



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA



VICTÓRIA JOANA DA SILVA MÜLLER

**Diversidade críptica em *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae),
de tributários das bacias do Alto Rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e
Araguaia**

CUIABÁ, MATO GROSSO
2023

VICTÓRIA JOANA DA SILVA MÜLLER

**Diversidade críptica em *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae),
de tributários das bacias do Alto Rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e
Araguaia**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Zoologia da
Universidade Federal de Mato Grosso,
Instituto de Biociências como parte dos
requisitos necessários para a obtenção
do título de Mestre em Zoologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela
Cristina Ferreira

**CUIABÁ, MATO GROSSO
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

M958d Müller, Victória Joana da Silva.

Diversidade críptica em *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae), de tributários das bacias do Alto Rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia [recurso eletrônico] / Victória Joana da Silva Müller. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 70 f., il. color., pdf). -- 2023.

Orientadora: Daniela Cristina Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Cuiabá, 2023.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “Diversidade críptica em *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae), de tributários das bacias do Alto Rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia”

AUTOR (A): MESTRANDO (A) **Victória Joana da Silva Müller**

Dissertação defendida e aprovada em **30 de agosto de 2023**.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

- 1. Profª. Dra. Pábila Stephanie de Souza Arruda** (1ª titular/examinadora externa)
INSTITUIÇÃO: IB – Universidade Federal de Mato Grosso
- 2. Prof. Dr. Luiz Fernando Caserta Tencatt** (2º titular/examinador externo)
INSTITUIÇÃO: IB – Universidade Federal de Mato Grosso
- 3. Prof. Dr. Fábio Fernandes Roxo** (3º titular/examinador externo)
INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP;
- 4. Prof. Dr. Paulo Cesar Venere** (1º - Examinador Suplente)
INSTITUIÇÃO: PPGZOO – Universidade Federal de Mato Grosso
- 5. Profª. Dra. Marielle Cristina Schneider** (2º - Examinador Suplente)
INSTITUIÇÃO: PPGZOO – Universidade Federal de Mato Grosso

Cuiabá, 30 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **DANIELA CRISTINA FERREIRA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 06/09/2023, às 19:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Fernando Caserta Tencatt, Usuário Externo**, em 11/09/2023, às 09:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pábila Stephanie de Souza Arruda, Usuário Externo**, em 14/09/2023, às 09:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Dedico esta dissertação ao meu avô materno Odemir (in memoriam). A minha avó materna Mary e a minha mãe Jucinéia, por todo carinho e amparo nesse período de mestrado. E a todos os que de alguma forma contribuíram para que esta dissertação chegasse até aqui. Muito obrigada!

“Se você consegue pensar, escrever e falar, você é absolutamente fada.” (Jordan Peterson)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Bom Deus por cuidar de cada mínimo detalhe dessa dissertação, por me dar a graça de vencer cada dificuldade que foi surgindo, seja ela pessoal ou acadêmica e por sempre estar junto de mim em todos os momentos. A Virgem Maria, minha Senhora e Mãe, não tenho palavras para agradecer, mãe melhor que a Senhora não existe. Ao meu querido São José, muito obrigada, por ser o pulso firme e amoroso de um pai que muitas vezes eu precisei. Ao meu Anjo da Guarda, gratidão, por toda paciência para comigo especialmente nos momentos de estresse e por toda inspiração ao longo desses dois anos e meio. E a todos os meus amigos e amigas do céu Santos e Santas de Deus (especialmente: São Padre Pio de Pietrelcina, Beato Carlo Acutis, Santa Rita de Cássia, Santa Teresinha do Menino Jesus e da Sagrada Face, Beata Alexandrina de Balasar, São João Bosco, Santa Faustina Kowalska, São João Paulo II, Santos Francisco e Jacinta Marto, Santa Teresa de Jesus, Santa Dulce dos Pobres, Beata Inhá Chica, São Francisco de Assis, Santa Clara de Assis, Santo Tomás de Aquino, Santo Antônio, São Miguel Arcanjo, São Gabriel Arcanjo, São Rafael Arcanjo) e a todos os Santos e Santas que intercederam por mim, sem vocês eu não teria conseguido.

Muito obrigada a Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) por me abrigar desde 2016 quando ingressei na faculdade de Biologia, e por fornecer o curso de graduação e pós-graduação que contribui e continuará contribuindo para a minha formação profissional. Ao Instituto de Biociências (IB), pelas instalações nas quais a minha dissertação e todo o meu processo de formação acadêmica se desenvolveu.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia (PPGZOO) agradeço pelas orientações e por me fornecer uma excelente formação no âmbito científico/zoológico. Gratidão a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa extremamente importante para mim neste período. Assim como, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU), Instituto Nacional de Pesquisas do Pantanal (INPP) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) por apoiar e contribuir com as pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Citogenética e Genética Animal (LabGen).

A minha querida orientadora Professora Doutora Daniela Cristina Ferreira os meus mais sinceros agradecimentos, por ter me aceito como sua aluna de pós-graduação e por toda a incansável dedicação para comigo e para com a dissertação. Agradeço por toda orientação, conselhos, sugestões e especialmente correções que foram fundamentais

não só para o crescimento da dissertação, mas para o meu crescimento pessoal também. De verdade não tenho palavras para agradecer a senhora, muito obrigada.

Agradeço aos coordenadores do LabGen Professora Dra. Daniela Cristina Ferreira, Professor Dr. Liano Centofante e Professor Dr. Paulo César Venere pelas sugestões de melhoria para o mestrado, por toda a contribuição na minha formação acadêmica, por terem me acolhido e por terem cedido o LabGen para que eu pudesse desenvolver o meu projeto de mestrado utilizando a Genética Molecular como ferramenta.

Agradeço ao professor Dr. Hugmar Pains da Silva por toda contribuição na coleta e identificação morfológica dos *Hypostomus*. Muito obrigada!

Agradeço imensamente a toda equipe LabGen que se tornaram muito mais que colegas de trabalho, mas sim verdadeiros amigos, muito obrigada a Gisele, Pábila, Taina, Rita, Silvia, Professora Dra. Marielle, Geórgia, Dayane, Jaiane, Nathália e Mariana. Agradeço profundamente a Taina Barbosa de Souza em especial, e a Profa. Dra. Carolina de Barros Machado da Silva da Universidade Federal do Sul da Bahia que me ajudaram na parte das análises genéticas que quase sempre são desafiadoras, sem vocês eu não teria conseguido.

Ao corpo docente do PPGZOO agradeço imensamente por todas as aulas, formações, instruções e correções. Mais especialmente agradeço aos professores com os quais eu tive aula, muito obrigada, professores doutores Amazonas Chagas Júnior, Christine Steiner de São Bernardo, Daniela Cristina Ferreira, Fabrício Maia Chaves e colaboradores, Felipe Franco Curcio, Marielle Cristina Schneider, Marinêz Isaac Marques, Fernando Vaz de Mello, Peterson Demite, Rogério Rossi, Vítor Piacentini. Agradeço ao senhor Odenilson S. dos Santos técnico Administrativo em Educação do PPGZOO por toda ajuda com a parte burocrática do mestrado, o senhor foi incrível.

Agradeço profundamente a dona Maria, dona Miguelina e dona Paula colaboradoras da limpeza que nos proporcionam ambientes de trabalho limpos, e por serem pessoas maravilhosas. Ao pessoal da Secretária de Tecnologia da Informação (STI) em especial o senhor Walter Barbosa, muito obrigada, especialmente no período de Estágio em Docência em que mais precisei utilizar a plataforma AVA. A equipe estava sempre pronta e disposta em me auxiliar na resolução de problemas técnicos com o Sistema Informacional da UFMT.

Agradeço do fundo do coração a minha família tios Junilson e Julierme, tia bia, madrinha Marilu, padrinho Benedito, tia Maria (In memorian), tia Nieta, assim como,

todos os meus primos e primas por todo o incentivo para que eu fizesse o mestrado. Agradeço especialmente a minha avó Mary e minha mãe Jucinéia companheiras inseparáveis, por sempre cuidarem de mim, além de toda paciência que tiveram nesse período em que eu precisava estar imersa nos estudos.

A minhas grande amiga desde a época da graduação Nath, muito obrigada, por ser esta grande amiga. A minha família do coração mãe Joelma, pai Jorge, vovó Maria e Emilly agradeço por estarem em minha vida em quase todos os momentos. Aos meus amigos do Movimento Sacerdotal Mariano e do Apostolado do Preciosíssimo Sangue muito obrigada: Márcia, Zeca, Albino, Alcemira, Mirelle, Francelli, Maurina, dona Marileide, dona Adevair, Seminarista Valdene, padre Elilzo e todos os demais membros. Sei que palavras de agradecimento não serão suficientes para expressar minha gratidão por cada pessoa citada e por cada acontecimento, mas saibam que cada um de vocês sempre irão estar em minhas lembranças.

RESUMO

Hypostomus (Loricariidae, Hypostominae) é um grupo diverso em número de espécies e, apesar de ser considerado monofilético, a relação entre os indivíduos que o compõe é complexa. Muitos dos seus representantes apresentam similaridades morfológicas e uma alta variabilidade genética, sugerindo a existência de complexos de espécies dentro do gênero. Além disso, a ocorrência de plasticidade fenotípica já foi observada em algumas espécies, o que dificulta ainda mais a resolução de incertezas taxonômicas dentro do grupo. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo analisar, com base no DNA *barcoding*, exemplares de *Hypostomus* coletados em algumas regiões das bacias hidrográficas do Alto Rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia, fornecendo subsídios para entender qual é a real diversidade dos representantes desse gênero. O conjunto de dados analisado é composto por 57 espécimes, identificadas *a priori* em 15 espécies com base em caracteres morfológicos. Todas as amostras foram submetidas às técnicas moleculares de extração de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento. Posteriormente, foram realizados os métodos de análises genéticas para a delimitação das espécies por distância genética (ASAP, OT) e por coalescência (PTP e GMYC). O alinhamento final de todas as sequências gerou fragmentos de 614 pares de base. Os resultados revelaram que, das 15 espécies classificadas *a priori* com base morfológica, foram identificadas de 13 a 16 MOTUs, a depender do método de delimitação utilizado, sendo evidenciadas 13 MOTUs pelo ASAP, 16 pelo Ótimo *Threshold*, 14 MOTUs pelo PTP e 15 MOTUs pelo GMYC. Após uma análise consenso, foram identificadas seis MOTUs consideradas prováveis novas espécies, que são: *Hypostomus* sp.1 e *Hypostomus* sp.2 do rio Branco afluente do Guaporé, *Hypostomus* sp.3 do rio Juruena, *Hypostomus* sp.4 do rio Araguaia, *Hypostomus* sp.5 do rio Cabaçal bacia do Paraguai e *Hypostomus* sp.6 do rio Branco em Rondônia bacia do Guaporé. As espécies *H. latirostris* (rio Cuiabá) e *H. cf. latirostris* (rio Coxipó), apresentaram resultados incongruentes, uma vez que as análises ASAP e PTP agruparam essas espécies em uma única MOTU; na análise com o GMYC, apenas dois espécimes das 13 sequências de *H. latirostris* se agruparam com *H. cf. latirostris*. Já, a análise do Ótimo *Threshold* foi a que mais se aproximou da designação nominal, delimitando as espécies como sendo espécies distintas. O valor de Ótimo *Threshold* (OT) foi de 1,53%; valor esse que delimita as distâncias genéticas intra e interespecíficas. A média da distância genética interespecífica variou de 0,85% entre *H. latirostris* rio Cuiabá e *H. cf. latirostris* do rio Coxipó do Ouro, a 9,15% entre *Hypostomus* sp.2 do rio Branco e *H. cf. hemicochliodon* de afluente dos rios Madeira e Juruena. A variação intraespecífica foi de 0% em *H. cf. latirostris* do rio Coxipó do Ouro e outras cinco espécies, a 0,41% em *H. latirostris*. Os resultados apresentados mostram que, para as localidades estudadas, o número de espécies conhecidas para o gênero está subestimado, necessitando de mais estudos para se conhecer a real diversidade de *Hypostomus*. Além disso, o uso da técnica de DNA *Barcode* se mostra eficiente na busca de ferramentas para melhor diagnosticar esse complexo grupo de peixes neotropicais.

