. 43, p. 2976–2982, 2009.

Traldi, J.B.; Vicari, M.R.; Blanco, D.R.; Martinez, J.F.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. *Comparative Cytogenetics*, v. 6, n. 2, p. 115–125, 2012.

Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Martinez, J.F.; Lui, R.L.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). *Journal of Genetics*, v. 92, p 127–130. 2013.

Trubiroha, A.; Gillotay, P.; Giusti, N.; Gacquer, D.; Libert, F.; Lefort, A.; Haerlingen, B.; De Deken, X.; Opitz, R.; Costagliola, S. A Rapid CRISPR/Cas-based Mutagenesis Assay in Zebrafish for Identification of Genes Involved in Thyroid Morphogenesis and Function. *Scientific Reports*, v. 8, p. 5647, 2018.

Turchetto-Zolet, A.C.; Turchetto, C.; Zanella, C.M.; Passaia, G. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações. *Sociedade Brasileira de Genética*. p. 12, 2017.

Van der Oost, R.; Beyer, J; Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57–149, 2003.

Vari, R.P. The Curimatidae, a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. In: Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns (eds Heyer WR, Vanzolini PE), p. 343–377. *Academia Brasileira de Ciências*, 1988.

Varshney, R.K.; Graner, A.; Sorrelis, M.E. Genetic microsatellite markers in plants: feature and applications. *Trends Biotechnology*, v. 23, p. 48-55, 2005.

Vera, M.; Alvarez-Dios, J.; Fernandez, C.; Bouza, C.; Vilas, R. Development and validation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) markers from two transcriptome 454-runs of turbot (*Scophthalmus maximus*) using high throughput genotyping. *International Journal of Molecular Science*, v. 14, p. 5694–5711, 2013.

Vieira, R.S.; Renesto, E. Genetic variability in three populations of *Hypostomus hermanni* (Teleostei: Loricariidae) found in the basins of Ivaí River, Tietê River, and Sapucaí-Mirim River of Brazil. *Genetics Molecular Research*, v. 15, n. 4, 2016.

Vignal, A.; Milan, D.; Sancristobal, M.; Eggen, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, v. 34, p. 275-305, 2002.

Vrijenhoek, R.C.; Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, v. 53, p. 394-412, 1998.

Xu Y. Molecular plant breeding. Wallingford: *Centre for Agriculture and Bioscience International*, 2010.

Wang, Z; Gerstein, M.; Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews in Genetics*, v. 10, p. 57-63, 2009.

Wasko, A.P. e Galetti Jr, P.M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Bryconlundii*: Genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, v. 474, p. 131-137, 2002.

Wasko A.P., Martins, C.; Oliveira, C.; Senhorini, J.A.; Foresti, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Bryconcephalus*) using RAPD markers: Insights into supportive breeding and conservation program. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 20, p. 48-52, 2004.

Welsh, J. e McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

Whitehead, A.; Dubansky, B.; Bodinier, C.; Garcia, T.I.; Miles, S.; Pilley, C.; Raghunathan, V.; Roach, J.L.; Walker, N.; Walter, R.B.; Rice, C.D.; Galvez, F. Genomic and physiological footprint of the *Deepwater Horizon* oil spill on resident marsh fishes. *Proceedings of Natural Academy of Science of the United States of America*, DOI: 10.1073/pnas.1109545108, 2011.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

Winemiller, K.O.; Lopez-Fernandez, H.; Taphorn, D.C.; Nico, L.G.; Duque, A.B. Fish assemblages of Casiquiare River, a corridor and zoogeographical filter for dispersal between the Orinoco and Amazon basin. *Journal of Biogeography*, v. 35, p. 1551–1563, 2008.

Woese, C. R., Kandler, O.; Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.87, p. 4576–4579, 1990.

Wolf, C.; Burgener, M.; Hubner, P.; Luthy, J. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v. 33, p. 144-150, 2000.

Yang, W.; Kang, X.; Yang, Q.; Lin, Y.; Fang, M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science Biology*, v. 4, n. 2, p. 1 – 6, 2013.

Yoon, J.M. e Kim, G.W. Randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction analysis of two different populations of cultured Korean catfish *Silurus asotus*. *Journal of Biosciences*, v. 26, p. 641–647, 2001.

Yue, G.H. e Orban, L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. *Molecular Ecology*, v. 2, p. 99-100, 2002.

Zawadzki, C.H.; Renesto, E.; Bini, L.M. Genetic and morphometric analysis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the Rio Iguaçu basin (Brazil). *Revue Suisse de Zoologie*, v. 106, n. 1, p. 91-105, 1999.

Zawadzki, C.H.; Machado, M.F.P.S.; Renesto, E. Differential expression for tissue-specific isozymes in three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei: Loricariidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 29, p. 911–922, 2001.

Zawadzki, C.H.; Renesto, E.; Mateus, R.P. Allozyme Analysis of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the Rio Corumbá Upper Rio Paraná Basin, Brazil. *Biochemical Genetics*, v. 6, p. 755–769, 2008.

Zawadzki, C.H.; Renesto, E.; Peres, M.D.; Paiva, S. Allozyme variation among three populations of the armored catfish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Siluriformes, Loricariidae) from the Paraná and Paraguay river basins, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, n. 3, p. 767-771, 2008.

Zawadzki, C.H.; Carvalho, P.H.; Birindelli, J.L.O.; Azevedo, F.M. *Hypostomus nigrolineatus*, a new dark-striped species from the rio Jequitinhonha and rio Pardo basins, Brazil (Siluriformes, Loricariidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, v. 27, p. 263-274, 2016.

Zawadzki, C.H.; Oyakawa, O.T.; Britski, H.A. *Hypostomus velhochico*, a new keeled *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio São Francisco basin in Brazil. *Zootaxa*, v. 4344, n. 3, p. 560, 2017.

Zawadzki, C.H.; Penido, I.S.; Pessali, T.C. Rediscovery and redescription of the endangered *Hypostomus subcarinatus* Castelnau, 1855 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio São Francisco basin in Brazil, with comments on the urban water conservation. *Preprint*, 2018, DOI: 10.1101/458604.

Zhang, H.W.; Yin, S.W.; Zhang, L.J.; Hou, X.Y.; Wang, Y.Y. Development and validation of single nucleotide polymorphism markers in *Odontobutis potamophila* from transcriptomic sequencing. *Genetic Molecular Research*, v. 14, n. 1, p. 2080–2085, 2015.

Zhou, C.J.; Song, H.Z.; Li, J.H.; Sun, J.W.; Jin, D.M.; Zhang, Q.W.; Wang, B. Evaluation of genetic diversity and germplasm identification of 44 species, clone, and cultivars from 5 sections of the genus *Populus* based on amplified fragment length polymorphism analysis. *Plant Molecular Biology Reproduction*, v. 23, p. 39–51, 2005.

Zhou, X.; Ren, L.; Meng, Q.; Li, Y.; Yu, Y.; Yu, J. The next-generation sequencing technology and application. *Protein Cell*, v. 1, n. 6, p. 520–536, 2010.

Zu, Y.; Tong, X.; Wang, Z.; Liu, D.; Pan, R.; Li, Z.; Hu, Y.; Luo, Z.; Huang, P.; Wu, Q.; Zhu, Z.; Zhang, B.; Lin, S. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nature Methods*, v. 10, p. 329–331, 2013.

Zhu, B. e Ge, W. Genome Editing in Fishes and Their Applications, *General and Comparative Endocrinology*, 2017.

CAPÍTULO II

**Avaliação da eficiência de diferentes protocolos na extração de DNA de
Hypostomus commersoni (Valenciennes, 1836).**

Avaliação da eficiência de diferentes protocolos na extração de DNA de *Hypostomus commersoni* (Valenciennes, 1836).

Resumo: O princípio e as técnicas de isolamento de DNA desempenham um papel importante na obtenção de uma quantidade considerável e pura de material genético. O rendimento e a qualidade do produto final obtido, por métodos que geralmente são bem-sucedidos em outros animais podem diferir em peixes. Além disso, o mesmo método pode, inclusive, apresentar resultados diferentes quando utilizado em diferentes espécies ictiológicas. Neste sentido, buscou-se avaliar a eficiência de diferentes protocolos e suas possíveis adaptações de acordo com as possibilidades do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da URI-Erechim/RS. Para este propósito, selecionou-se 7 (sete) protocolos para a extração de DNA genômico em exemplares de *H. commersoni*, espécie relevante comercial e ecologicamente e sem descrição de protocolo específico até a presente data. As metodologias escolhidas já haviam sido utilizadas em outras espécies de peixes ou as variáveis descritas no trabalho original eram semelhantes àquelas que pretendia-se avaliar neste estudo. Ainda, foi testado um oitavo protocolo, desenvolvido a partir de outras metodologias e proposto neste trabalho. Para cada um dos protocolos, foram testadas as condições originais descritas pelos autores, além de diferentes tratamentos e uso de distintos fragmentos teciduais. A qualidade do material extraído foi avaliada por eletroforese em gel, espectrofotometria e PCR-RAPD. Os resultados indicam que o uso de diferentes tecidos com o mesmo protocolo de extração apresenta diferenciação em termos de quantidade e qualidade de DNA. Da mesma forma, extrair o DNA do mesmo modelo tecidual com diferentes protocolos resulta em variações na amostragem final de material genético obtido. Neste trabalho, encontrou-se alguns parâmetros de destaque para a espécie *H. commersoni*, como o fato de que é possível obter DNA a partir de tecido ocular, com armazenamento em até 36h, sem maceração, com a utilização de proteinase K e a partir de tecidos frescos. Concluiu-se, que o protocolo original descrito neste trabalho foi o que demonstrou maior eficiência na extração de DNA da espécie estudada. Para fins de conferência da qualidade do material obtido e da aplicabilidade do DNA extraído em análises genéticas, as amostras foram amplificadas com um conjunto de *primers* OPW da Operon Technologies. Não há registro da descrição e utilização de tais parâmetros em nenhuma espécie de peixe até a presente data, evidenciando a relevância deste trabalho para a área.

Palavras-chave: Qualidade de DNA; eletroforese; espectrofotometria; RAPD.

Abstract: The principle and the techniques of DNA isolation play an important role in obtaining a considerable and pure amount of genetic material. The yield and final product quality obtained by methods that usually are successful in other animals may be very different in fishes. In addition, the same method may even present different results when used in different ichthyological species. In this sense, we aim to evaluate the efficiency of different protocols and their possible adaptations according to the possibilities of the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of URI-Erechim/RS. For this purpose, seven (7) protocols were selected for extracting genomic DNA from specimens of *H. commersoni*, a relevant species commercially and ecologically and without a specific protocol description to date. The methodologies chosen had already been used in other species of fish or the variables described in the original work were similar to those that were intended to evaluate in this study. Also, an

eighth protocol, developed using several methodologies and proposed in this work, was tested. For each protocol, the original conditions described by the authors were tested, as well as different treatments and the use of different tissue fragments. The quality of the extracted genetic material was evaluated by gel electrophoresis, spectrophotometry and PCR-RAPD. The results indicate that the use of different tissues with the same extraction protocol presents differentiation in terms of quantity and quality of DNA. Similarly, extracting DNA from the same tissue model with different protocols results in variations in the final sampling of the genetic material obtained. In this work, we found some important parameters for the *H. commersoni* species, being relevant the fact that it is possible to obtain DNA from ocular tissue, with a good storage until 36h, without maceration, using fresh tissues and proteinase K. Finally, we concluded that the protocol described in this work - and that gathers steps of all the methodologies evaluated - was the one that demonstrated greater efficiency in the extraction of DNA of the studied specie. In order to test the quality of the obtained material and the applicability of the extracted DNA in genetic analyzes, the samples were amplified with the set of OPW primers, from Operon Technologies. There is no record of the description and use of such parameters in any fish species to date, evidencing the relevance of this work to the area.

Keywords: DNA quality; electrophoresis; spectrophotometry; RAPD;

Introdução

Praticamente todos os processos de análise genética dependem de uma extração de DNA bem-sucedida, uma vez que contaminantes no DNA isolado como lipídios, proteínas, polissacarídeos e diferentes compostos inorgânicos e orgânicos interferem na qualidade do produto obtido e diminuem sua vida útil (Bauer e Patzelt, 2003). O princípio e as técnicas de isolamento desta molécula desempenham um papel importante para a extração bem-sucedida de uma quantidade considerável e purificada de DNA, uma vez que essa célula é o complexo de diferentes organelas e moléculas biológicas, que podem intervir como agentes contaminantes (Muhammad et al., 2016).

Existem várias estratégias de extração de DNA disponíveis, como lise química, térmica, enzimática ou mecânica, ou uma combinação destes métodos (Reischl et al., 2000; Rantakokko-Jalava e Jalava, 2002; Tongeren et al., 2011). Independentemente da metodologia de escolha, a extração de DNA sempre consiste em três etapas comuns: lise, purificação e recuperação de DNA, sendo a lise o passo mais crítico, já que as chances de degradar a amostra ou causar quebras de DNA é relativamente mais alta nesta fase inicial (Barbosa et al., 2015).

A extração de DNA de alta qualidade de várias fontes, como diferentes amostras de tecido, é a etapa crucial na biologia molecular e a qualidade e quantidade do DNA

molde influenciam vários experimentos moleculares, incluindo PCR, digestão enzimática e seleção recombinante (Ward et al., 2009; Wang, 2011). Contudo, o rendimento e a qualidade do DNA obtidos por métodos que são bem-sucedidos em outros animais podem ser muito diferentes em peixes (Muhammad et al., 2016). Além disso, o mesmo método pode, inclusive, apresentar resultados diferentes quando utilizado em diferentes espécies ictiológicas (Lucentini et al., 2006).

As informações do DNA extraído podem ser aplicadas em estudos ecológicos e evolutivos, na determinação do polimorfismo genético entre e dentro de populações naturais ou cativas, na reconstrução de linhagens genéticas e classificação de *pedigrees*, estimativas relacionadas de diversidade, determinação sexual e identificação de espécies (Wasko et al., 2003; Kumar et al., 2007). Ainda, seu uso pode ser estendido à aplicação em diagnósticos médicos e forenses, na manipulação de células bacterianas, vegetais e animais, bem como para estudos de patogenicidade e paternidade (Srividya et al., 2011).

Uma das dificuldades ao se realizar uma análise genética que depende de extração de DNA previa e de qualidade, é que nem sempre os protocolos descritos em trabalhos publicados funcionam com a eficiência necessária. E esta ineficiência parcial ou completa pode estar relacionada a diversos fatores. Por si só, o fato de que cada laboratório possui especificações e disponibilidade de equipamentos e reagentes distintos já é potencialmente uma razão para que a aplicação do mesmo protocolo em locais diferentes apresente também resultados diferentes.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias e equipamentos para análise da vida, existem uma exigência cada vez maior de produzir amostras de boa qualidade para que sejam gerados resultados livres de erros. Para atender a esses requisitos, pesquisadores de alguns laboratórios desenvolveram kits comerciais para que as extrações de DNA possam estar dentro dos parâmetros de qualidade e quantidade desejáveis. No entanto, esses requisitos acabaram refreando o campo de pesquisa genética para laboratórios de baixa renda, especialmente no nível dos países em desenvolvimento, considerando que o valor de mercado destes produtos geralmente não é acessível para alguns laboratórios, especialmente quando comparados aos métodos caseiros de extração de DNA.

Neste sentido, buscou-se avaliar a eficiência de diferentes protocolos e suas possíveis adaptações de acordo com as possibilidades do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da URI-Erechim/RS, onde as análises foram desenvolvidas. Assim, foram selecionados 7 (sete) protocolos para a extração de DNA genômico de

exemplares de *H. commersoni*, espécie relevante comercial e ecologicamente e sem descrição de protocolo de extração de DNA específico até a presente data.

As metodologias escolhidas já haviam sido utilizadas em peixes ou as variáveis descritas no trabalho original eram semelhantes àquelas que pretendia-se avaliar neste estudo e, ainda, foi testado um oitavo protocolo, descrito a partir de diversas metodologias e proposto neste trabalho. Para cada um dos protocolos, foram testadas as condições originais descritas pelos autores, além de diferentes tratamentos e tipos de fragmentos teciduais. Para fins de conferência da aplicabilidade do DNA extraído em análises genéticas, as amostras foram submetidas à amplificação com 36 *primers* de diferentes kits de PCR-RAPD.

Materiais e Métodos

Para todos os protocolos aplicados, a lista padrão de equipamentos e materiais requeridos foi majoritariamente a mesma, seguindo a ordem de necessidade de cada experimento performado, de acordo com as especificidades de cada protocolo. De modo geral todos os protocolos requereram o uso de pinça anatômica e bisturi (para manipulação dos exemplares e retirada dos tecidos), microcentrífuga para eppendorf, microtubos (eppendorf – 1,5 ml), pipetadores de calibres 10 µL, 100 µL e 1000 µL e respectivas ponteiras, banho termorregulado e estufa de aquecimento, agitador magnético para preparo de soluções, vórtex, medidor de pH de bancada, luvas e máscaras descartáveis para evitar contaminação de material. Todos os materiais utilizados em todos os procedimentos foram previamente esterilizados.

Os exemplares de *Hypostomus commersoni* foram coletados e identificados até o nível de espécie com auxílio de chave para caracteres anatômicos (Disponível em Garavello et al., 2012). Em seguida, foram acondicionados ainda vivos em frascos contendo água do próprio local de coleta em dissolução com 50 µL óleo de cravo, onde foram gradativamente anestesiados.

Após o término das análises todos os espécimes de *H. commersoni* foram acondicionados em frascos de vidro contendo álcool 70% e tombados na coleção zoológica do Museu Regional do Alto Uruguai (MuRAU) da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões sob número de registro 715 e 716, ficando disponível para futuras pesquisas científicas.

Variáveis testadas para todos os protocolos:

1. Conservação de exemplares: Frescos (coletados, eutanasiados e tecido extraído logo em seguida), armazenados em álcool hidratado à 70% e 95% (juntamente com três testes distintos para temperatura: a) frascos contendo espécimes armazenado em temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C; b) frascos armazenados em geladeira (10 °C); c) frascos armazenados em freezer (-20 °C). Ainda, foram realizadas extrações com tecidos conversados em congelador (espécimes coletados, eutanasiados e tecido-alvo armazenado à -20 °C logo após coleta);

2. Maceração: Com o intuito de avaliar se o processo de maceração mecânica poderia influenciar na extração de DNA em termos de quantidade e qualidade, os tecidos foram submetidos à lise mecânica em vórtex e também com nitrogênio líquido previamente a adição do tampão de extração;

3. Tecido-alvo: Buscamos avaliar diferentes tecidos e sua eficiência em relação a cada protocolo e adaptação realizada, com base nos tecidos geralmente utilizados na extração de DNA em espécies de peixes. Selecionados os seis tecidos mais viáveis dentro de nossas condições e que, em testes-piloto apresentaram potencial: Nadadeira dorsal, nadadeira caudal, músculo, brânquias, sangue e tecido ocular;

3.1 – Para a coleta de sangue aplicou-se uma metodologia específica; verificando os padrões de pulsação e ausência de movimentação branquial, o sangue total foi drenado de cada amostra usando seringa estéril de 2 mL e agulha hipodérmica descartável (calibre 21) banhada em anticoagulante e inserida ventralmente nos vasos sanguíneos por punção intracárdica. Aproximadamente 500 µL de sangue foram obtidos de cada exemplar, sendo acondicionadas em microtubo plástico estéril contendo 500 µL de anticoagulante (EDTA). As amostras foram em seguida submetidas ao processo de extração pelo procedimento regular de cada protocolo.

4. Tempos de extração: Com o intuito de avaliar se seria possível deixar as amostras em tampão durante mais tempo (o que pode vir a ser útil no caso de estar em campo realizando coletas e o retorno para o laboratório com as amostras não ocorrer imediatamente ou as condições de preservação até o desenvolver dos experimentos não forem ideais) avaliamos também os tempos de incubação de 1 hora (55 °C) e também 12, 24 e 36 horas, porém neste caso sem utilização de banho termorregulado, mas incubando as amostras a temperatura ambiente (25-27 °C);

5. RNase: Com e sem adição de RNase, testado para todos os tecidos, tempos e tratamentos ao final de cada protocolo;

6. Proteinase K: Com e sem adição de Proteinase K, testado para todos, tecidos, tempos e tratamentos ao início de cada protocolo (utilizada juntamente com o tampão de extração ou logo em seguida);

7. Armazenamento DNA extraído: Ao final de cada extração as amostras eram deixadas 24 horas na bancada (temperatura de 25 °C) para eluição do material e então sob condições distintas: a) geladeira (4 °C); b) congelador (-10 °C); c) freezer (-20 °C);

8. Quantificação e Integridade: Todas as amostras foram avaliadas através de espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose (no dia da extração, após 10, 20 e 30 dias de armazenamento, em todas as condições).

Protocolos testados

1 – Protocolo de Doyle e Doyle (1987)

a) Lista de reagentes:

- Etanol grau analítico;
- CTAB (2% CTAB + 1,4 M NaCl + 20 mM EDTA + 100 mM Tris-HCl + 1% PVP);
- Proteinase K (Comercial, diluir 1 mg/mL de água destilada estéril);
- β -Mercaptoetanol (Comercial);
- CIA (Clorofórmio + Álcool isoamílico, alíquota 1:24, v/v);
- Isopropanol absoluto (Comercial, apenas manter gelado);
- Tampão TE 1x (Tris 10 mM + EDTA 1 mM pH 8,0);
- RNase (Comercial, diluir 1 mg/mL de água destilada estéril);

b) Etapas do procedimento:

1. Coletar os tecido das amostras (20 mg) em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL;
2. Adicionar 500 μ L de CTAB, 15 μ L de β -Mercaptoetanol e 15 μ L de Proteinase K, revolvendo gentilmente os tubos para que os reagentes sejam homogeneizados;

3. Acondicionar os microtubos em banho termorregulado à 60 °C por no mínimo 1 hora ou até que o tecido esteja visivelmente digerido (alternativa: deixar os microtubos em banho termorregulado à 50 °C *overnight* ou por 18 horas);
4. Retirar do banho termorregulado e aguardar até que os microtubos estejam resfriados. Na capela de exaustão, adicionar 500 µL de CIA e homogeneizar os volumes;
5. Centrifugar os microtubos durante 20 minutos à 14.000 rpm;
6. Recolher a fase aquosa e transferir para outro tubo de 1,5 mL;
7. Adicionar cerca 400 µL de isopropanol gelado ao tubo contendo as amostras, invertendo os tubos repetidamente e gentilmente até homogeneização das soluções;
8. Armazenar em freezer (-20 °C) para precipitação durante 2 horas;
9. Centrifugar durante 20 minutos à 14.000 rpm, descartando o sobrenadante;
10. Lavar o *pellet* com 400 µl de álcool 70%, distribuindo o reagente pelas paredes do microtubo e descartando cuidadosamente todo o volume em seguida;
11. Adicionar ao microtubo 200 µL de etanol absoluto e em seguida descartá-lo;
12. Deixar o *pellet* secar colocando os tubos invertidos sobre um papel toalha na bancada, por aproximadamente 20 minutos ou aquecer em estufa (37 °C);
13. Quando o tubo estiver completamente seco, adicionar 50-150 µL de TE 1x (dependendo do tamanho do *pellet* resultante) e 2 µL de RNase;
14. Deixar em banho termorregulado durante 1 hora à 37 °C e, posteriormente, 24 horas em temperatura ambiente;

2 – Protocolo de Medrano et al. (1990)

a) Lista de reagentes:

- Etanol grau analítico;
- Tampão STE 1x (NaCl 0,1 M + Tris 10mM + EDTA 1 mM pH 8,0);
- Tampão de Lise (NaCl 0,1 M + Tris 50 mM + EDTA 50 mM pH 8,0);
- SDS 20% (Comercial, diluir 20 g em 100 mL de água destilada estéril);
- Proteinase K (Comercial, diluir 1 mg/mL de água destilada estéril);
- NaCl 4M (11,71 g de NaCl em 50 mL de água destilada estéril);
- Isopropanol absoluto (Comercial, apenas manter gelado);
- Tampão TE 1x (Tris 10 mM + EDTA 1 mM pH 8,0);