Palavras-chave: Análises genéticas, DNA *barcoding*, Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares

ABSTRACT

Hypostomus (Loricariidae, Hypostominae) is a diverse group in number of species and, despite being considered monophyletic, the relationship between the individuals that compose it is complex. Many of its representatives present morphological similarities and a high genetic variability, suggesting the existence of species complexes within the genus. In addition, the occurrence of phenotypic plasticity has already been observed in some species, which makes it even more difficult to resolve taxonomic uncertainties within the group. In view of this, the present work aims to analyze, based on DNA barcoding, specimens of *Hypostomus* collected in some regions of the watersheds of the Upper Paraguay River, Guaporé, Juruena, Madeira and Araguaia, providing subsidies to understand what is the real diversity of representatives of this genus. The dataset analyzed is composed of 57 specimens, identified *a priori* in 15 species based on morphological characters. All samples were submitted to molecular techniques of DNA extraction, Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing. Subsequently, genetic analysis methods were carried out to delimit the species by genetic distance (ASAP, OT) and by coalescence (PTP and GMYC). The final alignment of all sequences generated fragments of 614 base pairs. The results revealed that, of the 15 species classified *a priori* on a morphological basis, 13 to 16 MOTUs were identified, depending on the delimitation method used, with 13 MOTUs being evidenced by ASAP, 16 by Optimal Threshold, 14 MOTUs by PTP and 15 MOTUs by GMYC. After a consensus analysis, six MOTUs considered as probable new species were identified, which are: *Hypostomus* sp.1 and *Hypostomus* sp.2 from the Branco river affluent of the Guaporé, *Hypostomus* sp.3 from the Juruena river, and *Hypostomus* sp.4 from the Araguaia river, *Hypostomus* sp.5 from the Cabaçal river Paraguay basin and *Hypostomus* sp.6 from the Branco river in the Guaporé basin in Rondônia. The species *H. latirostris* (Cuiabá river) and *H. cf latirostris* (Coxipó river), presented incongruent results, since the ASAP and PTP analyzes grouped these species in a single MOTU; in the analysis with GMYC, which also presented an incongruous result, only two specimens of the 13 *H. latirostris* sequences clustered with *H. cf latirostris*. the analysis of the Great Threshold was the closest to the nominal designation, delimiting the species as being distinct species. The Optimal Threshold (OT) value was 1.53%; this value delimits the intra and interspecific genetic distances. The mean interspecific genetic distance ranged from 0.85% between *H. latirostris* from the Cuiabá river and *H. cf latirostris* from the Coxipó do Ouro river (both from the Paraguay river basin), to 9.15% between *Hypostomus* sp.2 from the Branco river and *H. cf hemicochliodon* from a tributary of the Madeira and Juruena rivers. The intraspecific variation ranged from 0% in *H. cf latirostris* from Coxipó do Ouro and five other species, to 0.41% in *H. latirostris*. The results presented show that, for the locations studied, the number of known species for the genus is underestimated, requiring further studies to know the real diversity of *Hypostomus*. In addition, the use of the DNA Barcode technique is efficient in the search for tools to better diagnose this complex group of Neotropical fish.

Keywords: Genetic analysis, DNA barcoding, Molecular Operational Taxonomic Units

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Considerações sobre a diversidade dos peixes	10
1.2. <i>Hypostomus</i> Lacépède, 1803	12
1.3. DNA barcoding na delimitação de espécies	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Área de estudo e coleta de <i>Hypostomus</i>	17
3.2. Procedimentos laboratoriais	21
3.2.1 Extração Salina de DNA	21
3.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Purificação e Sequenciamento das amostras de DNA	
3.3. Análise de Dados	23
CAPÍTULO 1	26
RESUMO	26
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Área de estudo e coleta de <i>Hypostomus</i>	31
2.2. Procedimentos laboratoriais	34
2.3. Análise de dados moleculares	35
3. RESULTADOS	37
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
6. APÊNDICES	53
Apêndice A:	53
Apêndice B:	56
Apêndice C:	65
Apêndice D:	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações sobre a diversidade dos peixes

As mudanças climáticas, geográficas e hidrológicas que ocorreram ao longo da história do planeta, tem relação direta com a evolução das espécies (Savage 1995). Todavia, tais mudanças trazem desafios para a compreensão de alguns ramos da ciência, como, por exemplo, as questões que envolvem a identificação das espécies, interferindo assim, diretamente, no conhecimento da biodiversidade e na taxonomia dos grupos (Loxdale et al. 2016).

Nesse contexto, com os avanços tecnológicos na área de biologia molecular, principalmente no que diz respeito ao uso de marcadores moleculares, a problemática que muitas vezes envolve a diversidade e a taxonomia de determinados grupos tem sido mais facilmente desvendada (Loxdale et al. 2016). No entanto, a nossa compreensão acerca das espécies é ainda, de certo modo limitada, e as mesmas devem ser tratadas de maneira cautelosa (Loxdale et al. 2016). A questão carece de muito estudo antes de ser colocada como uma verdade absoluta para determinado grupo, porque afinal, descrever uma espécie nova demanda muita responsabilidade do taxonomista e de todos os envolvidos no trabalho (Pérez-Ponce de León e Poulin 2016).

A ictiofauna é um ótimo exemplo de grupo com problemas que envolvem a descrição de espécies e suas relações taxonômicas, pelo fato de se tratar de vertebrados extremamente diversos, numerosos e com várias características morfológicas e adaptativas únicas (Buckup et al. 2007). Existem, aproximadamente, 61.628 espécies de peixes conhecidas, dessas, 36.532 são nomes válidos em todo o mundo, sendo que dessas, 18.532 espécies são de água doce e cerca de 100 novas espécies têm sido descritas a cada ano (Reis et al. 2016; Frickie et al. 2023). Em se tratando da abundância em espécies da ictiofauna, a América do Sul é considerada uma região ictiodiversa que abriga 1/3 dos peixes de água doce do planeta (Reis et al. 2016). São conhecidas acima de 9.100 espécies, sendo que apenas as de água doce, correspondem a quase 60% deste total (Reis et al. 2016).

Com relação a classificação e a taxonomia, é importante destacar que a palavra “peixes” engloba um grupo muito diverso de organismos, muitas vezes pouco aparentados. Neste amontoado de grupos destacam-se os Ostariophysi, uma superordem

que abriga os peixes ósseos, que representam cerca de três quartos dos peixes de água doce do mundo (Nelson 2006). Participam, deste grupo, cinco ordens, que ao todo abrigam mais de 63 famílias, 1.000 gêneros e 13.700 espécies (Nelson 2006). A superordem representa cerca de 30% de todos os peixes e 70% de todos os peixes de água doce dos continentes com exceção da Austrália (Reis et al. 2016).

Em Ostariophysi temos dois grupos que compreendem: Anotoptysi que engloba os Gonorynchiformes e temos os Otophysi (Fink e Fink 1996). Otophysi é um subclado de Ostariophysi que inclui as ordens Cypriniformes que engloba os Cypriniformes, Characiformes que representa os Characiformes e Siluriformes que inclui os Gymnotiformes e Siluriformes (Fink e Fink 1996; Nelson 2006; Ferraris 2007). Os Siluriformes representam um grupo de peixes diversificados e amplamente distribuídos entre os continentes, especialmente nas regiões tropicais, sendo a ordem que apresenta uma maior diversidade e distribuição de Ostariophysi, existem cerca de 7.327 espécies conhecidas de Siluriformes, sendo que a maioria das espécies se encontram na América do Sul tropical e subtropical (Reis et al. 2016; Frickie et al. 2023). Os representantes de Siluriformes possuem corpos revestidos por placas dérmicas e apresentam hábito de vida associados as partes mais próximas do substrato (Baumgartner et al. 2012).

Os Siluriformes conhecidos popularmente como “peixes de couro”, formam juntamente com os Characiformes a maior parcela de peixes das regiões neotropicais (Reis et al. 2003). Possuem 40 famílias, sendo Loricariidae a família mais abundante dentro da ordem Siluriformes, com 1.044 espécies válidas, cuja distribuição ocorre em quase toda a América do Sul e Central indo da Costa Rica à Argentina (Reis et al. 2003; Lujan et al. 2015; Fricke et al. 2023). Os Loricariidae são de fácil distinção entre os demais peixes, pois apresentam corpos revestidos de placas dérmicas ossificadas, dentes tegumentares abundantes conhecidos como odontódeos e boca ventral que possui o formato de ventosa, esta é composta por lábios que formam um disco oral (Schaefer e Lauder 1986; Geerinckx et al. 2011). A taxonomia de Loricariidae tem sido revisada com estudos que envolvem desde informações morfológicas, citogenéticas e análises com o uso de marcadores moleculares (Montoya-Burgos et al. 1998; Artoni e Bertollo 2001; Reis et al. 2006). De acordo com Reis et al. 2006, Loricariidae é um grupo monofilético com 1.044 espécies divididas em seis subfamílias, Lithogeninae, Rhineleptinae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae e Delturinae (Provenzano et al. 2003; Lujan et al. 2015; Frickie et al. 2023). Os Loricariidae, se destacam por apresentarem uma

ampla variedade de formas, tamanhos e cores. Dentro de Loricariidae, os Hypostominae se destacam em número de espécies (500 espécies) (Fricke et al. 2023).

Hypostominae é composta por cinco tribos monofiléticas: Corymbophanini, Rhineleporini, Hypostomini, Ancistrini e Pterygoplichthyini (Armbruster 2004). Essa subfamília apresenta uma ampla variedade de espécies com *status* nomenclaturais incertos, tendo como destaque o gênero *Hypostomus* (Reis et al. 2003). Este está alocado atualmente na tribo Hypostomini (Armbruster 2004; Britski et al. 2007; Lujan et al. 2015) e é representado por 217 espécies válidas (Froese e Pauly 2022).

1.2. *Hypostomus* Lacépède, 1803

De acordo com Reis et al. 2003 a primeira descrição de *Hypostomus* foi feita em 1758 por Linnaeus cuja espécie tipo era *Acipenser plecostomus*, a mesma foi invalidada e substituída por La Cépède em 1803 tendo como espécie tipo *Hypostomus guacari* que posteriormente foi considerado um substituto desnecessário para *Acipenser plecostomus* Linnaeus 1758; entretanto, o nome *Hypostomus* acabou sendo fixado ao longo dos anos e de novas descrições.

Hypostomus é um dos mais abundantes gêneros da região Neotropical podendo ser encontrado na maioria das bacias neotropicais, desde os rios costeiros da Costa Rica até Argentina Central, incluindo algumas ilhas do Caribe (Montoya-Burgos 2003). Os representantes desse gênero, possuem preferência por água corrente, se alocam no fundo dos rios e são encontrados em diferentes ambientes, como lagos de várzea, canais profundos de rios, pequenos córregos, corredeiras, cachoeiras de várzea, e até mesmo em águas salobras estuarinas (Weber 2003). Durante o dia, possuem o hábito de ficar entre as rochas, são peixes herbívoros e/ou detritívoros, com exceção de *H. cochliodon* que se alimentam de madeira (Armbruster 2003).

Apresentam adaptações anátomo-fisiológicas para a captura e digestão de seu alimento, não apresentam hábitos migratórios e possuem estratégias adaptativas, como por exemplo: i) boca em formato de ventosa que auxilia na fixação dos *Hypostomus* no substrato; ii) dentes de coroa bífida que permitem a raspagem dos detritos/sedimentos que estejam fixados no fundo dos rios ou em macrófitas aquáticas; iii) presença de odontódeos “espinhos” ao longo do corpo que auxiliam na defesa desses indivíduos; iv) trato digestivo longo e enrolado que auxilia na digestão dos detritos (Darnell 1961; De Almeida e De Resende 2012; Lujan et al. 2015). São restritos a água doce, com exceção de *Hypostomus*

watwata que é encontrado em águas salobras das Guianas, e apresentam tamanho variável de 4,2 cm até exemplares com 70 cm de comprimento total (Reis et al. 2003).

Esses peixes são popularmente conhecidos como cascudos, acarís, bodós e, em língua inglesa, de *catfish*. As principais características de *Hypostomus* são: corpo robusto, boca ventral em formato de ventosa, dentes de coroa bífida, focinho revestido de placas pequenas e corpo coberto por placas ósseas maiores (Montoya-Burgos 2003; Bristki et al. 2007).

Pesquisas sobre sua morfologia (Armbruster 2004; Soliman et al. 2020), reprodução (Mazzoni e Caramaschi 1997; Duarte et al. 2011; Gomes et al. 2015), alimentação (Villares-Junior et al. 2016; Pessoa et al. 2013; Abilhoa et al. 2016), fisiologia (Aparecida Perna e Fernandes 1996; Mattias et al. 1998; Parente et al. 2009), taxonomia (Zawadzki et al. 2008, 2010, 2012, 2018), relações filogenéticas (Montoya-Burgos et al. 2002; Lujan et al. 2015), citogenética clássica e molecular (Artoni e Bertollo 1996; Rubert et al. 2011; Maurutto et al. 2012) e biologia molecular (Paiva et al. 2005; Mezzomo et al. 2020; Rocha-Reis et al. 2020), têm sido realizadas para esse grupo. Para as bacias alvo deste estudo, bacia do Alto rio Paraguai, Araguaia e Bacia Amazônica são encontradas algumas das principais espécies válidas de *Hypostomus* (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies presentes em afluentes das bacias dos rios Alto Paraguai, Araguaia e Bacia Amazônica.

Espécies	Bacia/Rios	Autores
<i>H. borelli</i>	Paraguai/Pilcomayo	Boulenger 1897
<i>H. boulengeri</i>	Paraguai	Eigenmann e Kennedy 1903
<i>H. basilisko</i>	Paraguai/Bodoquena	Tencatt et al. 2014
<i>H. cochliodon</i>	Paraguai/Paraguai e Paraná	Kner 1854
<i>H. commersoni</i>	Paraguai/Paraná e Uruguai	Valenciennes 1836
<i>H. formosae</i>	Paraguai	Cardoso et al. 2016
<i>H. froehlichii</i>	Paraguai/Bodoquena	Zawadzki e Tencatt 2021
<i>H. latirostris</i>	Paraguai/Jangada	Regan 1904
<i>H. latifrons</i>	Paraguai	Weber 1986
<i>H. mutucae</i>	Paraguai/Cuiabá	Knaack 1999
<i>H. paranensis</i>	Paraguai/Paraná	Weyenbergh 1877
<i>H. peckoltoides</i>	Paraguai/Cuiabá	Zawadzki et al. 2010
<i>H. perdido</i>	Paraguai/Perdido	Zawadzki et al. 2014
<i>H. piratatu</i>	Paraguai	Weber 1986
<i>H. regani</i>	Paraguai/Paraguai, Paraná e Uruguai	Ihering 1905
<i>H. robinii</i>	Paraguai/Ilha de Trindade	Valenciennes 1840
<i>H. ternetzi</i>	Paraguai/Paraguai, Paraná e Uruguai	Boulenger 1895
<i>H. variostictus</i>	Paraguai/Coxim	Miranda Ribeiro 1912
<i>H. asperatus</i>	Araguaia-Tocantins/Tocantins	Castelnau 1855
<i>H. atropinnis</i>	Araguaia-Tocantins/Tocantins	Eigenmann e Eigenmann 1890

<i>H. ericae</i>	Araguaia-Tocantins/barragem de Serra Mesa	Hollanda Carvalho e Weber 2004
<i>H. faveolus</i>	Araguaia-Tocantins/Tocantins	Zawadzki et al. 2008
<i>H. goyazensis</i>	Araguaia-Tocantins/Araguaia	Regan 1908
<i>H. hemicochliodon</i>	Amazônica/Solimões, Tapajós, Xingu e Negro	Armbruster 2003
<i>H. hoplonites</i>	Amazônica/Amazonas	Rapp Py-Daniel 1988
<i>H. levis</i>	Amazônica/Madeira	Pearson 1924
<i>H. pantherinus</i>	Amazônica/Madeira	Kner 1854
<i>H. pyrineusi</i>	Amazônica/Madeira	Miranda Ribeiro 1920
<i>H. carinatus</i>	Amazônica/Amazonas	Steindachner 1881
<i>H. rondoni</i>	Amazônica/Tapajós	Miranda Ribeiro 1912
<i>H. soniae</i>	Amazônica/Tapajós	Hollanda Carvalho e Weber 2004

A filogenia de *Hypostomus* já foi alvo de diversos trabalhos e tem sido constantemente revisada por meio de estudos com ênfase em análises filogenéticas baseados em dados de marcadores mitocondriais (*D-loop*) que indicaram a princípio *Hypostomus* como um grupo polifilético (Montoya-Burgos et al. 2002). Já em 2004, Armbruster em uma análise filogenética baseada em caracteres osteológicos de Hypostomini, recuperou *Hypostomus* como um grupo parafilético em que seus representantes são irmãos de *Aphanotorulus*, *Cochliodon* e *Isorineloricaria* (Armbruster 2004). Roxo et al. 2014, também recuperam *Hypostomus* como parafilético, no qual, *Hemiancistrus* está agrupado no clado de *Hypostomus*.

Entretanto, desde que *Aphanotorulus* e *Isorineloricaria* foram removidos do clado de *Hypostomus*, e *Cochliodon* foi proposto como sinônimo-junior de *Hypostomus*, a monofilia do gênero parece estar bem estabelecida com base em filogenias moleculares (Lujan et al. 2015; Ray e Armbruster 2016; Cardoso et al. 2019; De Queiroz et al. 2020). Com isso, *Hypostomus* segue como um grupo monofilético, cujos estudos sobre as relações filogenéticas entre os seus representantes revelaram quatro linhagens principais, sendo quatro supergrupos, representados por: *H. cochliodon*, *H. hemiurus*, *H. auroguttatus* e *H. plecostomus* (De Queiroz et al. 2020).

1.3. DNA barcoding na delimitação de espécies

A discriminação correta das espécies não é uma tarefa fácil, principalmente quando se usa apenas um tipo de abordagem, seja ela morfológica, molecular (Arruda et al. 2019; Braga et al. 2021), ou mesmo com base em estudos cariotípicos. A associação de diferentes métodos para se identificar uma espécie é uma tendência nos estudos

taxonômicos que vem sendo empregado com sucesso em diversos trabalhos, principalmente no grupo dos peixes (Arruda et al. 2019; Braga et al. 2021).

Nesse sentido, as técnicas moleculares envolvendo DNA mitocondrial vem contribuindo para a elucidação da problemática acerca das espécies, em especial as que são consideradas crípticas (Ward et al. 2005). O DNA *barcoding* é uma metodologia que utiliza o gene mitocondrial codificador de proteínas, Citocromo c Oxidase I (COI), para identificação rápida das espécies, o que vem permitindo, ao longo dos anos, a delimitação e descrição de novas espécies (Hebert et al. 2004; Hebert e Gregory 2005; Tresbach et al. 2015), contribuindo para a resolução de problemas em grupos taxonômicos cuja distinção morfológica é complexa (Rosa e Paiva 2009).

O DNA mitocondrial possui 37 genes, sendo esses genes todos ligados ao longo de uma molécula circular com cerca de 17.000 pares de nucleotídeos de comprimento (Avisé 2009). Além disso, o genoma mitocondrial tem como características principais, serem amplamente distribuídos entre os animais, possuir alto número de cópias por célula, apresentar taxa de mutação diferente entre as espécies, não sofrer recombinação, possuir herança materna e ter baixo polimorfismo ancestral, características essas que tornam esses genes importantes colaboradores na discriminação das espécies (Azeredo 2005). Existe também, um limite de 2% de divergência genética para espécies de vertebrados, que é utilizado para discriminar as espécies relacionadas (Hebert et al. 2003). Assim, as distâncias intraespecíficas estariam abaixo de 2% e as distâncias interespecíficas estariam acima desse percentual (Hebert et al. 2003).

Diferentes abordagens metodológicas podem ser empregadas no tratamento de dados genéticos para se compreender os limites interespecíficos. Assim, para a realização da delimitação com base no DNA *Barcode* são empregados diferentes métodos de análises baseados em distância genética e coalescência. Os métodos baseados em distâncias genéticas apresentam como hipótese o fato de que indivíduos pertencentes a uma mesma espécie possuem distâncias genéticas menores do que as distâncias entre as espécies. Os métodos de distância mais utilizados atualmente para delimitação de espécies são: ASAP que constrói partições de espécies a partir de alinhamentos de sequências de *locus* único formando as Unidades Operacionais Taxonômicas Moleculares (MOTUs) (Puillandre et al. 2021), e o modelo Kimura-2-Parametros (K2P), que estima as distâncias interespecíficas e intraespecíficas dos grupos com base na diferenciação das taxas de transição e transversão, assumindo que a frequência das bases é a mesma (Kimura 1980). Outro método também baseado em distância genética (K2P) é o Ótimo

Threshold (OT) gerado pelo pacote *Spider* (Brown et al. 2012), em conjunto com o software (JMotu) utilizado para a delimitação das (MOTUs) (Jones et al. 2011).

Os métodos baseados apenas em distâncias genéticas apresentam certas limitações por não levarem em consideração a história evolutiva das espécies. De encontro a essa limitação, temos as análises coalescentes que permitiram um avanço nesse sentido, pois fazem inferências quanto aos processos evolutivos por meio de modelagem probabilística das relações genealógicas de um conjunto de amostras de fragmentos de DNA do presente para o passado (Kingman 1982; Hamilton 2021). Assim, essas modelagens permitem reconstruir os eventos evolutivos como, fluxo gênico, seleção natural e divergência populacional que podem ter ocorrido no passado e que explicam os padrões genéticos atuais de determinadas amostras populacionais (Kingman 1982; Hamilton 2021).