- RNase (Comercial, diluir 1 mg/mL de água destilada estéril);

b) Etapas do procedimento:

1. Coletar os tecido das amostras (20 mg) em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL;
2. Lavar os tecido com 500 µL de tampão STE, revolvendo gentilmente os tubos;
3. Drenar o tampão STE e adicionar ao microtubo 550 µL de tampão de lise, 27,5 µL de SDS 20% e 40 µL de Proteinase K;
4. Acondicionar as amostras em banho termorregulado (60 °C) por aproximadamente 2 horas e agitar em vórtex em intervalos de 15 minutos;
5. Retirar os microtubos do banho termorregulado e adicionar 600 µL de NaCl 4 M;
6. Agitar em vórtex por 15 segundos e centrifugar durante 30 minutos à 13.000 rpm;
7. Retirar o sobrenadante e dividir o conteúdo (600 µL) em 3 microtubos novos (1,5 mL);
8. Adicionar 400 µL de isopropanol gelado, homogeneizando;
9. Deixar as amostras *overnight* em geladeira (4 °C) ou por 2 horas em freezer (-20 °C);
10. Centrifugar durante 30 minutos à 14.000 rpm e descartar o volume sobrenadante;
11. Pipetar em cada microtubo 700 µL de etanol 70% e homogeneizar lentamente para realizar a lavagem do DNA, em seguida centrifugar os microtubos durante 5 minutos à 9.000 rpm e repetir este passo por duas vezes;
12. Drenar cuidadosamente todo o volume líquido dos microtubos e acondiciona-los em estufa de aquecimento à 37 °C durante 30 minutos;
13. Retirar os microtubos da estufa e deixar descansado por cerca de 10 minutos;
14. Adicionar 30 µL de tampão TE e deixar em banho termorregulado por 1 hora à 37 °C;
15. Deixar os tubos em bancada esterilizada de um dia para o outro para que haja eluição do DNA extraído e armazenar em geladeira à 4 °C;

3 – Protocolo de Whitmore et al. (1992)

a) Lista de reagentes:

- Etanol grau analítico;

- Tampão de Lise (Tris-HCl 100 mM pH 8,0 + EDTA 10 mM + SDS 0,1% + DTT 50 mM);
- Proteinase K (comercial, diluir 0,5 mg/mL de água destilada estéril);
- Fenol (Saturado com Tris, pH 8,0);
- CIA (Clorofórmio + Álcool isoamílico, alíquota 1:24 v/v);
- Etanol absoluto (comercial, apenas manter gelado);
- Água destilada (esterilizada por processo de autoclavagem);

b) Etapas do procedimento:

1. Utilizar 20 mg de tecido frescos, congelados ou preservados em álcool;
2. Adicionar 500 µL de tampão de lise e 14 µL de proteinase K;
3. Incubar em banho termorregulado durante 4 horas à 50 °C ou *overnight* a 42 °C;
4. Realizar duas extrações com 700 µL de fenol: Pipetar o volume, centrifugar durante 15 minutos à 9.000 rpm, retirar o sobrenadante e transferir cuidadosamente para um novo tubo. Repetir a etapa, realizando apenas mais uma extração com fenol;
5. Realizar uma extração com 700 µL de CIA. Pipetar o volume, centrifugar durante 15 minutos à 6.000 rpm, retirar o sobrenadante e transferir para um novo tubo;
6. Precipitar O DNA pela adição de dois volumes de etanol absoluto;
7. Centrifugar durante 10 minutos à 7.000 rpm.
8. Descartar o etanol e deixar secado sob papel toalha em bancada esterilizada até completa evaporação etanoica;
9. Após secagem, ressuspender o *pellet* em 200 µL de água destilada;
10. Incubar a temperatura ambiente (25-27 °C) durante 12 horas;
11. Estocar em freezer (-20 °C);

4 – Protocolo de Aljanabi e Martinez (1997)

a) Lista de reagentes:

- Etanol grau analítico;
- Tampão de Lise (NaCl 0,4 M + Tris-HCl 10 mM pH 8,0 + EDTA 2 mM pH 8,0);
- SDS 20% (comercial, diluir 20 g em 100 mL de água destilada estéril);

- NaCl 4M (diluir 11,71 g de NaCl em 50 mL de água destilada estéril);
- Isopropanol absoluto (comercial, apenas manter gelado);
- Água destilada (esterilizada por processo de autoclavagem);

b) Etapas do procedimento:

1. Coletar 20 mg de tecido e acondicionar em microtubo de 1,5 mL;
2. Adicionar 400 µL de tampão de lise e homogeneizar em vortex durante 10-15 segundos;
3. Adicionar 400 µL de SDS 20% e 80 µL de de Proteinase K;
4. Incubar as amostras durante 1 hora ou *overnight* à 55–65 °C;
5. Adicionar 300 µL de NaCl 4 M, agitando em vortex durante 3 minutos;
6. Transfere o sobrenadante para tubos novos.
7. Adicionar 600 µL de isopropanol a cada amostra e homogeneizar;
8. Incubar as amostras durante 1 hora a –20 °C;
9. Centrifugar os microtubos durante 20 min à 11.000 rpm;
10. Descartar cuidadosamente o sobrenadante lavar o *pellet* com álcool 70%;
11. Descartar o álcool 70% e deixar os microtubos invertidos secando sob papel toalha;
12. Ressuspender o *pellet* em 300-500 µL de água destilada estéril
13. Armazenar o DNA extraído em geladeira (4 °C).

5 – Protocolo de Faleiro et al. (2003)

a) Lista de reagentes:

- Etanol grau analítico;
- Tampão de Lise (Tris-HCl 100 mM pH 8,0 + EDTA 20 mM + CTAB 2,8% + NaCl 1,3 M + PVP 1% + β-Mercaptoetanol 0,2%);
- CIA (Clorofórmio + álcool isoamílico em alíquota 1:24 v/v);
- CTAB 7% (7% CTAB + 1,4 M NaCl + 20 mM EDTA + 100 mM Tris-HCl + 1% PVP);
- Etanol absoluto (comercial, apenas manter gelado);
- Tampão TE 1x (Tris 10 mM pH 8,0 + EDTA 1 mM);

b) Etapas do procedimento:

1. Macerar 20 mg de amostras individualmente em cadinho contendo nitrogênio líquido;
2. Transferir os tecidos macerados para microtubos;
3. Adicionar 800 µL de tampão de lise aos microtubos, agitando suavemente;
4. Manter os microtubos em banho termorregulado durante 1 hora à 70 °C;
5. Após incubação, adicionar 700 µL de CIA para desproteínizar as amostras;
6. Agitar as amostras por meio de suaves inversões, durante 10 minutos;
7. Centrifugar os microtubos durante 15 minutos à 13.000 rpm.
8. Transferir o sobrenadante para novos tubos e adicionar 55 µL de CTAB 7%;
9. Repetir a etapa de desproteínização;
10. Precipitar o DNA adicionando ao sobrenadante 700 µL de isopropanol absoluto;
11. Manter os tubos durante 2 horas à -20 °C e centrifugá-los em seguida durante 15 minutos à 13.000 rpm;
12. Descartar o sobrenadante e lavar 2x o precipitado em 700 µL de álcool 70%;
13. Descartar todo o volume e deixar os microtubos sob papel filtro em bancada esterilizada até completa evaporação etanoica;
14. Ressuspender o *pellet* em 100 µL de tampão TE;
15. Armazenamento.

6 – Protocolo de Barrero et al. (2008)

a) Lista de reagentes:

- Etanol grau analítico;
- Tampão de Lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + EDTA 50 mM + NaCl 100 mM);
- SDS 1% (comercial, diluir 1 g em 100 ml de água destilada estéril);
- NaCl 4M (diluir 11,71 g de NaCl em 50 mL de água destilada estéril);
- Proteinase K (comercial, diluir 200 mg/mL de água destilada estéril);
- Etanol absoluto (comercial, apenas manter gelado);
- Tampão TE (Tris 10 mM pH 8,0 + EDTA 1 mM);
- RNase (30 µg/mL de água destilada estéril);

b) Etapas do procedimento:

1. Coletar as amostras e colocar em microtubos contendo 550 µL de tampão de lise, 7 µL de SDS 1% e 20 µL de proteinase K.
2. Incubar os tubos imediatamente em banho termorregulado durante 12 horas à 50 °C;
3. Adicionar 600 µL de NaCl 5 M e centrifugar durante 10 minutos à 12.000 rpm;
4. Transferir o sobrenadante para novos microtubos e precipitar o DNA em 700 µL de etanol absoluto gelado;
5. Incubar as amostras durante 2 horas a -20 °C;
6. Centrifugar os microtubos durante 20 minutos à 12.000 rpm;
7. Lavar as amostras com 700 µL de álcool 70%;
8. Descartar o álcool e deixar os microtubos invertidos sob papel toalha em bancada esterilizada até completa evaporação etanoica;
9. Ressuspender as amostras em 80 µL de tampão TE 1x;
10. Tratar o DNA com 3 µL de RNase;
11. Incubar as amostras em banho termorregulado durante 40 min à 37 °C;
12. Estocar o DNA extraído em freezer (-20 °C);

7 – Protocolo de Coppini (2009)

a) Lista de reagentes:

- Etanol grau analítico;
- Tampão STE 1x (NaCl 0,1 M + Tris 10 mM + EDTA 1 mM pH 8,0);
- Tampão de Lise (Tris-Hcl 1 M pH 8,0 + EDTA 0,5 M pH 8,0 + SDS 10% + NaCl 5 M + β-Mercaptoetanol 1%);
- Proteinase K (comercial, diluir 1mg/mL de água destilada estéril);
- CIA (Clorofórmio + Álcool isoamílico, alíquota 1:24 v/v);
- Isopropanol absoluto (comercial, apenas manter gelado);
- Tampão TE (Tris 1 M pH 8,0 + EDTA 0,5 M pH 8,0);

b) Etapas do procedimento:

1. Coletar os tecidos das amostras (20 mg) em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL;
2. Lavar os tecidos 3x com 1 mL de STE gelado, removendo cuidadosamente;

3. Adicionar 500 µL de tampão de lise e em seguida, adicionar 11 µL de Proteinase K;
4. Agitar os microtubos em vórtex e incubar *overnight* a 37 °C ou 30 minutos a 55 °C (nesta etapa foram feitos testes para analisar se haveria diferença em não agitar os microtubos em vórtex, mas revolve-los manualmente com bastão estéril de vidro);
5. Adicionar 500 µL de CIA, agitando manualmente por 45 segundos e centrifugando durante 10 minutos a 14.000 rpm;
6. Transferir 450 µL do sobrenadante para um novo tubo. Adicionar 900 µL de isopropanol absoluto e agitar suavemente.
7. Para completa precipitação, incubar durante 2 horas à 20 °C ou *overnight* à 4 °C;
8. Centrifugar durante 15 minutos à 14.000 rpm. Descartar o sobrenadante cuidadosamente para não desperdiçar o *pellet*. Descansar os tubos invertidos sob papel toalha em bancada estéril;
9. Lavar o *pellet* com 1 mL de álcool 70%, centrifugando durante 5 minutos à 6.000 rpm e remover em seguida o sobrenadante, deixando os tubos secarem novamente conforme etapa anterior;
10. Adicionar 100 µL de TE e incubar durante 2 horas a 37 °C para ressuspender o *pellet*, agitando o tubo levemente de forma manual a cada 15 minutos.
11. Estocar a 4 °C.

Eletroforese em gel de agarose

A integridade do DNA extraído foi verificada por meio de sua aplicação em gel de agarose 0,8% (8 g de agarose em 100 mL de tampão TBE 1x) corado com brometo de etídio (6 µl de diluição 1mg/ml a partir de frasco comercial) e visualizado em luz Ultravioleta (UV). Em cada poço foram pipetadas diferentes concentrações das amostras de DNA, juntamente com 6 µL de tampão de amostra (TA: 4 g de sacarose + 0,025 g de azul de bromofenol, diluídos em 10 mL de água destilada estéril). A eletroforese foi conduzida em cuba de vidro contendo tampão TBE 1x, sob intensidade elétrica de 250 mA e diferença de potencial elétrico de 90 V, durante 150 minutos.