Os métodos baseados em coalescência tendem a ser mais robustos que os métodos de distância, pois eles levam em consideração a história evolutiva das espécies, enquanto os métodos baseados em distância não. Com relação as ferramentas coalescentes, o PTP (*Poisson Tree Processes*) e o GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescence*) são os mais utilizados (Zhang et al. 2013). O PTP é uma análise análoga ao GMYC, que se diferencia apenas quanto ao uso da topologia, ou seja, o PTP se baseia em uma árvore não-ultramétrica (número de substituições) (Zhang et al. 2013).

O modelo GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescence*) foi desenvolvido para delimitar espécies que evoluem independentemente por meio de um único *locus*, ou seja, um único marcador molecular (Citocromo c Oxidase I). É uma análise coalescente que utiliza uma árvore ultramétrica (comprimento dos ramos ao longo do tempo) para modelar a especiação, nos eventos de ramificação entre as espécies; através da árvore, são identificados pontos de transição entre as taxas de ramificações inter e intraespécies (Zhang et al. 2013). Portanto o GMYC é um método probabilístico para delimitação das espécies ajustando modelos de ramificação dentro e entre espécies para árvores de genes reconstruídas, e dentre as milhares de árvores analisadas pelo método, o mesmo seleciona a mais robusta de acordo com os nossos dados e parâmetros pré-determinados (Fujisawa et al. 2013).

A utilização de dados mitocondriais associados aos métodos disponíveis para delimitação de espécies, tem se mostrado bastante eficaz na resolução de incertezas taxonômicas dos seres vivos (Ward et al. 2005; Tresbach et al. 2015), e podem contribuir para conhecer a biodiversidade existente, facilitando o manejo e conservação de diversas

espécies que estão sofrendo com o declínio populacional e, consequentemente, correndo o risco de serem extintas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Diante do exposto, o presente projeto tem como objetivo central, investigar com base na técnica de DNA *barcoding*, a diversidade das espécies de *Hypostomus* presentes em afluentes das Bacias dos rios do Alto Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia.

2.2. Objetivos específicos

- (1) identificar as possíveis Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) de um conjunto de espécies de *Hypostomus* oriundas de porções das bacias do Alto rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia;
- (2) verificar se as MOTUs definidas indicam possíveis novas espécies;
- (3) estimar a divergência genética intra e interespecífica das populações estudadas de *Hypostomus*;
- (4) gerar informações sobre a diversidade genética de *Hypostomus* para auxiliar e fortalecer as políticas públicas que objetivam mitigar os impactos antrópicos advindos do desconhecimento da diversidade dos peixes neotropicais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo e coleta de *Hypostomus*

Os espécimes analisados neste estudo, foram coletados nas bacias hidrográficas do Alto rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia (Tabela 2). Já as demais informações das sequências de DNA dos *Hypostomus*, foram extraídas do banco de dados genéticos mitocondriais *Bold* *Systems* (<https://www.boldsystems.org/index.php/databases>) que pertencem a diferentes bacias hidrográficas ao longo da América do Sul (Apêndice A). Os espécimes deste estudo foram identificados, *a priori*, com base em sua morfologia externa (figura apresentada no capítulo 1- Figuras 2 e 3).

Foram obtidos 60 indivíduos de *Hypostomus* durante o período de coleta de dados provenientes das seguintes bacias (Tabela 2): i) Alto Paraguai: rio Cuiabá (São Gonçalo Beira Rio) Cuiabá - MT (1); rio Cuiabá em Nossa Senhora do Livramento - MT (11); rio Cuiabá em Várzea Grande - MT (1); rio Mutum em Mimoso - MT (1); afluentes do rio Cuiabá em Jangada - MT (8); rio Coxipó em Distrito da Guia - MT (3); rio Coxipó do

Ouro em Cuiabá – MT (3); rio Diamantino em Diamantino - MT (3); rio Cabaçal em Cabaçal – MT (1); Córrego Último Gole – MS (2); ii) Araguaia: Córrego Taquaral em Barra do Garças - MT (2); rio Araguaia, Barra do Garças - MT (2); iii) Amazônica: rio Juruena da bacia do rio Madeira em Juína Terra Roxa - MT (7); afluentes da bacia Amazônica em Juína Distrito de Fontanillas (2); e rio Branco em Rondônia – RO bacia do rio Guaporé (10) (Tabela 2) (figura apresentada no capítulo 1- Figura 1).

Tabela 2: Pontos de coleta dos espécimes de *Hypostomus* deste estudo.

Espécie	Localidade	Bacia e/ou Rio	Lat	Long	Id. Seq	NºReg Bold
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9145	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9146	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9147	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9148	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9149	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9239	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9541	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9542	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9543	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9544	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9569	-
<i>H. latirostris</i>	Jangada–MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10376	-
<i>H. latirostris</i>	Jangada–MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10377	-
<i>H. latirostris</i>	Jangada–MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10381	-
<i>H. latirostris</i>	Distrito da Guia–MT	Paraguai/Coxipó Açu	-15,213240	-56,133556	10417	-
<i>H. cf. latirostris</i>	Coxipó do Ouro–MT	Paraguai/Coxipó do Ouro	-15,360144	-55,933308	11083	-

<i>H. cf. latirostris</i>	Coxipó do Ouro–MT	Paraguai/Coxipó do Ouro	-15,360144	-55,933308	11084	-
<i>H. cf. latirostris</i>	Coxipó do Ouro–MT	Paraguai/Coxipó do Ouro	-15,360144	-55,933308	11086	-
<i>H. boulengeri</i>	Mimoso–MT	Paraguai/Mutum	-16,201105	-55,50714	9438	-
<i>H. boulengeri</i>	Várzea Grande–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,392807	-56,42755	9694	-
<i>H. boulengeri</i>	Diamantino–MT	Paraguai/Diamantino	-14,243129	-56,27214	10415	-
<i>H. boulengeri</i>	Distrito da Guia–MT	Paraguai/Coxipó Açu	-15,213240	-56,133556	10423	-
<i>H. faveolus</i>	Barra do Garças–MT	Araguaia/Taquaral	-15,403265	-52,174169	9505	-
<i>H. faveolus</i>	Barra do Garças–MT	Araguaia/Taquaral	-15,403265	-52,174169	9506	-
<i>Hypostomus sp.1</i>	Nova Geased’Oeste Alta–RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9713	-
<i>Hypostomus sp.1</i>	Nova Gease d’Oeste–RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9728	-
<i>Hypostomus sp.2</i>	Nova Gease d’Oeste–RO	Guaporé/rio Branco	-11,562510	-62,21267	9699	-
<i>Hypostomus sp.3</i>	Juína–MT	Tapajós/Juruena	-11,201994	-58,20929	10201	-
<i>Hypostomus sp.3</i>	Juína–MT	Tapajós/Juruena	-11,201994	-58,20929	10203	-
<i>Hypostomus sp.4</i>	Barra do Garças–MT	Araguaia/Araguaia	-15,533422	-52,151078	9539	-
<i>Hypostomus sp.4</i>	Barra do Garças–MT	Araguaia/Araguaia	-15,533422	-52,151078	9540	-
<i>Hypostomus sp.5</i>	Cabaçal–MT	Paraguai/Cabaçal	-15,366122	-58,212131	11426	-
<i>Hypostomus sp.6</i>	Nova Gease d’Oeste–RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9695	-
<i>Hypostomus sp.6</i>	Nova Gease d’Oeste –RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9696	-
<i>Hypostomus sp.6</i>	Nova Gease d’Oeste–RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9697	-
<i>Hypostomus sp.6</i>	Nova Gease d’Oeste–RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9703	-
<i>H. pyrineusi</i>	Nova Gease d’Oeste–RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9719	-
<i>H. pyrineusi</i>	Nova Gease d’Oeste–RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9720	-
<i>H. pyrineusi</i>	Nova Gease d’Oeste–RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9725	-

<i>H. hemicochliodon</i>	cf.	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10195	-
<i>H. hemicochliodon</i>	cf.	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10196	-
<i>H. hemicochliodon</i>	cf.	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10197	-
<i>H. hemicochliodon</i>	cf.	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10198	-
<i>H. hemicochliodon</i>	cf.	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10199	-
<i>H. hemicochliodon</i>	cf.	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10200	-
<i>H. hemicochliodon</i>	cf.	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,201994	-58,20929	10202	-
<i>H. renestoi</i>		Jangada-MT	Paraguai/afuentes	-15,143075	-56,29007	10375	-
<i>H. renestoi</i>		Jangada-MT	Paraguai/afuentes	-15,143075	-56,29007	10380	-
<i>H. renestoi</i>		Jangada-MT	Paraguai/afuentes	-15,143075	-56,29007	10396	-
<i>H. renestoi</i>		Diamantino-MT	Paraguai/Diamantino	-14,243129	-56,27214	10414	-
<i>H. renestoi</i>		Diamantino-MT	Paraguai/Diamantino	-14,243129	-56,27214	10416	-
<i>H. cochliodon</i>		Jangada-MT	Paraguai/afuentes	-15,143075	-56,29007	10383	-
<i>H. cochliodon</i>		Jangada-MT	Paraguai/afuentes	-15,143075	-56,29007	10386	-
<i>H. cochliodon</i>		Distrito da Guia-MT	Paraguai/Coxipó	-15,213240	-56,133556	10422	-
<i>H. regani</i>		São Gonçalo beira rio-MT	Paraguai/Cuiabá	-15,689781	-57,060000	9568	-
<i>H. khimaera</i>		MS	Paraguai/Córrego Último Gole	-17,928722	-54,691861	11454	-
<i>H. khimaera</i>		MS	Paraguai/Córrego Criminoso	-18,490278	54,753917	11458	-

Ao todo foram utilizadas 57 amostras (figura apresentada no capítulo 1- Figura 1). Os peixes analisados neste trabalho foram coletados (nº da licença: 73042), eutanasiados e, por fim, fragmentos de tecido muscular foram retirados e acondicionados em tubos plásticos para microcentrifuga (2,0 ml) com álcool etílico absoluto e armazenados em freezer, para as análises moleculares.

Os espécimes foram armazenados no Laboratório de Citogenética e Genética Animal (LabGen), localizado no Instituto de Biociências (IB) da Universidade Federal de

Mato Grosso (UFMT) e, após a conclusão do trabalho, os mesmos serão transferidos e adicionados à Coleção de Peixes da UFMT (CPUFMT) e suas sequências de DNA serão depositadas na plataforma online de sequencias mitocondriais *Bold Systems*.

3.2. *Procedimentos laboratoriais*

3.2.1 *Extração Salina de DNA*

As técnicas moleculares foram realizadas utilizando amostras de tecido muscular dos peixes, armazenadas em tubos para microcentrífuga, conservadas em álcool etílico absoluto e preservadas em freezer (-20°C).

Para extração do DNA foi utilizado o protocolo de extração salina (Aljanabi e Martinez 1997), com modificações. As adequações foram feitas, nas quantidades de reagentes, tempo médio de digestão celular e de centrifugação do material. Essas alterações foram realizadas conforme nossas experiências em laboratório até obtermos um protocolo adequado para nossas amostras.

A extração salina começa com o corte de um pequeno fragmento de tecido (aprox. 60 mg). Após a evaporação completa do álcool, o tecido foi colocado em um microtubo (1,5 ml). Em seguida, foram adicionados 440 µl de tampão de extração (NaCl 5M á 8 ml, Tris – HCl 1M pH 8,0 á 1 ml, EDTA 0,5M pH 8,0 a 400µl, SDS 10% á 20 ml e água ultrapura a 70,6 ml para um volume final de 100 ml) e 16 µl de proteinase K (10 mg/ml). O microtubo foi passado em vórtex, para a homogeneização dos reagentes, e deixado em banho-maria a 55°C de 1-3 horas. Posteriormente, 300µl de NaCl (5M) foram adicionados à amostra, os microtubos foram invertidos, passados em vórtex por 30 segundos e centrifugados a 10.000 rotação por minuto (rpm) por 10 minutos. O sobrenadante (cerca de 500 µl) foi transferido para outro microtubo de 1,5 ml e adicionado 500 µl de isopropanol (100%) gelado. Em seguida, os microtubos foram invertidos para a precipitação do DNA e centrifugados por 10 min a 10.000 rpm. Novamente, o isopropanol foi descartado e adicionado na amostra 300 µl de etanol (70%) gelado. Os microtubos foram centrifugados por 5 min a 10.000 rpm e o etanol foi descartado. Os microtubos com as amostras foram mantidos em estufa a 37°C por 1 hora e, ao final, o DNA foi eluído com 30 µl de água ultrapura autoclavada.

Após a extração de DNA, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (DENOVIX) DS – 11/DS – 11+ *UNISCICENCE*© para verificar a pureza e quantidade

em nanogramas (ng) de DNA. Além disso, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (1%), utilizando cuba de eletroforese horizontal com tampão TBE 1X, comparado com *ladder* de 1kb (*Kasvi*) para verificar a integridade do material genético. Para isso, foram utilizados dois microlitros de DNA total, 1 µl de corante fluorescente *Gel Red* 10X (*Biotium*) e 1 µl do corante *Blue Juice*: logo depois, o gel foi observado sob luz ultravioleta em foto documentador (*Loccus Biotechnology*).

3.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Purificação e Sequenciamento das amostras de DNA

Posterior a etapa de extração do material genético, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada, utilizando os *primers* do gene mitocondrial Citocromo c oxidase I (COI) *FishF1* (5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3') e *FishR1* (5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3') (Ward et al. 2005), seguindo as concentrações e quantidades relacionadas na (Tabela 3).

Tabela 3: Reagentes PCR. Reagentes e suas respectivas concentrações e quantidades utilizadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Reagentes	Mix para uma amostra
H ₂ O ultrapura	17,05µl
Tampão 10X	2,5µl
dNTP 1,25mM	1,5µl
MgCl ₂ 50mM	0,75µl
Primer F 10mM	0,5µl
Primer R 10mM	0,5µl
Taq-polimerase 5U	0,2µl
DNA	1,0µl

As reações foram realizadas em termociclador, modelo *Veriti 96-Well Thermal Cycler*, 0,2 ml – Ref. 4375786 (*Applied Biosystems*) durante 35 ciclos, de acordo com a programação de temperaturas discriminadas na Tabela 4.

Tabela 4: Programação – PCR. Programação de temperaturas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene Citocromo c Oxidase I (COI).

*Ciclo repetido 35 vezes

Etapas	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	95°C	3 min
Desnaturação*	95°C	30 seg
Anelamento*	50°C	60 seg
Extensão*	72°C	40seg
Extensão final	72°C	7min
	12°C	∞

Para verificar se o DNA foi amplificado corretamente, as amostras foram submetidas novamente à eletroforese em gel de agarose, seguindo o mesmo protocolo utilizado para extração de DNA, com alteração do *ladder* (100 pares de base) e, em seguida, foram submetidas ao espectrofotômetro. Posteriormente, as amostras foram enviadas para a BPI Biotecnologia, Pesquisa e Inovação (<https://bpibiotecnologia.com.br/>), empresa situada em Botucatu-SP, para realização da etapa de purificação e sequenciamento automático das amostras de DNA.

3.3. Análise de Dados

As sequências brutas recebidas em formato AB1 foram convertidas em formato fasta e comparadas uma a uma com as sequências depositadas em plataforma online NCBI ((*National Center for Biotechnology Information*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com o auxílio da ferramenta BLAST ® (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al. 1990) para verificar se as sequências brutas de cada espécie que identificamos *a priori*, baseadas em morfologia externa, correspondiam com as sequências das espécies depositadas no banco de dados citado acima. Já no banco de dados do DNA *Barcode* na plataforma *Bold Systems* (Registros de código de barras a nível de espécie, <http://v4.boldsystems.org>) (Hebert et al. 2003) extraímos novas sequências de DNA que foram incorporadas ao trabalho (Apêndice A).

As sequências brutas recebidas em formato AB1 foram editadas no programa *Geneious*® 7.1.3 (Kearse et al. 2012). No programa *Geneious*, verificou-se manualmente a qualidade das sequências, que variou de 70 a 90%, bem como a presença de *gaps* para que assim, posteriormente fosse realizada a edição. Em seguida, no próprio *Geneious* foi analisado se havia a presença de *stop codons*, pseudogenes, deleções e inserções nas sequências. Após a edição inicial, as sequências foram analisadas no programa MEGA v.11.0 (Tamura et al. 2021) e por meio do algoritmo *Muscle* (Edgar 2004) foi realizado o alinhamento múltiplo. O teste de saturação das sequências (Xia et al. 2003; Xia e Lemey 2009) foi realizado no programa DAMBE (Xia et al. 2003) para verificar a possível ocorrência de saturação por substituição de nucleotídeos.

No MEGA, foram calculadas as distâncias genéticas intra e interespecíficas das espécies nominais, aplicando o modelo de distância Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura 1980); este modelo tem como pressuposto que as taxas de transição e transversão são diferentes, mas assume que a frequência das bases é igual, sendo muito utilizado em

diversos trabalhos para estimar as divergências genéticas interespecíficas e intraespecíficas entre os grupos (Kimura 1980).

O Ótimo *Threshold* (OT) foi gerado com o auxílio do pacote *Spider* (*SPecies IDentify and Evolutions in R*) (Brown et al. 2012) utilizando a função “LocalMinima” no programa *R Studio* (<http://www.rstudio.com/>). O valor de OT foi estimado, usando o alinhamento final como matriz, determinando a distância genética (K2P) entre os grupos e otimizando os limites de divergência de OT entre as espécies (Brown et al. 2012). Em seguida, dado o valor de OT, o mesmo foi utilizado para a formação das Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) por meio do programa JMotu (Jones et al. 2011). O JMotu testa os *thresholds* gerados pelo *Spider* para a formação das MOTUs e para isso é necessário utilizar o *threshold* no valor decimal e multiplicá-lo pelo tamanho do fragmento de pares de bases. As entidades moleculares que são as MOTUs se formam por agrupamentos de sequências similares entre si, inferindo que a variação genética não seja excedente dentro das espécies, mas sim entre elas (Casiraghi et al. 2010).

Além disso, também foi realizada a análise baseada em distância genética conhecida como ASAP, a qual constrói partições de espécies a partir de alinhamentos de sequências de *locus* único, formando as Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) (Puillandre et al. 2021). O ASAP foi executado na página <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>; após o carregamento do arquivo contendo o alinhamento final, o método Kimura (K80) ts/tv foi selecionado, e gerando um arquivo *output* com as MOTUs baseadas nas sequências de DNA do alinhamento final.

Além das análises de distâncias genéticas que utilizam o modelo de substituição K2P, em nossas análises, também foi adicionado com o auxílio do modelo de substituição de nucleotídeos por meio do programa *JModeltest2* v. 2.1.4 (Darriba et al. 2012), o melhor modelo evolutivo (HKY+I+G), uma vez que este foi o modelo que melhor se ajustou ao nosso conjunto de dados genéticos.

O modelo PTP (*Poisson Tree Processes*) para a delimitação de espécies (Zhang et al. 2013) é um método de análise coalescente de máxima verossimilhança. A delimitação ocorre por meio de filogenias a partir de uma árvore não ultramétrica construída no site <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/> (Guindo e Gascuel 2003), através do melhor modelo de substituição (HKY+I+G), sendo o valor de *gamma shape* gerado pelo

programa *JModeltest2* com suporte de 1000 réplicas de *bootstrap* sendo as demais configurações deixadas em *default*. Como grupo externo, utilizamos a sequência de *Pterygoplichthys etentaculatus* proveniente do *Bold* (Nº de registro *Bold* BSB073-10).

O resultado da análise de Máxima Verossimilhança realizada no site <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>, gerou a árvore não ultramétrica que foi utilizada na análise do PTP no site <https://species.h-its.org/> (Zhang et al. 2013). No modelo PTP, a árvore foi enraizada com X, 400.000 gerações de Cadeias de Markov (MCMC) e, ao final, o grupo externo foi removido da análise e os demais parâmetros foram deixados em *default*. As taxas de especiação foram modeladas a partir dos números de substituições (Zhang et al. 2013).

A árvore ultramétrica foi construída no programa *BEAST* v2.6.6, utilizando valores de *gamma* do modelo evolutivo (HKY+I+G), relógio molecular relaxado com distribuição log normal e modelo de especiação *birth-death*. Os parâmetros foram executados três vezes de forma independente, iniciadas através de árvores aleatórias com 30 milhões de gerações (MCMC) cada. Os resultados dos três arquivos com a extensão log foram visualizados no programa *Tracer* v 1.6 para verificar a confiabilidade dos resultados. Após o término das três corridas no programa *BEAST*, as mesmas foram combinadas no programa *LogCombiner*, sendo que 25% (*burn-in*) das topologias foram descartadas de cada arquivo, uma vez que essa etapa inicial de exploração dos dados pelo programa, que ainda está em ascendência, acaba gerando ruídos aos resultados. Além disso, os três arquivos com extensão “.tree” também foram combinados, por meio do programa *Treeannotator* v. 1.8. O resultado da combinação destes três arquivos foi visualizado no programa *FigTree* v. 1.4 e salvo com extensão *.Newick*. Em seguida, essa árvore foi usada na análise de GMYC no programa *R Studio*, através do pacote *SPLITS* (*Species Limits by Threshold Statistics*) (Monaghan et al. 2009), com o emprego do modelo de *Threshold* único.