Quantificação do DNA

Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm. Para fazer a leitura no espectrofotômetro, normalmente se utiliza uma diluição em água. Para

estimar a concentração de DNA utiliza-se a seguinte relação: $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ mg DNA}$ dupla-hélice (Regitano, 2001; Sambrook, 2002). As proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Sendo assim, a relação A_{260}/A_{280} fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. Valores inferiores a 1,8 ng/μl indicam contaminação com proteínas.

As quantificações das amostras de DNA foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu Corporation, Japão), através da leitura das amostras nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Esse valor de absorbância quando multiplicado por 50 (1 absorbância a 260 nm corresponde a 50 μg/ml de DNA de fita dupla) e pelo fator de diluição, fornece a concentração de DNA em μg/ml.

A confirmação da pureza do DNA foi verificada pela razão das absorbâncias 260nm e 280nm para leitura do DNA e proteína, respectivamente (Barbosa, 1998). A quantidade de DNA foi determinada pela equação: $[\text{DNA}] = 50 \text{ μg/ml} \times D \times A_{260}$.

Em que:

[DNA] = concentração do DNA (μg/ml)

D = fator de diluição

A_{260} = leitura obtida no comprimento de onda de 260 nm

Amplificação das sequências de DNA por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e condições de PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para fins de conferência da qualidade do DNA extraído, submeteu-se as amostras a reações de amplificação através da reação em cadeia da polimerase e com o uso de marcadores RAPD. Foram realizados diversos testes com variações nas rampas de temperatura de anelamento dos *primers* Oligo da *Operon Technologies*, avaliando diferentes tempos para cada etapa, diferentes ciclos e reagentes, visando a melhor performance. Ao todo, 32 *primers* (oligonucleotídeos decâmetros) pertencentes as séries OPA (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09), OPB (03, 05, 07, 10, 11, 15), OPF (10, 11, 12 e 13), OPW (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10) e OPY (01,02,03) da *Operon Technologies* foram avaliados.

As reações foram realizadas em um volume final de 25 μl, contendo 10-40 ng/μl de DNA genômico, 1,8 μM de cada *primer*, 0,16 Mm de dNTPs, 0,5 μL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA), 1,5 Mm de cloreto de magnésio, Buffer 10x (s/ cloreto) e água destilada. As condições do ciclo de amplificação foram: 92 °C por 4 minutos, 35

ciclos de 92 °C por 40 segundos, 40 °C por 1 minuto e 50 segundos e 72 °C por 2 minutos, com posterior ciclo de extensão final de 72 °C por 5 minutos (Mullis e Faloona, 1987).

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% (1,5 g de agarose e 100 ml de TBE 1x) corado com brometo de etídio (6 µL de diluição 1mg/ml de frasco comercial), sob luz Ultravioleta (UV), com o objetivo de identificar os fragmentos gerados. As amostras que apresentaram bandas de melhor reprodutibilidade foram selecionadas.

Resultados

Variáveis analisadas

A eficiência de cada variável analisada na extração de DNA genômico realizada em cada teste e protocolo foi verificada de acordo com o padrão de bandas observadas na eletroforese e na concentração de DNA das amostras, mensurada por espectrofotometria. A seguir, é feita a descrição detalhada do que foi observado para cada parâmetro. O resumo dos dados obtidos está disponível na Tabela 1, uma matriz qualitativa simplificada representando a influência das variáveis (eficiente, indiferente, prejudicial) no resultado final da extração de DNA em exemplares de *H. commersoni*.

Quanto a conservação de exemplares, o melhor padrão foi observado em exemplares frescos, onde a coleta de tecido-alvo foi realizada logo após eutanásia e já submetido ao processo de extração. Armazenar apenas tecido-alvo, em qualquer das condições de temperatura avaliadas (4 °C, -10 °C e -20 °C), mesmo proveniente de exemplar fresco não resultou em extração de DNA satisfatória. Da mesma forma que a utilização de espécimes inteiros armazenados imediatamente após eutanásia, seja em congelador (-10 °C); freezer (-20 °C) ou em frascos com álcool 70% ou 95% (a 25 °C ou -4°C resultou em DNA de baixa qualidade e quantidade.

O uso de nitrogênio líquido para maceração de tecidos, juntamente com lise química, previamente à adição de tampões não demonstrou interferir no resultado final da extração. A lise do material biológico realizada química e fisicamente pelo tampão de extração resultou em amostras de melhor qualidade com todos os tecidos avaliados para todos os protocolos e tempos, quando comparada à utilização de vórtex ou até mesmo maceração manual com bastão de vidro estéril.

Quanto aos tecidos-alvo (nadadeira dorsal, nadadeira caudal, músculo, brânquias, sangue e tecido ocular), o que demonstrou maior concentração (espectrofotometria) e qualidade (padrão de bandas visualizados em eletroforese) de material genético para os protocolos aplicados foi o tecido ocular. Em relação aos tempos de extração, foi possível obter resultados satisfatórios independente de ter incubado o tecido em tampão de extração durante 1 hora (banho termorregulado à 55°C), 12, 24 ou 36 horas (temperatura ambiente, deixado sob bancada à 25°).

A utilização de RNase não aparentou influenciar na qualidade do DNA obtido. Contudo, a adição de Proteinase K proporcionou melhores resultados para todos os tecidos, tempos e protocolos. Por fim, o armazenamento do DNA extraído foi mais eficiente quando deixado em descanso por 24 horas na bancada após extração, seguido de posterior armazenamento em congelador (-10 °C), o que pode ser confirmado pela quantificação e integridade do material extraído, avaliadas através de espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose (satisfatórias no dia da extração, após 10, 20 e 30 dias).

Tabela 1. Matriz qualitativa representando a influência das variáveis no resultado final da extração de DNA em exemplares de *Hypostomus commersoni*.

Variáveis	Eficiente	Indiferente	Prejudicial
Conservação dos exemplares	Frescos (25 °C)	-	Frescos (-10 °C) Frescos (-20 °C) Frescos (tecido a -20 °C) Álcool 70% (todas as temp.) Álcool 95% (todas as temp.)
Maceração	Lise pelo tampão	Nitrogênio líquido	Em vórtex Lise manual
Tecido-Alvo	Tecido ocular	—	Nadadeira caudal Nadadeira dorsal Músculo Brânquias Sangue
Tempos	1h (55 °C) 12h (25 °C) 24h (25 °C) 36h (25 °C)	—	—
RNase	Sem	—	—
Proteinase K	Com	—	Sem
Armazenamento	Congelador (-10 °C) Freezer (-20 °C)	—	Geladeira (4 °C)
Quantificação	No dia Após 10 dias Após 20 dias Após 30 dias	—	—

* Eficiente: qualidade (eletroforese) e quantidade (espectrofotometria) de DNA satisfatórias; Indiferente: variáveis que não influenciaram em nada os parâmetros avaliados no DNA extraído, sendo consideradas dispensáveis; Prejudiciais: variáveis que causaram degradação das amostras, contaminação ou cuja utilização implicou na não visualização de bandas de DNA após eletroforese em gel.

Protocolo de extração de DNA final

O protocolo que apresentou maior eficiência e foi utilizada na extração final do DNA genômico dos exemplares de *H. commersoni* é descrito a seguir:

a) Lista de reagentes:

- Etanol grau analítico;
- Tampão STE (NaCl 0,1 M + Tris 10 mM + EDTA 1 mM pH 8,0);
- Tampão de Lise (156 ml H₂O destilada estéril + 10 mL Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + 4 mL EDTA 10 mM pH 8,0 + 20 mL SDS 1% + 8 mL NaCl 200 mM);
- β -Mercaptoetanol comercial;
- Proteinase K (comercial, diluir 20 mg/mL de água destilada estéril);
- CIA (Clorofórmio + Álcool isoamílico, alíquota 1:24 v/v);
- Isopropanol absoluto (comercial, apenas manter gelado);
- Tampão TE (Tris 10 mM pH 8,0 + EDTA 1 mM pH 8,0);
- Tampão TBE (Tris-HCl 500 mM + ácido bórico 60 mM + EDTA 83 mM);

b) Etapas do procedimento:

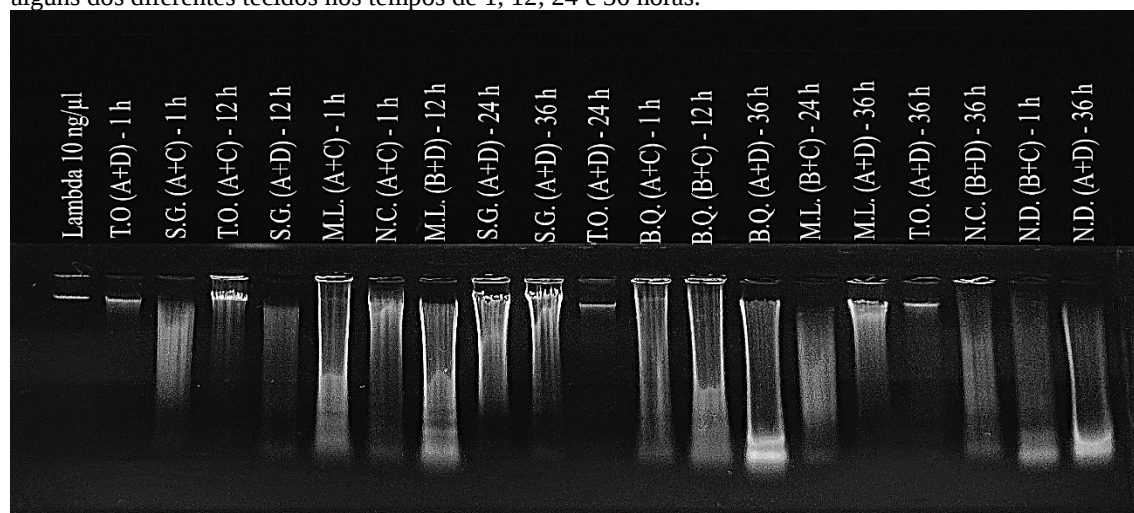
1. Os exemplares foram coletados e imediatamente acondicionados em frascos de vidro contendo água destilada e 25 μ L de óleo essencial de cravo concentrado.
2. Após eutanásia, amostras de tecido ocular de cada exemplar foram coletadas e transferidas para microtubos (1,5 mL) contendo 500 μ L de STE 1x gelado, onde foram ligeiramente submergidas para lavagem;
3. Em seguida, as amostras foram transferidas para microtubos contendo 500 μ L de tampão de lise, 2 μ L de β -Mercaptoetanol e 13 μ L de Proteinase K – adicionados nesta ordem – e incubados à 55 °C por 1 hora;
4. Posteriormente, as amostras passaram por desproteinização em 700 μ L de CIA;
5. Os tubos foram agitados manualmente durante 1 minuto e centrifugados por 10 minutos a 9.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo.
6. As etapas 4 e 5 foram repetidas 3x;

7. A fase aquosa foi recolhida e transferida para um novo tubo, contendo 900 μL de isopropanol absoluto gelado;
8. Os tubos foram gentilmente revolvidos até completa homogeneização;
9. As amostras foram incubadas durante 2 horas em freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), para completa precipitação do DNA.
10. Em seguida, os tubos foram deixados sob bancada por 5 minutos e então centrifugados durante 15 minutos a 9000 rpm e o sobrenadante descartado.
11. O *pellet* resultante passou por duas lavagens com etanol 70% gelado;
12. O volume líquido dos tubos foi cuidadosamente descartado e os mesmos foram alocados em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, para completa secagem e evaporação dos traços etanoicos restantes junto ao *pellet*.
13. O DNA foi ressuspensão em 100 μL de tampão TE e incubado durante 1 hora a temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) sob bancada esterilizada;
14. Após utilização do DNA para eletroforese e quantificação, as amostras finais foram identificadas e armazenadas em congelador ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Eletroforese em gel de agarose

A integridade do DNA extraído foi verificada por meio de eletroforese tanto para análise das variáveis citadas na metodologia e aplicadas em cada protocolo (Figura 1).

Figura 1. Padrão de bandas geradas por eletroforese das extrações de DNA avaliando os tratamentos para alguns dos diferentes tecidos nos tempos de 1, 12, 24 e 36 horas.



*T.O. – tecido ocular; S.G. – sangue; M.L. – músculo; N.C. – nadadeira caudal; B.Q. – brânquias – N.D. – nadadeira dorsal; A – tecidos sem maceração; B – tecidos com agitação em vórtex; C – adição de RNase; D – adição de Proteinase K.

Na figura 1 estão representados os tecidos e tratamentos, de forma a apresentar o panorama geral dos tratamentos e tempos analisados. Alguns tecidos não foram extraídos em quantidade suficiente para serem aplicados no gel em todos os tempos (1, 12, 24 e 36 horas) nesta demonstração, então optou-se por analisa-los nos tempos mais distantes (1 e 36 horas).

Cabe ressaltar que todos os tecidos e variáveis estudadas foram submetidos a eletroforese separadamente durante o período de análises, porém nem todos os géis resultantes obtiveram visualização satisfatória. O resultado apresentado aqui foi o que melhor representou em um único gel a diferença entre e os tratamentos e tecidos. Evidenciando o achado de que o tecido ocular é, em comparação com os demais, o que obteve a melhor extração em termos de qualidade do DNA obtido, em todos os tempos.

Quantificação do DNA

Os valores computados para cada amostra de DNA extraído e cuja verificação preliminar em gel de agarose e eletroforese confirmou a não-degradação, estão disponíveis na Tabela 3. Foi possível observar que os valores para as concentrações de DNA diferiram entre amostras de tecidos distintos e entre amostras do mesmo tecido, mas extraídos a partir de diferentes protocolos.

As médias quantificadas para nadadeira dorsal, nadadeira caudal, músculo, brânquias, sangue e tecido ocular indicaram que o tecido que obteve maior quantidade de material genético pelos métodos utilizados foi o tecido ocular (566 ng/μl de DNA), enquanto que o que apresentou menor eficiência de acordo com os parâmetros avaliados foi nadadeira caudal (139 ng/μl de DNA). Da mesma forma, os valores obtidos pela fórmula e pela razão das absorbâncias de 260/280 nm apresentou variações entre a análise tecido x protocolo e podem ser melhor visualizadas na figura 4.

Tabela 2. Valores comparativos de DNA quantificados para os diferentes protocolos e tecidos.

Protocolo	Quantificação de DNA	Tecido					
		N.C.	N.D.	M.L.	B.Q.	S.G.	T.O.
P1. Doyle e Doyle (1987)	Conc. (ng/μL)	640	170	230	110	365	400
	A₂₆₀/A₂₈₀	1.5	0.8	1.4	1	1.9	1.8
P2. Medrano et al. (1990)	Conc. (ng/μL)	275	85	255	135	375	520
	A₂₆₀/A₂₈₀	1.8	0.6	1.6	1	1.4	1.6
P3. Adaptado de: Whitmore et al. (1992)	Conc. (ng/μL)	130	50	305	125	435	555
	A₂₆₀/A₂₈₀	1	0.7	1.6	1.2	1.6	1.6
P4. Adaptado de: Aljanabi e Martinez (1997)	Conc. (ng/μL)	300	90	120	110	455	565
	A₂₆₀/A₂₈₀	1.1	0.8	1	1	1.7	1.6
P5. Adaptado de: Faleiro et al. (2003)	Conc. (ng/μL)	235	150	205	155	425	605
	A₂₆₀/A₂₈₀	1.1	0.9	1.6	1.1	1.6	1.9
P6. Adaptado de: Barrero et al. (2008)	Conc. (ng/μL)	590	80	355	175	460	555
	A₂₆₀/A₂₈₀	1.1	0.9	1.3	1.2	1.8	1.7
P7. Adaptado de: Coppini (2009)	Conc. (ng/μL)	290	60	60	135	330	620
	A₂₆₀/A₂₈₀	1.5	1.1	0.8	1.1	1.6	1.8
PF. Descrito neste trabalho	Conc. (ng/μL)	890	420	240	210	470	705
	A₂₆₀/A₂₈₀	2	1.5	1.7	1.1	1.9	1.9

*Quantificação das amostras de DNA. Os dados apresentados aqui fazem menção apenas às extrações cuja verificação de integridade já havia sido realizada em eletroforese. Aquelas amostras cuja eletroforese foi insatisfatória (DNA degradado, ausência de bandas; apenas RNA) não foram quantificadas. Abreviações: N.C.: Nadadeira caudal; N.D.: Nadadeira dorsal; M.L.: Músculo; B.Q.; Brânquias; S.G.: Sangue; T.O.: Tecido ocular. Concentração calculada com base na equação $[DNA] = 50 \mu g/ml \times D \times A_{260}$. Valores da razão 260/280nm de absorbância inferiores a 1,8 ng/μl indicam amostra contaminada.

As médias obtidas para a concentração e razão de DNA em termos de protocolo avaliado, indicam que em relação aos valores visualizados na espectrofotometria os resultados apresentaram pequenas variações, com o valor mais baixo sendo observado na extração proveniente do protocolo 3 (267 ng/μL) e o valor mais alto proveniente do protocolo descrito neste trabalho (489 ng/μL). Quanto aos valores da razão de absorbância, observou-se que não houve grande diferenciação. Ou seja, mesmo oscilando quanto aos valores totais quantificados em cada amostra, a razão de DNA/proteínas nos produtos da extração foi de 1.2 ng/μL para o protocolo 4; 1.3 ng/μl

para os protocolos 1, 2, 3, 6 e 7; 1.4 ng/μL para o protocolo 5 e 1.7 ng/μl para o protocolo final, confirmando a maior eficiência deste em comparação com os demais.

Amplificação das sequências de DNA por PCR-RAPD

Dos conjuntos de *primers* testados, 9 (Tabela 4) amplificaram o material genético da espécie avaliada e foram descritos neste trabalho por apresentarem potencial para serem utilizados em estudos avaliando a estrutura genética de amostras de DNA ocular de *H. commersoni* através de marcadores PCR-RAPD.

Tabela 3. Quantidade de bandas de DNA amplificadas para cada *primer*.

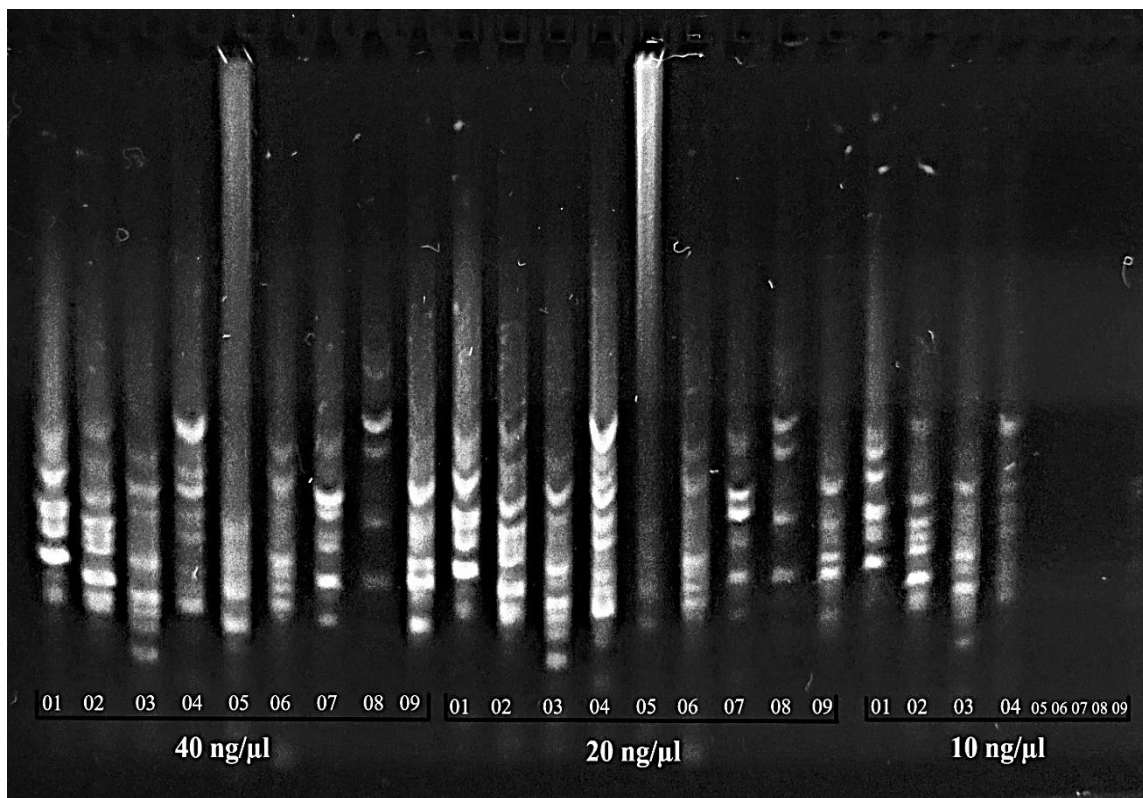
Primer	Sequência 5' - 3'	Quantidade de Bandas		
		40 ng/μl	20 ng/μl	10 ng/μl
OPW-	CTCAGTGTCC	6	6	6
OPW-	ACCCCGCCAA	6	8	8
OPW-	GTCCGGAGTG	4	8	7
OPW-	CAGAAGCGGA	7	9	7
OPW-	GGCGGATAAG	4	4	-
OPW-	AGGCCCGATG	7	8	-
OPW-	CTGGACGTCA	7	8	-
OPW-	GACTGCCTCT	5	5	-
OPW-	GTGACCGAGT	6	6	-

Conforme apresentado na Tabela 4, foi possível observar pequenas diferenças nas contagens de bandas entre as amplificações geradas utilizando as diferentes concentrações de DNA testadas, embora tenha-se utilizado o mesmo conjunto de *primers* na reação. Ainda, pode-se observar que os maiores valores de bandas por *primer* foram obtidos na concentração de 20 ng/μl, seguido da concentração de 40 ng/μl. Por sua vez, a concentração de 10 ng/μl de DNA aparece como a menos indicada para uso nesta reação, de acordo com o que foi encontrado neste trabalho.

Os produtos obtidos pela eletroforese em gel de agarose da reação de PCR-RAPD, bem como o padrão de bandas geradas para o conjunto de *primers* que amplificaram as amostras é apresentado na Figura 5, de acordo com as concentrações de 40, 20 e 10 ng/μl de concentração do DNA dos exemplares. Cabe ressaltar que, conforme é possível visualizar, os *primers* OPW05, OPW06, OPW07, OPW08 e

OPW09 não amplificaram nenhum fragmento na concentração de 10 ng/μl das amostras de DNA, indicando que, de acordo com os dados encontrados neste trabalho, essa concentração de DNA não é a mais recomendada para a amplificação de amostras utilizando este conjunto de *primers* e marcadores RAPD.

Figura 3. Quantidade e padrão de bandas geradas por eletroforese com *primers* RAPD (Kit W – Operon) em DNA de *H. commersoni*.



Discussão

A relevância da avaliação dos diferentes protocolos testados neste trabalho e da descrição do método específico para a espécie é justificada pelo fato de que a capacidade de extrair DNA de alta qualidade é crucial para estudar a genética molecular de um organismo. Além disso, é o primeiro registro de um protocolo de extração genética a partir de amostras desta espécie de cascudo. Estes dados podem facilitar futuras análises de caracterização genética do grupo e até mesmo ser empregados em outras espécies de peixes que apresentem características biológicas e evolutivas similares.

Outro ponto de destaque é o fato de que apresentou-se uma metodologia cuja extração é performada a partir do tecido ocular. O único registro encontrado até a data

acerca de metodologias similares é a de extração de tecidos da córnea, íris e retina humana *Post-mortem* (Wang et al., 2012), bem como de extração de RNA a partir da retina de roedores (Gooding et al., 2018). Apesar da quantidade relativamente limitada deste tecido nos organismos e do fato de requerer eutanásia, a ausência de estudos e a eficiência deste tecido no presente trabalho, indicam a potencialidade do mesmo na extração de DNA de espécies de peixes, especialmente em casos cuja extração é realizada a partir de amostras de coleções científicas tombadas em museus em que os espécimes já foram sacrificados ou, ainda, em casos em que as possibilidades de tecido se esgotam e é necessário um modelo alternativo.