RESUMO

Sendo um dos gêneros que mais desperta o interesse e curiosidade dos cientistas, aquaristas e leigos *Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae, Hypostomini) é considerado um dos grupos mais ricos em espécies de todo o mundo, são amplamente distribuídos na região Neotropical e de fácil adaptação a diferentes ambientes aquáticos. Ainda que o gênero seja considerado um grupo monofilético, a relação entre os representantes desse grupo é complexa, uma vez que, muitos de seus indivíduos apresentam similaridades morfológicas, com uma alta variabilidade genética. Além disso, a ocorrência de plasticidade fenotípica já foi observada em algumas espécies, o que dificulta ainda mais a resolução de incertezas taxonômicas dentro do grupo. Desse modo, diante da grande complexidade encontrada em *Hypostomus* faz-se necessário analisar com o auxílio da técnica de DNA *barcoding* exemplares coletados em afluentes das bacias hidrográficas do Alto rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia buscando entender qual a real diversidade dos representantes desse gênero. Após a coleta de dados, foram analisados 57 indivíduos de diferentes espécies de *Hypostomus*, os quais foram submetidos as técnicas moleculares de extração salina, reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados durante a PCR. A nível apenas de comparação, foram extraídos do banco de dados genéticos *Bold Systems* 166 espécimes de *Hypostomus*. Em seguida, as sequências de DNA foram submetidas as análises de bioinformática, em que foram editadas, blastadas e alinhadas. Logo depois, as sequências foram analisadas através das análises baseadas em distância genética, como OT e ASAP, além, de estimar as distâncias inter e intraespecífica dos fragmentos de DNA; e por fim, foram executadas as análises de coalescência PTP, GMYC e os resultados foram plotados em um dendrograma. Os resultados revelaram 57 sequências de DNA de *Hypostomus* compostas por 614 pares de base. Os resultados revelam que das 15 espécies classificadas *a priori* com base morfológica, foram identificadas de 13 a 16 MOTUs, a depender do método de delimitação utilizado, sendo evidenciadas 13 MOTUs pelo ASAP, 16 pelo Ótimo *Threshold*, 14 MOTUs pelo PTP e 15 MOTUs pelo GMYC. Após uma análise consenso, foram identificadas seis MOTUs consideradas prováveis novas espécies, que são: *Hypostomus* sp.1 e *Hypostomus* sp.2 do rio Branco, *Hypostomus* sp.3 do rio Juruena, *Hypostomus* sp.4 do rio Araguaia, *Hypostomus* sp.5 do rio Cabaçal e *Hypostomus* sp.6 do rio Branco. As espécies *H. latirostris* (rio Cuiabá) e *H. cf. latirostris* (rio Coxipó), apresentaram resultados incongruentes, uma vez que as análises ASAP e PTP agruparam essas espécies em uma única MOTU e na análise com o GMYC apenas dois espécimes das 13 sequências de *H. latirostris* se agruparam com *H. cf. latirostris*. A análise do Ótimo *Threshold* foi a que mais se aproximou da designação nominal, delimitando as espécies como sendo espécies distintas. O valor de Ótimo *Threshold* (OT) foi de 1,53%; valor esse que delimita as distâncias genéticas intra e interespecíficas. A média da distância genética interespecífica variou de 0,85% entre *H. latirostris* rio Cuiabá e *H. cf. latirostris* do rio Coxipó do Ouro, a 9,15% entre *Hypostomus* sp.2 do rio Branco e *H. cf. hemiochliodon* de afluente dos rios Madeira e Juruena. A variação intraespecífica foi de 0% em *H. cf. latirostris* do rio Coxipó do Ouro e outras cinco espécies, a 0,41% em *H. latirostris* rio Cuiabá. Os resultados apresentados mostram que, para as localidades estudadas, o número de espécies conhecidas para o gênero está subestimado, necessitando de mais estudos para se conhecer a real diversidade do gênero. Além disso, o uso da técnica de DNA *Barcode* se mostra eficiente na busca de ferramentas para melhor diagnosticar esse complexo grupo de peixes neotropicais.

Palavras-chave: Análises genéticas, DNA *barcoding*, Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares

ABSTRACT

Being one of the genera that most arouses the interest and curiosity of scientists, aquarists and laymen *Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae, Hypostomini) is considered one of the richest groups in species around the world, they are widely distributed in the Neotropical region and easily adaptable to different aquatic environments. Although the genus is considered a monophyletic group, the relationship between the representatives of this group is complex, since many of its individuals present morphological similarities, with a high genetic variability. In addition, the occurrence of phenotypic plasticity has already been observed in some species, which makes it even more difficult to resolve taxonomic uncertainties within the group. Thus, given the taxonomic uncertainties and diversity found in *Hypostomus*, it is necessary to analyze, using the DNA barcoding technique, specimens collected in tributaries of the Upper Paraguay River, Guaporé, Juruena, Madeira and Araguaia river basins, seeking to understand the real diversity of representatives of this genus. After data collection, 57 individuals of different species of *Hypostomus* were analyzed, which were submitted to molecular techniques of Saline Extraction, Polymerase Chain Reaction (PCR) and subsequent sequencing of the DNA fragments amplified during PCR. For comparison purposes only, 166 specimens of *Hypostomus* were extracted from the Bold Systems genetic database. Then, the DNA sequences were subjected to bioinformatics analysis, in which they were edited, blasted and aligned. Soon after, the sequences were analyzed using analyzes based on genetic distance, such as OT and ASAP, in addition to estimating the inter and intraspecific distances of the DNA fragments; and finally, the PTP, GMYC coalescence analyzes were performed and the results were plotted in a dendrogram. The results revealed 57 *Hypostomus* DNA sequences composed of 614 base pairs. The results show that of the 15 species classified a priori on a morphological basis, 13 to 16 MOTUs were identified, depending on the delimitation method used, with 13 MOTUs being evidenced by ASAP, 16 by Optimal Threshold, 14 MOTUs by PTP and 15 MOTUs by GMYC. After a consensus analysis, six MOTUs considered as probable new species were identified, which are: *Hypostomus* sp.1 and *Hypostomus* sp.2 from the Branco River, *Hypostomus* sp.3 from the Juruena River, *Hypostomus* sp.4 from the Araguaia River, *Hypostomus* sp.5 from the Cabaçal River and *Hypostomus* sp.6 from the Branco River. The species *H. latirostris* (Cuiabá river) and *H. cf latirostris* (Coxipó river), presented incongruent results, since the ASAP and PTP analyzes grouped these species in a single MOTU; in the analysis with GMYC, which also presented an incongruous result, only two specimens of the 13 *H. latirostris* sequences clustered with *H. cf latirostris*. The Optimum Threshold analysis was the closest to the nominal designation, delimiting the species as distinct species. The Optimal Threshold (OT) value was 1.53%; this value delimits the intra and interspecific genetic distances. The mean interspecific genetic distance ranged from 0.85% between *H. latirostris* from the Cuiabá river and *H. cf latirostris* from the Coxipó do Ouro river, to 9.15% between *Hypostomus* sp.2 from the Branco river and *H. cf hemicochliodon* from a tributary of the Madeira and Juruena rivers. The intraspecific variation ranged from 0% in *H. cf latirostris* from Coxipó do Ouro river and five other species, to 0.41% in *H. latirostris* Cuiabá river. The results presented show that, for the locations studied, the number of known species for the genus is underestimated, requiring further studies to know the real diversity of the genus. In addition, the use of the DNA Barcode technique is efficient in the search for tools to better diagnose this complex group of Neotropical fish.

Keywords: Genetic analysis, DNA barcoding, Molecular Operational Taxonomic Units

1. INTRODUÇÃO

Com cerca de 217 espécies, o gênero de cascudos neotropicais *Hypostomus* é um dos mais diversos de peixes de água doce da região Neotropical (Lujan et al. 2015; Froese e Pauly 2023). Pertence à família Loricariidae cuja característica morfológica é de fácil reconhecimento, pois apresenta boca em formato de ventosa e corpo revestido de placas ósseas (Montoya-Burgos 2003; Froese e Pauly 2022). Loricariidae abriga 115 gêneros e 1.044 espécies válidas, a família está dividida em seis subfamílias: Lithogeninae, Rhineleporinae, Delturinae, Loricariinae, Hypoptopomatinae e Hypostominae (Provenzano et al. 2003; Luja et al. 2015; Frickie et al. 2023). Hypostominae encontra-se dividida em cinco tribos: Corymbophanini, Rhineleporini, Hypostomini, Ancistrini e Pterygoplichthyini (Armbruster 2004). Hypostomini abriga apenas o gênero *Hypostomus* que por sua vez é o gênero alvo deste estudo (Armbruster 2004). *Hypostomus* foi descrito pela primeira vez por Linnaeus 1758, em 2020 De Queiroz et al. utilizaram uma filogenia multilocus e propuseram o gênero como um grupo monofilético.

Hypostomus tem preferência por água corrente e não apresentam comportamento migratório, entretanto, a facilidade em adaptar-se a diferentes habitats aquáticos facilita sua colonização (Weber 2003; Luís Alves 2005). Podem ser encontrados desde os rios costeiros da Costa Rica, algumas ilhas do Caribe e na Argentina, apresentam ampla distribuição geográfica sendo encontrados na maioria das bacias dos rios neotropicais (Montoya-Burgos 2003). São peixes herbívoros ou detritívoros, que possuem o hábito de ficarem no fundo dos rios, estão presentes em uma variedade de habitats, como lagos de várzea, canais profundos de rios, pequenos riachos e cachoeiras (Weber 2003; Silva et al. 2016). Com exceção de *Hypostomus watwata* Hancock 1828 que vivem em águas estuárias, as espécies de *Hypostomus* são restritas a habitats de água doce (Weber 2003).

Hypostomus possuem características morfológicas que facilitam sua adaptação ao ambiente, como: a boca em formato de ventosa, dentes de coroa bífida, a presença de odontódeos ao longo de seu corpo, bem como de placas ósseas (De Almeida e De Resende 2012). Seu tamanho pode variar de 4,2 cm até 70 cm de comprimento (Reis et al. 2003). Esses indivíduos têm como nome popular a designação de: cascudo, acarís, bodós e *catfish*.

Diante da vasta diversidade existente para *Hypostomus* a discriminação correta das espécies que pertencem ao gênero nem sempre é uma tarefa fácil, uma vez que, estes

peixes podem apresentar similaridade morfológica e divergência genética dentro da mesma espécie, assim como, também podem apresentar espécies diferentes com divergência morfológica e similaridade genética, sendo os espécimes alocados dentro de uma mesma Unidade Taxonômica Operacional Molecular (MOTU), por exemplo (Baumgärtner et al. 2014; Lara Kamei et al. 2017; De Paula et al. 2022).

Nesse sentido, as técnicas moleculares vêm sendo empregadas para melhor compreender as mudanças que vem ocorrendo ao longo do tempo em diversas espécies e podem ser ferramentas úteis para compreender os limites taxonômicos em *Hypostomus*, (Arruda et al. 2019; Braga et al. 2021). O DNA *barcoding* é uma técnica para identificação molecular, relativamente rápida, que consiste na utilização de um gene mitocondrial codificador de proteínas, Citocromo c Oxidase I (COI) (Hebert et al. 2005; Tresbach et al. 2015). O COI vem sendo empregado na delimitação e um auxílio na descrição de novas espécies, o que vem contribuindo para a identificação das espécies e resolução dos problemas em grupos cuja distinção morfológica é complexa (Rosa e Paiva 2009).