Algumas características que geralmente são aplicáveis em outros estudos de manipulação genética não apresentaram relevância neste trabalho, como por exemplo a utilização de nitrogênio líquido para maceração de tecidos previamente ao isolamento de grandes quantidades de DNA, especialmente em tecidos sólidos, que é um método descrito como eficiente de acordo com alguns autores (Chen et al., 1995; Strassmann et al., 1996; Pinto et al., 2000). Aqui, a maceração com nitrogênio líquido foi avaliada em todos os tecidos, sem apresentar, contudo, fator de influência sobre a qualidade e/ou quantidade de produto final obtido, sendo dispensada em virtude de que a não utilização deste reagente mantém o baixo custo do protocolo, facilitando a aplicação da metodologia aqui desenvolvida em um número maior de laboratórios e grupos de pesquisa.

Outras variáveis, contudo, corroboraram com as informações encontradas na literatura, como o uso de proteinase K para aumentar a eficiência da extração, especialmente em temperaturas de até 55 °C. A digestão com proteinase K tem sido amplamente utilizada para a preparação e purificação de DNA de qualidade para PCR, onde a protease é ativa em uma faixa de pH de 4,3 a 12,0, com atividade ótima em pH 8,0. De acordo com Goldenberger et al. (1995), a proteinase K tem um perfil de temperatura amplo, retendo 80% ou mais de sua atividade a temperaturas de 20-60 °C, tendendo a desnaturar em temperaturas acima de 65 °C (Sweeney e Walker, 1993).

Em contrapartida, a adição de RNase ao tampão de lise, sugerida como muito importante por Wasko et al. (2003) em protocolos de extração de DNA de peixes e empregada na quebra de nadadeiras e escamas, desnaturação de proteínas e degradação de RNA, foi prejudicial à extração performada neste estudo. Para todos os protocolos e variáveis testadas, a RNase pareceu degradar a amostra total, inclusive possíveis

moléculas de DNA presentes, mesmo quando avaliada em diferentes quantidades e em etapas distintas de cada protocolo.

No decorrer do período de testes, todas as etapas que apresentaram resultados promissores foram selecionadas, visando agrupá-las em um protocolo único, considerado o “ideal” para a espécie *H. commersoni*. Desta forma, é possível discutir algumas das características que apresentaram melhor eficiência em termos de DNA isolado. Como, por exemplo, o uso de um tampão de extração com altas concentrações de sal, como o descrito como original neste trabalho, que é indicado por alguns autores como propício à extração bem sucedida, pois o NaCl causa perturbação estrutural de macromoléculas, como as proteínas, interferindo na ligações de hidrogênio, das pontes de Van der Waals e interações hidrofílicas/hidrofóbicas, competindo pelo solvente aquoso da amostra e tais moléculas são desnaturadas; assim, a purificação final da amostra pode ser obtida após a remoção destes compostos celulares insolúveis por meio de processos de centrifugação ou filtração (Goodwin et al., 2011).

Outro fator de importância avaliado no presente trabalho, foi a possibilidade de explorar diferentes tempos de permanência das amostras no tampão de extração, com comprovada eficiência no espectro de 1, 12, 24 e 36 horas para o tecido ocular de *H. commersoni* (figura 2). As principais vantagens deste registro estão no fato de possibilitar a extração do DNA em um único dia (1 hora a 55 °C), incubando as amostras *overnight*, ou, ainda, podendo tardar no retorno ao laboratório com as amostras para extração, em caso de coleta de campo (24 e 36 horas a temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C).

Os valores observados na quantificação por espectrometria, visando a confirmação de pureza após 10, 20 e 30 dias de estocagem do material extraído, apresentaram pequenas variações de valores de concentração, o que pode ter ocorrido em função do preparo de diluição, já que o DNA permanece suspenso no microtubo juntamente com o tampão TE (tampão de estocagem) e no momento de coletar a amostra podem ocorrer diferenças devido à dificuldade em homogeneizar sempre de maneira igual o conteúdo estocado. Ainda assim, a razão de absorbâncias se manteve sempre a mesma, indicando que a qualidade do material obtido não foi alterada pela ação do tempo e pelo método de estocagem. O material armazenado também foi submetido à eletroforese em gel de agarose, para verificar se a qualidade e integridade das amostras se mantinha intacta nestes mesmos tempos, o que foi comprovado em todas as avaliações.

Considerando que a extração do DNA é uma das primeiras etapas para o monitoramento genético de populações, faz-se necessário obter uma quantidade suficiente de DNA de boa qualidade, para que as regiões desejadas sejam localizadas e amplificadas por meio de técnicas de biologia molecular (Marengoni et al., 2006). Além dos fatores anteriormente descritos, cabe ressaltar que todas as metodologias aplicadas foram desenvolvidas com reagentes preparados no próprio Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da URI-Erechim/RS, reduzindo os custos gerados na aplicação do protocolo descrito, uma vez que não requer a utilização de kits comerciais, cujo valor é elevado se comparado a reagentes caseiros.

O protocolo que apresentou maior eficiência constitui um método simples e econômico para a obtenção de DNA de amostras da espécie *H. commersoni*, com possibilidade de aplicação em outras espécies. A utilidade e reprodutibilidade deste protocolo em estudos genéticos baseados em PCR foram confirmadas através da amplificação de amostras utilizando marcadores RAPD. Uma extração de DNA bem sucedida é requisito obrigatório para o desenvolvimento de técnicas como PCR-RAPD e de acordo com Li et al. (1988), sob ótimas condições, uma única célula contém DNA de forma ampla para servir de molde para reações carreadas pela PCR. Os resultados obtidos a partir da amplificação utilizando *primers* do Kit W da *Operon* apresentaram-se promissores na caracterização genética da espécie avaliada neste trabalho.

Considerações Finais

De forma geral, os 7 protocolos escolhidos da literatura e avaliados neste trabalho apresentaram relativa eficiência na extração de DNA de *H. commersoni*, apesar de algumas limitações, quando avaliados os índices de concentração obtidas de cada amostra. Contudo, quando os valores foram submetidos à equação de razão das absorbâncias, fica evidente que o protocolo descrito neste trabalho a partir das variáveis selecionadas em cada metodologia aplicada, foi o que obteve os maiores valores de pureza de DNA nas amostras, com uma média de 1.7 ng/μl de DNA entre os tecidos.

Este estudo contribuiu para a elucidar questões relacionadas a eficiência de diferentes métodos de extração de DNA nesta espécie de peixe, com dados inéditos como a extração a partir de tecido ocular e com a possibilidade de incubação de tecidos em tampão de extração por até 36 horas previamente à continuidade das etapas de

isolamento genético. Além disso, a técnica mostrou ser adequada ao emprego de análises moleculares, como comprovado pela amplificação de amostras obtidas a partir da extração com este protocolo modelo, apontando o potencial dos *primers* OPW (01 à 09) no estudo de exemplares da espécie *H. commersoni*.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências que apoiaram esta pesquisa, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim.

Referências Bibliográficas

- Aljanabi, S.M. e Martinez, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Research*, v. 25, n. 22, p. 4692-3, 1997.
- Allen, G.C.; Flores-Vergara, M.A.; Krasnyanski, S.; Kumar, S.; Thompson, W.F. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols*, v. 1, n. 5, 2006.
- Almeida, F.S.; Sodré, L.M.K.; Contel, E.P.B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetic Molecular Biology*, v. 26, p. 301-305, 2003.
- Baldisserotto, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. *Ciência Rural*, v. 39, n. 1, p. 291-299, 2009.
- Barbosa, M.M. Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Sandra Milach, p. 99-106, 1998.
- Bárfai, R.; Egedi, S.; Yue, G.H.; Kovács, B.; Urbányi, B.; Tamás, G.; Horváth, L.; Orbán, L. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, v. 219, p. 157-167, 2003.
- Barbosa, C.; Nogueira, S.; Gadanho, M.; Chaves, S. DNA extraction: Finding the most suitable method. In *Molecular microbial diagnostic methods: Pathways to implementation for the food and water industries*. Elsevier Inc., p. 135–154, 2015.

- Barrero, N.M.L.; Povh, J.A.; Ribeiro, R.P.; Gomes, P.C.; Jacometo, C.B.; Lopes, T.S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e Investigacion Agraria*, v. 35, n. 1, p. 65-74, 2008.
- Bauer, M. e Patzelt, D. A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains. *Forensic Science International*, v. 136, p. 76-80, 2003.
- Borba, R.S.; Garcia, M.S.; Kovalleski, A.; Oliveira A.C.; Zimmer, P.D.; Branco, J.S.C.; Malone, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. *Neotropical Entomology*, v. 34, p. 565-569, 2005.
- Callejas, C.; Ochando, M.D. Phylogenetic relationships among *Spanish barbus* species (Pisces, Cyprinidae) show by RAPD markers. *Heredity*. v. 89, p. 36-43, 2002.
- Chiachio, M.C.; Oliveira, C.; Montoya-Burgos, J.I. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 49, p. 606-617, 2008.
- Coppini, V.J. Variabilidade genética em *Oligoryzomys nigripes* através de marcadores RAPD e cariotipagem, tendo o rio Uruguai como barreira geográfica. *Dissertação* (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim/RS, 2009.
- Dergam, J.A.; Paiva, S.R.; Schaeffer, C.E.; Godinho, A. L.; Vieira, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in Southern Eastern Brazil. *Genetic Molecular Biology*, v. 25, p. 379-387, 2002.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15, 1987.
- Faleiro, F.G.; Faleiro, A.S.G.; Cordeiro, M.C.R.; Karia, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. *Planaltina: Embrapa Cerrados*, p. 1-6, 2003.
- Garavello, J.C.; Britski, H. A.; Zawadzki, C.H. The cascudos of the genus *Hypostomus* Lacépède (Ostariophysi: Loricariidae) from the rio Iguaçu basin. *Neotropical Ichthyology*, v. 10, n. 2, p. 263-283, 2012.
- Goldenberger, D.; Perschil, I.; Ritzler, M.; Altwegg, M. A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods and Applications*, v. 4, n. 6, p. 368-70, 1995.
- Gooding, S.R.; Chrenek, M.A.; Ferdous, S.; Nickerson, J.M.; Boatright, J.H. Set screw homogenization of murine ocular tissue, including the whole eye. *Molecular Vision*, v. 24, p. 690-699, 2018.
- Goodwin, W.; Linacre, A.; Hadi, S. An introduction to forensic genetics. *John Wiley and Sons*, 2011.

Hilsdorf, A.W.S. Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil. Tese (Doutorado). USP, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2013.

Hollanda Carvalho, P., Lima, F.C.T.; Zawadzki, C.H. Two new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Negro basin in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 8, p. 39-48, 2010.

Kumar, R.; Singh, P.J.; Nagpure, N.S.; Kushwaha, B.; Srivastava, S.K.; Lakra, W.S. A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 45, p. 992-997, 2007.

Lidani, K.C.F.; Lima, J.R.; Torres, R.A.; Gabriel, J.E.; Madeira, H.M.F.; Carneiro, P.C.F. Variabilidade genética de um estoque cativo de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 4, p. 47-56, 2006.

Lopes, C.M.; Almeida, F.S.; Orsi, M.L.; Britto, S.G.C.; Sirol, R.N.; Sodr , L.M.K. Fish passage ladders from Canoas Complex - Paranapanema river: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, v. 2, n. 2, p. 131-138, 2007.

Lucentini, L.; Caporali, S.; Palomba, A.; Lancioni, H.; Panara, F. A comparison of conservative DNA extraction methods from fins and scales of freshwater fish: A useful tool for conservation genetics. *Conservation Genetics*, v. 7, n. 6, p. 1009-1012, 2006.

Marengoni, N.G.; Machado, M.R.F.; Gasparino, E. Extração de DNA genômica em tecidos sólidos de peixes teleosteos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 27, n. 1, p. 99-106, 2006.