Concomitante as técnicas moleculares, temos as abordagens metodológicas empregadas no tratamento dos dados genéticos, esses métodos que visam a delimitação das espécies possuem duas principais abordagens, sendo uma baseada em distância genética e outra em coalescência e juntos, os métodos têm se mostrado bastante resolutivos nos trabalhos de identificação molecular. Diante da mega diversidade e das incertezas taxonômicas que cercam as espécies de *Hypostomus*, e considerando que estudos moleculares são fundamentais na diagnose de espécies conflituosas, o presente estudo teve como objetivo empregar a metodologia do DNA *barcoding* para investigar a diversidade existente para as espécies de *Hypostomus* presentes nos afluentes das Bacias do Alto rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo e coleta de *Hypostomus*

Um total de 57 indivíduos de *Hypostomus* foram coletados em diferentes afluentes das bacias hidrográficas do Alto rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia (Figura 1 e Apêndice A). Sequências de DNA advindos do banco de dados genéticos *Bold Systems* (<https://www.boldsystems.org/index.php/databases>) foram coletados em diferentes bacias hidrográficas ao longo da América do Sul (Apêndice B). Os indivíduos

foram identificados, *a priori*, com base em sua morfologia externa (Figuras 2 e 3). Os espécimes estão armazenados no Laboratório de Citogenética e Genética Animal (LabGen) localizado no Instituto de Biociências (IB) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

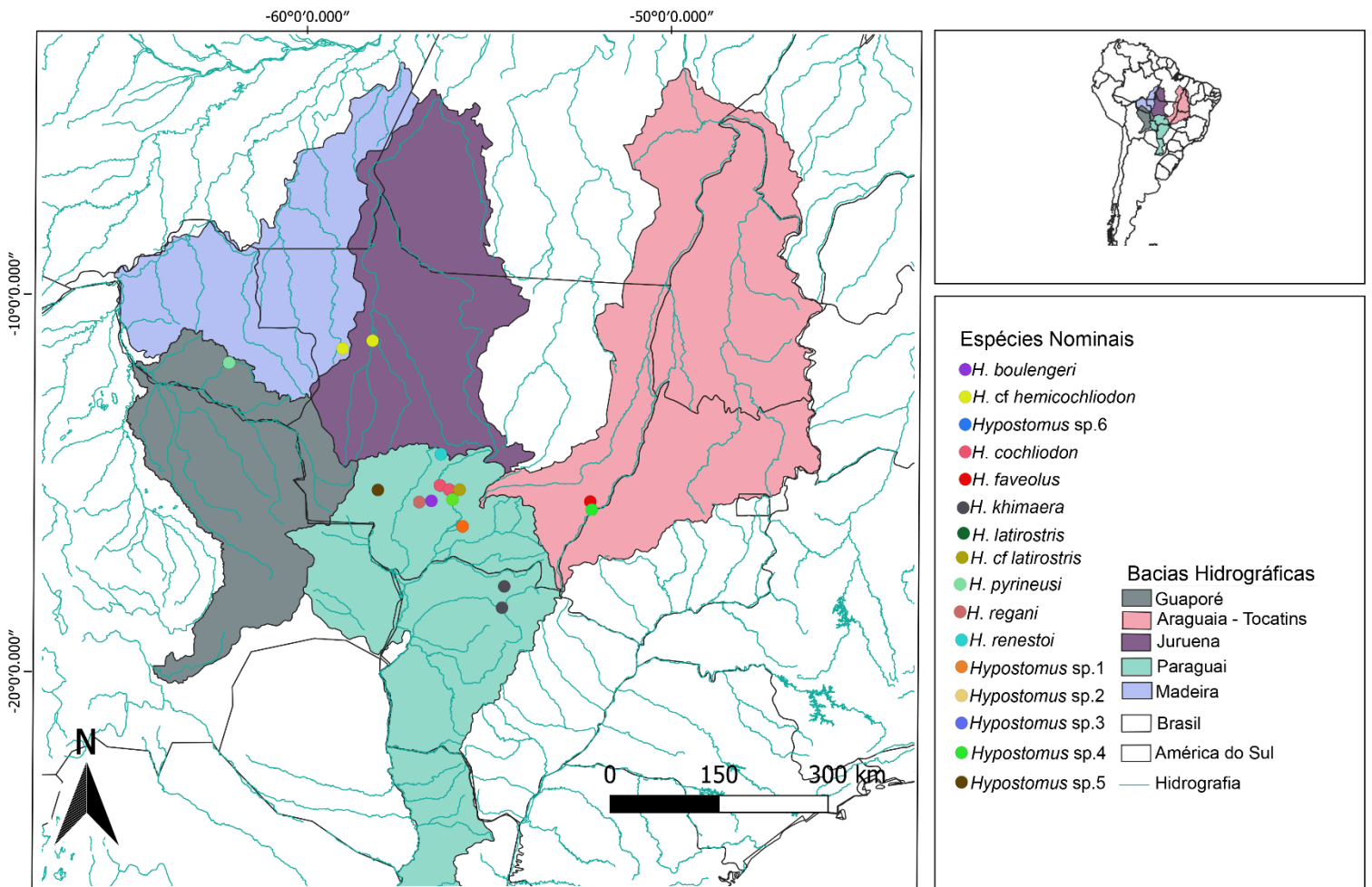


Figura 1: Distribuição das espécies de *Hypostomus* utilizadas neste trabalho, coletadas em afluentes das bacias do Alto Rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia.

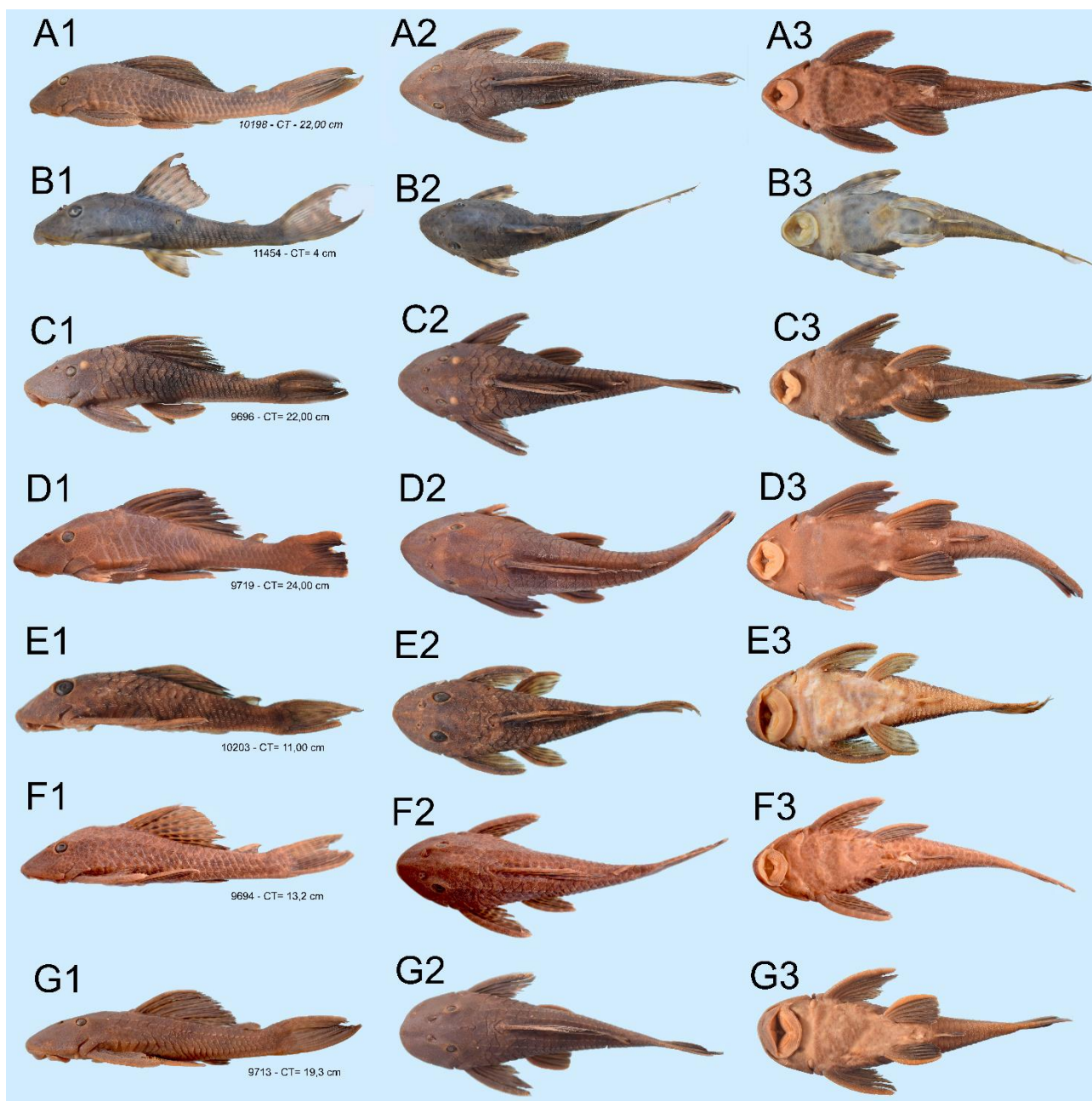


Figura 2: Exemplos de *Hypostomus* utilizados neste estudo. A: *Hypostomus* cf. *hemicochliodon*. B: *H. khimaera*. C: *Hypostomus* sp.6. D: *H. pyrineusi*. E: *Hypostomus* sp.3. F: *H. boulengeri* e G: *Hypostomus* sp.1. Na coluna da esquerda, todas as espécies em vista lateral, na coluna central, todas em vista dorsal e na coluna da direita, todas em vista ventral. As espécies estão posicionadas de acordo com a sua disposição (MOTU) no dendrograma.