Medrano, J.F.; Aasen, E.; Sharrow, L. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, v. 8, n. 1, p. 43, 1990.

Muhammad, H.; Iqbal, Z.; Iqbal, M. U.; Younas, T.; Bashir, Q. An efficient method for DNA isolation from fish fin. *Pak. Journal of Agricultural Science*, v. 53, n. 4, p. 843-850, 2016.

Mullis, K.B. e Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v. 155, p. 335-350, 1987.

Oliveira, A.F.; Carvalho, D. e Rosado, S.C.S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaiba langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 25, p. 331-338, 2002.

Povh, J.A.; Moreira, H.L.M.; Ribeiro, R.P. Estimativa da variabilidade genética em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica RAPD. *Acta Scientiarum, Animal Science*, v. 27, p. 1-10, 2005.

Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J.; Júlio Jr., H.F.; Pavanelli, C.S.; Oliveira, A.V.; Carrer, H.; Carraro, D.M.; Prioli, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetic Molecular Biology*, v. 25, p. 421-430, 2002.

Rantakokko-Jalava, K., e Jalava, J. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 11, p. 4211–4217, 2002.

Reischl, U.; Linde, H.J.; Metz, M.; Leppmeier, B.; Lehn, N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 6, p. 2429–2433, 2000.

Regitano, L.C.A. Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). In: Regitano LCA, Coutinho LL eds. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: *Embrapa Informação Tecnológica*, p. 180-86, 2001.

Sambrook, J.E.; Russel, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, p. 1-2700, 2002.

Srividya, A.R.; Taakore, H.; Tyagi, D.; Majumdar, P.J.; Varthan, V.V.J.; Jenish, P.H.; Krunal. L.V. Isolation, quantification and purity estimation of DNA from various sources. *Bull. Pharm. Res.*, v. 1, p. 4-9, 2011.

Sweeney, P.J. and Walker, J.M. Enzymes of molecular biology. In: *Methods in Molecular Biology*, M.M. Burrell, ed., Humana Press, v. 16, n. 305, 1993.

Tongeren, S. P., Degener, J. E., & Harmsen, H. J. M. Comparison of three rapid and easy bacterial DNA extraction methods for use with quantitative real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 30, n. 9, p. 1053–1061, 2011.

Varshney, R.K.; Graner, A.; Sorrels, M.E. Genetic microsatellite markers in plants: feature and applications. *Trends in Biotechnology*, v.23, p. 48-55, 2005.

Wang, T.Y.; Wang, L.; Zhang, J.H; Dong, W.H. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genetic Molecular Research*, v. 10, n. 1, p. 519-525, 2011.

Wang, J.C.C.; Wang, A.; Gao, J.; Cao, S.; Samad, I.; Zhang, D.; Ritland, C.; Chui, J.Z.; Matsubara, J.A. Technical brief: Isolation of total DNA from *postmortem* human eye tissues and quality comparison between iris and retina. *Molecular Vision*, v. 18, p. 3049-3056, 2012.

Ward, R.D.; Hanner, R.; Hebert, P.D.N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, v. 74, n. 2, p. 329-356, 2009.

Wasko, A.P.; Martin, C.; Oliveira, C.; Forresti, F. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*, v. 138, p. 161-165, 2003.

Weber, C. Subfamily Hypostominae, In Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America, edited by R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris Jr. *EDIPUCRS*, p. 351–372, 2003.

Whitmore, D.H.; Thai, T.H.; Craft, M. Gene Amplification Permits Minimally Invasive Analysis of Fish Mitochondrial DNA. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 12, n. 2, p. 170-177, 1992.

Williams, J.G.K.; Kubelik, A.; Livak, J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

Zawadzki, C.H.; Weber, C.; Pavanelli, C.S. A new dark saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper Paraguay river basin. *Neotropical Ichthyology*, v. 8, p 719-725, 2010.

4. CONCLUSÃO GERAL

Nesta dissertação revisou-se o uso de marcadores genéticos e moleculares em trabalhos avaliando o gênero de peixes *Hypostomus* e analisou-se a eficiência de diferentes protocolos de extração de DNA em exemplares de *Hypostomus commersoni*. No primeiro capítulo, formou-se uma base de dados composta a partir de pesquisa bibliográfica na plataforma científica *ScienceDirect* (Elsevier), com a busca das palavras-chave “*Hypostomus*” e “*genetic*”, a qual retornou 70 artigos e do qual se fez uso de 49, que condiziam com os objetivos pretendidos ao fazer uso de marcadores genéticos clássicos ou moleculares e que eram aplicados ao gênero em estudo, sendo excluídos àqueles cujo objetivo era o de classificar exemplares à nível taxonômico, através de marcadores morfológicos, uma vez que já estão disponíveis na literatura inúmeros trabalhos revisando e discutindo as questões de classificação do grupo.

A base de dados formada foi composta por trabalhos que avaliaram espécimes do gênero *Hypostomus* através de metodologias clássicas, representadas por marcadores genéticos citológicos (25), enzimáticos (9) e bioquímicos (2) e ainda por marcadores desenvolvidos após o surgimento da técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR), sendo eles os marcadores RAPD (1), microssatélites (2) e envolvendo técnicas filogenéticas e filogeográficas (9). Além do panorama geral e descrição das principais características, vantagens e desvantagens de cada um desses marcadores.

Discutiu-se também outras classes de marcadores para as quais não foram encontrados trabalhos avaliando exemplares de *Hypostomus*, mas que já foram aplicados em outros estudos envolvendo espécies de peixes ou ainda, que poderiam ser utilizados no estudo das mesmas em função de sua potencial aplicabilidade. Por fim, discutiu-se as perspectivas futuras na área de genética de peixes, envolvendo principalmente tecnologias de sequenciamento de amostras e de edição genômica.

Cada uma das tecnologias de marcadores moleculares tem suas vantagens e limitações. A escolha do marcador molecular a ser utilizada em determinado trabalho, depende estritamente das questões biológicas que são abordadas, da quantidade de DNA disponível para o experimento, dos conhecimentos técnicos do investigador, das considerações monetárias e do equipamento disponível no laboratório. Além disso, uma série de outros fatores relacionados com o organismo alvo e a complexidade do seu genoma também desempenham um papel importante na seleção do marcador ou tecnologia que melhor se adeque a responder as questões pretendidas.

No segundo capítulo deste trabalho, avaliou-se a eficiência de sete protocolos distintos na extração de DNA genômico em exemplares de *H. commersoni*, espécie relevante comercial e ecologicamente e sem descrição de protocolo específico até a presente data. As metodologias escolhidas já haviam sido utilizadas em outras espécies de peixes ou as variáveis descritas no trabalho original eram semelhantes àquelas que pretendia-se avaliar neste estudo. Ainda, foi testado um oitavo protocolo, desenvolvido a partir de outras metodologias e proposto neste trabalho. Para cada um dos protocolos, foram testadas as condições originais descritas pelos autores, além de diferentes tratamentos e uso de distintos fragmentos teciduais.

Os resultados indicam que o uso de diferentes tecidos com o mesmo protocolo de extração apresenta diferenciação em termos de quantidade e qualidade de DNA. Da mesma forma, extrair o DNA do mesmo modelo tecidual com diferentes protocolos resulta em variações na amostragem final de material genético obtido. Pôde-se destacar alguns parâmetros relevantes para a espécie *H. commersoni*, como o fato de que é possível obter DNA a partir de tecido ocular e que o mesmo apresenta potencial para permanecer em tampão de extração por até 36 horas previamente à continuidade do processo de extração, o que é relevante em condições onde as amostras não podem ser imediatamente submetidas ao processo de isolamento genético em laboratório.

Ainda, observou-se que o procedimento apresentou maior sucesso quando as amostras não foram maceradas de forma mecânica na etapa inicial e cujos tecidos foram retirados de exemplares frescos. Concluiu-se, por fim, que o protocolo descrito neste trabalho – e que reúne etapas de todas as metodologias avaliadas – foi o que demonstrou maior eficiência na extração de DNA da espécie estudada. Para fins de conferência da qualidade do material obtido e da aplicabilidade do DNA extraído em análises genéticas, as amostras foram submetidas à amplificação com diferentes *primers* de PCR-RAPD, sendo possível quantificar e verificar a integridade de cada amostra em gel de agarose e amplifica-las com um conjunto de *primers* OPW da Operon Technologies.

Os resultados encontrados nos dois capítulos desta dissertação são os primeiros registros de que se tem conhecimento até a presente data, evidenciando a relevância deste trabalho para a área. A revisão do uso de marcadores genéticos para o gênero *Hypostomus* e a avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para a espécie *H. commersoni*, com descrição de um protocolo específico e dos demais parâmetros avaliados, trazem dados inéditos e podem contribuir para a caracterização de espécies de cascudos em estudos futuros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (INTRODUÇÃO GERAL)

Agostinho, A.A.; Hahn, N.S.; Agostinho, C.S. Ciclo reprodutivo e primeira maturação de fêmeas de *Hypostomus commersoni* (VALENCIENNES, 1840) (Siluriformes, Loricariidae) no reservatório Capivari-Cachoeira, PR. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 51, n. 1, p. 31-37, 1991.

Agostinho, A.A.; Matsuura, Y.; Okada, E.K.; Nakatani, K. The catfish, *Rhinelepis aspera* (Teleostei; Loricariidae) in the Guaíra region of the Paraná river: an example of population estimation from catch-effort and tagging data when emigration and immigration are high. *Fish Research*, v. 23, n. 3-4, p. 333-44, 1995.

Armbruster, J.W. The species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa*, v. 249, p. 1-60, 2003.

Armbruster, J.W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armored catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrini. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 141, n. 1, p. 1-80, 2004.

Awise, J.C. Molecular Markers, Natural History and Evolution. 2nd ed. *Sinauer Associates*, 684 p., 2004.

Belfiore, N.M. e Anderson, S.L. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: A review. *Mutation Research*, v. 489, p. 97-122, 2001.

Bickham, J.W.; Sandhu, S.; Hebert, P.D.N.; Chickhi, L.; Athwal, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: Implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research*, v. 463, p. 33-51, 2000.

Buck, S. e Sazima, I. An assemblage of mailed catfishes (Loricariidae) in southeastern Brazil: distribution, activity, and feeding. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, v. 6, p. 325-332, 1995.

Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S. Introdução. In Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil (P.A. Buckup, N.A. Menezes e M.S. Ghazzi, eds.). *Museu Nacional*, p. 11-14, 2007.

Burgess WE. An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes. *Neptune: TFH publications Inc*; 1989.

Bussolaro, D.; Filipak Neto, F.; Oliveira Ribeiro, C.A. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. *Toxicology In Vitro*, v. 24, p. 1491-1497, 2010.

Bussolaro, D.; Filipak Neto, F.; Glinski, A.; Roche, H.; Guiloski, I.C.; Mela, M.; Silva de Assise, H.C.; Oliveira Ribeiro, C.A. Bioaccumulation and related effects of PCBs and organochlorinated pesticides in freshwater fish *Hypostomus commersoni*. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 14, p. 2154, 2012.

Casatti, L. Alimentação dos peixes em um riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do alto Rio Paraná, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, v. 2, p. 1-14, 2002.

Cardoso, Y.P.; Almirón, A.; Casciotta, J.; Alchino, D.; Lizarralde, M.S.; Montoya-Burgos, J.I. Origin of species diversity in the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) inhabiting the Paraná river basin, with the description of a new species. *Zootaxa*, v. 3453, p. 69–83, 2012.

Chiachio, M.C.; Oliveira, C.; Montoya-Burgos, J.I. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 49, p. 606-617, 2008.

Chistiakov, D.A.; Hellemans, B.; Volckaert, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, v. 255, p. 1-29, 2006.

Cordiviola de Yuan, E. e Hassan, C.P. Fish population in the Paraná River: lentic environments of Diamante and San Pedro areas (Argentine Republic). *Hydrobiologia*, v. 127, p. 213–218, 1985.

Dobzhansky, T. Genetics and the Origin of Species. *Columbia University Press, Biological Series*, v. 11, n. 3, 1951.

Frankel, O.H. e Soule, M.E. Conservation and Evolution. *Cambridge University press*, 1981.

Froese, R. e Pauly, D. World Wide Web electronic publication. *FishBase*, 2018a. Disponível em: <https://www.fishbase.org/Report/FishesUsedByHumans.php>. Acesso em 09 dez 2018.

Froese, R. e Pauly, D. World Wide Web electronic publication. *FishBase*, 2018b. Disponível em: https://www.fishbase.org/Country/CountryChecklist.php?what=list&trpp=50&c_code=076&csub_code=&cpresence=present&sortby=alpha2&vhabitat=fresh. Acesso em 09 dez 2018.

Froese, R. e Pauly, D. World Wide Web electronic publication. *FishBase*, 2018c. Disponível em: <https://www.fishbase.org/Nomenclature/ScientificNameSearchList.php>. Acesso em: 06 dez 2018.

Froese, R. e Pauly, D. *Hypostomus commersoni* Valenciennes, 1836. *FishBase*, 2018d. <http://www.fishbase.org/summary/Hypostomus-commersoni.html>. Acesso em dez 2018.

Futuyma, D.J. Biologia Evolutiva. *Sociedade Brasileira de Genética*, 2a edição, 1992.

Gallardo, B.; Clavero, M.; Sánchez, M.I.; Vilà, M. Global ecological impacts of invasive species in aquatic ecosystems. *Global Change Biology*, v. 22, p. 151–163, 2016.

Garavello, J.C. e Garavello, J.P. Spatial distribution and interaction of four species of the catfish genus *Hypostomus* Lacépède with bottom of Rio São Francisco, Canindé do

São Francisco, Sergipe, Brazil (Pisces, Loricariidae, Hypostominae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 64, n. 3, p. 103-141, 2004.

Garcia, A.M.; Raseira, M.B.; Vieira, J.P.; Winemiller, K.O.; Grimm, A.M. Spatiotemporal variation in shallow-water freshwater fish distribution and abundance in large subtropical coastal lagoon. *Environmental Biology of Fishes*, v. 68, p. 215–228, 2003.

Giuliano-Caetano, L. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae). *PhD Thesis*. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, 1998.

Gneri, F.S.; e Angelescu, V. La nutrición de los peces iliófagos en relación con el metabolismo general del ambiente acuático. *Revista de la Institución Nacional de Inversiones en Ciencias Naturales*, v. 2, n. 1, p. 1-44, 1951.

Gonçalves, A.P. Ecologia e etnoecologia de *Hypancistrus zebra* (Siluriformes: Loricariidae) no Rio Xingu, Amazônia Brasileira. *Dissertação (Mestrado)* - Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Belém, 137 p., 2011.

Gribel, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e conservação dos recursos naturais. *Humanidades*, v. 48, p. 110-114, 2001.

Harris, H. Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 164, p. 298-310, 1966.

Hirschmann, A.; Fialho, C.B.; Grillo, H.C.Z. Reprodução de *Hemiancistrus punctulatus* Cardoso & Malabarba, 1999 (Siluriformes: Loricariidae) no sistema da laguna dos Patos: uma espécie de ambiente lótico frente às alterações provocadas por represamentos. *Neotropical Biology and Conservation*, v. 6, n. 3, p. 250-257, 2011.

Hollanda Carvalho, P., Lima, F.C.T.; Zawadzki, C.H. Two new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Negro basin in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 8, p. 39-48, 2010.

Hughes, A.R.; Stachowicz, J.J. Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 8998–9002, 2004.

Iwama, G.K.; McGeer, J.C.; Bernier, N.J. The effects of stocks and rearing history on the stress response in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *ICES Journal of Marine Science Symposium*, v. 194, p. 67-83, 1992.

Jerep, F.C.; Shibatta, O.A.; Zawadzki, C.H. A new species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the upper river Paraná basin, Southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 5, n. 4, p. 435-442, 2007.

Jini, D. Genotypic Analysis of *Etroplus maculatus* in Western Ghat Rivers of India using Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *Journal of Genetics and Genetic Engineering*, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2017.

Knoll, L.B.; McIntyre, P.B.; Vanni, M.J.; Flecker, A.S. Feedbacks of consumer nutrient recycling on producer biomass and stoichiometry: separating direct and indirect effects. *Oikos*, v. 118, p. 1732–1742, 2009.

Linn, S. e Arber, W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage ϕ replicative form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 59, p. 1300-1306, 1988.

López, H.L. e Miquelarena, A. Los Hypostominae (Pisces: Loricariidae) de Argentina. Profadu (CONICET). *Programa de Fauna de Agua Dulce Museo de La Plata*, v. 40, n. 2, 1991.

López, H. L.; Miquelarena, A. M.; Ponte Gómez, J. Biodiversidad y distribución de la ictiofauna Mesopotámica. *Miscelánea*, v. 14, p. 311–354, 2005.

Lujan, N.K.; German, D.P.; Winemiller, K.O. Do wood grazing fishes partition their niche? Morphological and isotopic evidence for trophic segregation in Neotropical Loricariidae. *Functional Ecology*, v. 25, p. 1327–1338, 2011.

Lujan, N.K.; Winemiller, K.O.; Armbruster, J.W. Trophic diversity in the evolution and community assembly of loricariid catfishes. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, p. 124, 2012.

Maldonado-Ocampo, J.A.; Villa-Navarro, F.A.; Ortega-Lara, A.; Prada-Pedrerros, S.; Villa, U.J.; Claro, A.; Usma, J.S.; Lara, T.S.R.; Salazar, W.C.; Barrios, J.F.C.; Garcia-Melo, J.E. Peces del rio Atrato, zona hidrogeográfica del caribe, Colombia. *Biota Colombiana*, v. 7, n. 1, p. 143-154, 2006.

Mayr, E. The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance. *The Belknap Press of Harvard University Press Cambridge*, 991 p., 1982.

Meselson, M. e Yuan, R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*, v. 217, p. 1110-1114, 1968.

Montoya-Burgos, J.I.; Muller, S.; Weber, C.; Pawlowski, J. Phylogenetic relationships between Hypostominae and Ancistrini (Siluroidea, Loricariidae): firsts results from mitochondrial 12s and 16s gene sequences. *Revue Suisse Zoologie*, v. 104, p. 185-198, 1997.

Montoya-Burgos, J.I.; Muller, S.; Weber, C.; Pawlowski, J. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. p. 363-374. In L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena and C.A.S. Lucena (eds.). Phylogeny and classification of neotropical fishes. *EDIPUCRS*, 603 p., 1998.

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

Morin, P.A.; Luikart, G.; Wayne, R.K. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 19, n. 20, p. 277-280, 2004.

MPA, 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil, 2010*, p. 99. <Disponível em: https://http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf> Acesso em: 06 dez. 2018.

Mullis, K. e Faloona, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v. 55, p. 335-350, 1987.

Najiah, K. e Gade, D. Preliminary study on genetic distance of vibrio parahemolytic isolate from disease fish and shrimps Brackish water pond via RAPD. *Asian fisheries Science.*, v. 16, p. 299-301, 2003.

Narum, S.R., Banks, M.A. Beacham, T. D.; Bellinger, M.R.; Campbell, M.R.; Dekoning, J.E; Liz, A.; Guthrie, C.M.; Kozfkay, C.; Miller, K.M.; Moran, P.; Phillips, R.; Seeb, L.W.; Smith, C.T.; Warheit, K.; Young, S.F.; Garza, J.C. Differentiating salmon populations at broad and fine geographical scales with microsatellites and single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*, v. 17, p. 3464–3477, 2008.

Nelson, J.S. Fishes of the World. *Jhon Wiley & Sons*, v. 4, 601 p., 2006.

Nilsson, C.; Reidy, C.A.; Dynesius, M.; Revenga, C. Fragmentation and flow regulation of the world's large river systems. *Science*, v. 308, p. 405–408, 2005.

O'Brien, S.J. Molecular genome mapping: lessons and prospects. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 1, n. 1, p. 105-111, 1991.

Ormerod, S. J. Current issue with fish and fisheries: editor's overview and introduction. *Journal of Applied Biology*, v. 40, n. 2, p. 204-213, 2003.

Picard, D.J. e Schulte, P.M. Variation in gene expression in response to stress in two populations of *Fundulus heteroclitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 137, p. 205-216, 2004.

Piccolo, J.J. Conservation genomics: Coming to a salmonid near you. *Journal of Fish Biology*, v. 89, p. 2735–2740, 2016.

Prang, G. An industry analysis of the freshwater ornamental fishery with particular reference to the supply of Brazilian freshwater ornamentals to the UK market. *Uakari*, v. 3, p. 7–51, 2007.

Pottinger, T.G. e Carrick, TR. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. *General and Comparative Endocrinology*, v. 116, p. 122-132, 1999.

Reis, R.E.; Kullander, S.O. e Ferraris-Jr, C.F. *Check list of the freshwater fishes of South and Central América*. Porto Alegre, Editora PUCRS, 729p, 2003.

Rocha, C.B.; Fernandes, J.M.; Tavares, R.A.; Piedras, S.R.N.; Pouey, J. Dietary protein requirement for armored catfish fingerlings (*Hypostomus commersoni*, Valenciennes, 1836). *Brazilian Journal of Aquatic of Science Technology*, v. 19, n. 2, 2015.

Sagan C. The Dragons of Eden. *Ballatine Books*, p. 190–200, 1977.

Saiki, R.K.; Scharf, S.J.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis of diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

Schaefer, S.A. Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogenetic analysis of the Loricariidae subfamilies (Pisces, Siluroidea). *Contributions in Science, Natural History Museum Los Angeles*, v. 394, p. 1-31, 1987.

Scheid, N.M.J.; Ferrari, J.; Delizoicov, D. A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA. *Ciência e educação*, v. 11, n. 2, p. 223-233, 2005.

Solé-Cava, A.J. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Mاتيoli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução. Holos*, p 172-192, 2001.

Suzuki, H.I.; Agostinho, A.A.; Winemiller, K.O. Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in loricariid catfishes of the Paraná River, Brazil. *Journal of Fish Biology*, v. 57, p. 791-807, 2000.

Takahashi, E.L.H.; Goitein, R.; Nakaghi, L.S.O. Maturidade do ovário no cascudo *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae). *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 30, n. 1, p. 107-112, 2008.

Väli, Ü.; Dombrovski, V.; Treinys, R.; Bergmanis, U.; Daroczi, S.J.; Dravecky, M.; Ivanovski, V.; Lontkowski, J.; Maciorowski, G.; Meyburg, B.U.; Mizera, T.; Zeitz, R.; Ellegren, H. Widespread hybridization between the Greater Spotted Eagle *Aquila clanga* and the Lesser Spotted Eagle *A. pomarina* (Aves: Accipitriformes) in Europe Running head: hybridization of spotted eagles in Europe. *Biological Journal of Linnean Society*, v. 100, p. 725–736, 2010.

Vanni, M.J.; Flecker, A.S.; Hood, J.M.; Headworth, J.L. Stoichiometry of nutrient recycling by vertebrates in a tropical stream: linking species identity and ecosystem processes. *Ecology Letters*, v. 5, p. 285–293, 2002.

Vari, R.P. The Curimatidae, a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes): distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. In P. E. Vanzolini & W. R. Heyer (Eds), *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (pp. 343-377). *Academia Brasileira de Ciências*, 1988.

Wang, S.; Hard, J.H.; Utter, F. Genetic variation and fitness in salmonids. *Conservation Genetics*, v. 3, p. 321-333, 2002.

Weber, C. Loricariidae - Hypostominae (armored catfishes), in R. E. Reis, S. O. Kullander, and C. J. Ferraris, Jr., editors. Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. *EDIPUCRS*, p. 351–372, 2003.

Zaniboni Filho, E.; Meurer, S.; Shibatta, O.A.; de Oliveira Nuñez, A.P. Catálogo ilustrado de peixes do alto Rio Uruguai. *Tractebel Energia*, 2004.

Zawadzki, C.H.; Weber, C.; Pavanelli, C.S. A new dark saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper Paraguay river basin. *Neotropical Ichthyology*, v. 8, p 719-725, 2010.