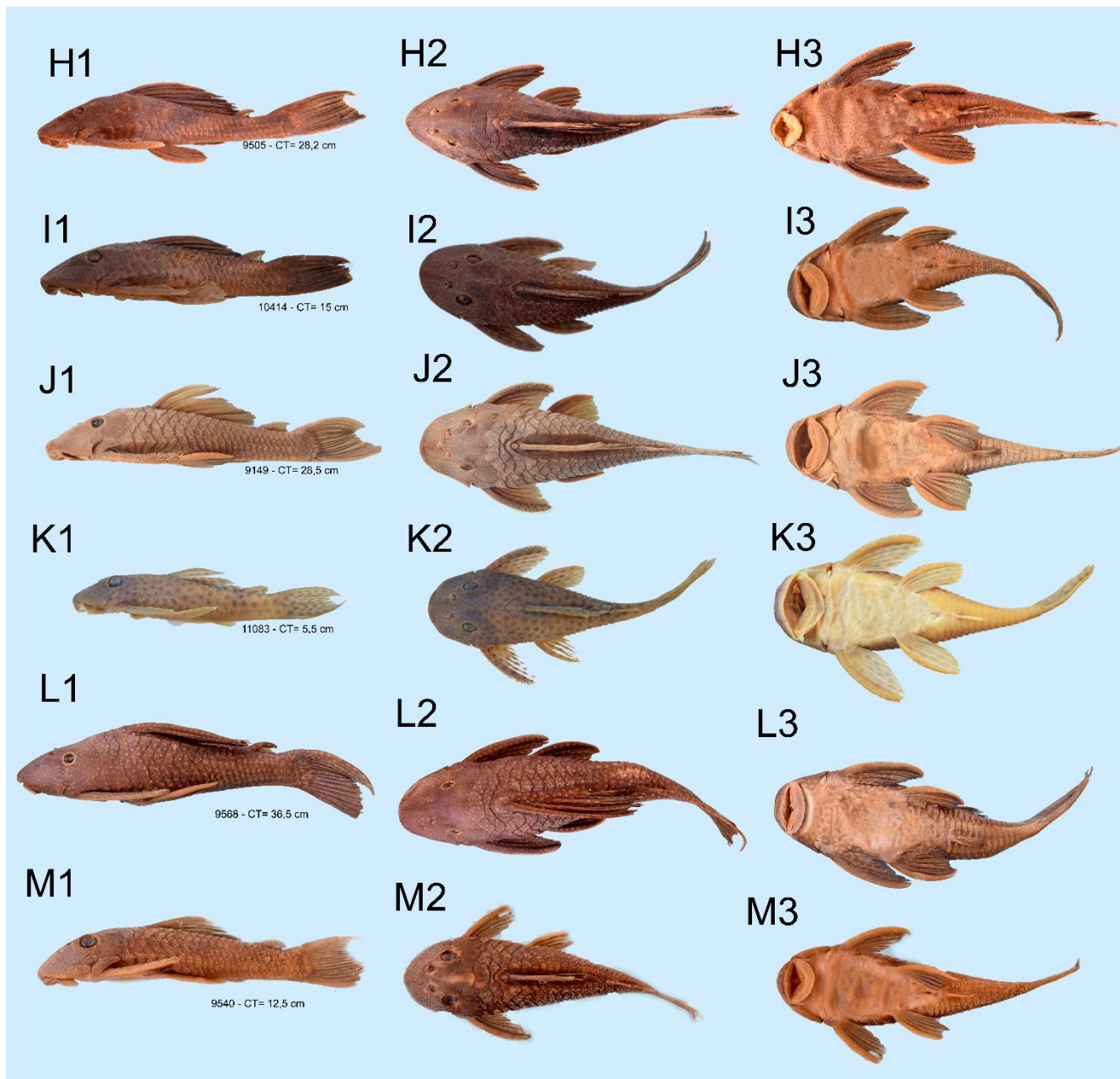


Figura 3: Exemplos de *Hypostomus* utilizados neste estudo. H: *Hypostomus faveolus*. I: *H. renestoi*. J: *H. latirostris*. K: *H. cf. latirostris*. L: *H. regani* e M: *Hypostomus* sp.4. Na coluna da esquerda, todas as espécies em vista lateral, na coluna central, todas em vista dorsal e na coluna da direita, todas em vista ventral. As espécies estão posicionadas de acordo com a sua disposição (MOTU) no dendrograma.

2.2. Procedimentos laboratoriais

O material genético de todos os 57 indivíduos foi extraído conforme o protocolo de extração salina (Aljanabi e Martinez 1997). O DNA obtido foi amplificado utilizando o gene mitocondrial Citocromo c Oxidase I (COI) através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes primers *FishF1* (5'-TCA ACC AAC CAC

AAA GAC ATT GGC AC-3') e *FishR1* (5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3') (Ward et al. 2005).

A técnica de PCR foi feita em um volume final de 25 µl contendo 1,5 µl de dNTP (1,25mM), 2,5 µl de tampão (10X), 0,5 µl do *primer* iniciador COI *Fish-F1* (10mM), 0,5 µl do *primer* COI *Fish-R1* (10 mM), 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,2 µl de Taq DNA Polimerase (Recombinante/Platinum – Invitrogen 5 U/µl), 1 µl de DNA e água ultrapura para completar o volume final. As reações foram amplificadas em um termociclador (*Applied Biosystems*, Veriti), com desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento de 50°C por 60 segundos e extensão de 72°C por 40 segundos, com extensão final de 72°C por sete minutos.

Os produtos da PCR amplificados, foram visualizados em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos de PCR foram preparados e enviados para a empresa BPI Biotecnologia Botucatu, São Paulo, Brasil para a realização da técnica de purificação e sequenciamento do DNA.

2.3. Análise de dados moleculares

As sequências de DNA foram editadas manualmente por meio do *software* *Geneious*® 7.1.3 (Kearse et al. 2012) e alinhadas pelo algoritmo *Muscle* (Edgar 2004). Também foi verificado através do *software* *Dambe* (Xia et al. 2003) o nível de saturação das sequências de nucleotídeos. Com o auxílio do modelo Kimura-2-Parameter (Kimura 1980) no programa MEGA11 foi estimado os valores das distâncias genéticas intra e interespecífica.

O Ótimo *Threshold* (OT) foi gerado com o auxílio do pacote *Spider* (*SPecies IDentify and Evolutions in R*) (Brown et al. 2012) utilizando a função “LocalMinima” no programa *R Studio* (<http://www.rstudio.com/>). O limiar de OT foi calculado a partir de um alinhamento final como matriz utilizado para a delimitação de espécies. Com o valor de OT e com o auxílio do programa JMotu (Jones et al. 2011) foram plotadas as MOTUs baseadas em distância genética.

Além disso, também foi feita a análise baseada em distância genética, ASAP, que constrói partições de espécies a partir de alinhamentos de sequências de *locus* único formando as Unidades Operacionais Taxonômicas Moleculares (MOTUs) (Puillandre et al. 2021). O ASAP foi executado na página

<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>, após carregar o arquivo contendo o alinhamento final foi selecionado o método Kimura (K80) ts/tv e foi gerado um arquivo *output* com as MOTUs baseadas nas sequências de DNA do alinhamento final.

Já no âmbito das análises coalescentes, o programa *JModeltest2* v. 2.1.4 (Darriba et al. 2012) definiu qual modelo evolutivo melhor se ajustou para o nosso conjunto de dados (HKY+I+G). Em seguida, construímos uma árvore não ultramétrica no site <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/> (Guindo e Gascuel 2003) baseado em nosso modelo evolutivo (HKY+I+G), cujo valor de *gamma shape* foi gerado pelo programa *JModeltest2*, com suporte de 1000 réplicas de *bootstrap* e demais configurações deixadas em *default*. Como grupo externo, utilizamos uma sequência do *Bold* de *Pterygoplichthys etentaculatus* (Nº de registro *Bold* BSB073-10). Através dessa árvore não ultramétrica realizamos a análise do PTP (*Poisson Tree Processes*) para a delimitação de espécies (Zhang et al. 2013) por meio do site <https://species.h-its.org/> seguindo os seguintes parâmetros: enraizada, 400.000 gerações de MCMC e no final da análise o grupo externo foi removido e os demais parâmetros foram deixados em *default*.

Já o modelo filogenético *Generalized Mixed Yule* (GMYC) foi usado para delimitar os grupos de espécies e identificação das MOTUs, uma árvore ultramétrica foi gerada no *Beast* v2.6.6, com valores de *gamma* do modelo evolutivo (HKY+I+G), relógio molecular relaxado com distribuição log normal e modelo de especiação *birth-death*. Os parâmetros foram executados três vezes de forma independente, iniciados através de árvores aleatórias com 30 milhões de gerações (MCMC) cada. Os resultados dos três arquivos com a extensão log foram visualizados utilizando o programa *Tracer* v 1.6 para termos certeza quanto a confiabilidade dos resultados. Após o término das três corridas no programa *Beast*, as mesmas foram combinadas no programa *LogCombiner*, sendo que 25% (*burn-in*) das topologias foram descartadas de cada arquivo, uma vez que essa etapa inicial de exploração dos dados pelo programa, que ainda está em ascendência, acaba gerando ruídos aos resultados. Além disso, os três arquivos com extensão “.tree” também foram combinados, por meio do *software Treeannotator* v.1.8. O resultado da combinação destes três arquivos foi visualizado no programa *FigTree* v.1.4 e salva com extensão “.Newick”. Em seguida, essa árvore foi usada na análise de GMYC no programa *R Studio*, através do pacote *SPLITS* (*SPecies Limits by Threshold Statistics*) (Monaghan et al. 2009), com o emprego do modelo de *Threshold* único. As MOTUs consenso foram geradas de acordo com a congruência entre os métodos de delimitação de espécies

utilizados (ASAP, OT, PTP e GMYC), e foram consideradas congruentes quando três dos quatro métodos empregados apresentaram o mesmo resultado; foi usado também as distâncias genéticas inter e intraespecíficas e determinação nominal das espécies na resolução das MOTUs consideradas incongruentes.

3. RESULTADOS

No total, foram identificados, com base em dados morfológicos, 15 espécies nominais de *Hypostomus*. O alinhamento final das 57 sequências do gene COI gerou fragmentos compostos por 614 pares de base, tamanho esse suficiente para validar as sequências, como sequências *barcode* (Hebert et al. 2003), as mesmas foram utilizadas nas análises de delimitação de espécies. Não foram observadas inserções, deleções ou *stop codons* nas sequências analisadas, o que indica a boa qualidade dos fragmentos de DNA estudados. Além disso, foram extraídas do banco de dados genéticos mitocondriais *Bold Systems*, 166 sequências de *Hypostomus*, a fim de comparação com as amostras deste estudo, ao todo, obtivemos 223 sequências do gene COI com 579 pares de base, sendo identificadas 39 MOTUs consenso (Apêndice B). Contudo, como não tínhamos acesso aos *vouchers* dessas sequências, utilizamos apenas para confirmar se o nosso conjunto de dados eram MOTUs distintas das depositadas nos bancos genéticos. Dessa forma, para os resultados descritos abaixo, foi considerado apenas o conjunto de dados amostrados no presente trabalho.

As sequências não apresentaram saturação de substituição de nucleotídeos. Os valores de Iss (*Index of Substitution Saturation*) ($R^2=0,151$) foram menores que o valor de Iss.c ($R^2=0,739$) o que indica a viabilidade das sequências para as análises de delimitação de espécies. O valor do Ótimo *Threshold* (OT) definido pelo pacote *Spider* por meio da função Local mínima foi de 0,0153 (1,53%), que representa o valor em porcentagem que delimita as distâncias genéticas intra e interespecíficas para o conjunto de dados deste estudo.

Os resultados das médias baseadas em distâncias genéticas interespecíficas e intraespecíficas das espécies nominais podem ser observados na (Tabela 1). A variação interespecífica foi de 0,85% entre *Hypostomus latirostris* (Cuiabá, São Gonçalo Beira Rio, rio Cuiabá, bacia do Paraguai) e *H. cf. latirostris* (Cuiabá, rio Coxipó do Ouro, bacia do Paraguai) a 9,15% entre *Hypostomus* sp.2 (Rondônia, rio Branco, bacia do rio

Guaporé) e *H. cf. hemicochliodon* (Juína - MT, afluente da bacia dos rios Madeira e Juruena).

Com relação às distâncias intraespecíficas, a variação foi de 0% em *Hypostomus cf. latirostris* (Cuiabá, rio Coxipó do Ouro, bacia do Paraguai) a 0,41% em *H. latirostris* (Cuiabá, São Gonçalo Beira Rio, rio Cuiabá, bacia do Paraguai). Outras cinco espécies, também apresentaram distância intraespecífica de 0% (o limite das distâncias inter e intraspecíficas estão em destaque em negrito na Tabela 1).

Tabela 1: Média das distâncias genéticas utilizando o gene Citocromo c Oxidase I com base no modelo Kimura-2-Parâmetros para análise das distâncias intra (*) e interespecíficas das espécies nominais de *Hypostomus*, os números em negrito referem-se ao limite das distâncias inter e intraespecíficas.

	<i>H. cf. latirostris</i>	<i>Hypostomus</i> sp.5	<i>H. khimaera</i>	<i>H. cf. hemicochliodon</i>	<i>Hypostomus</i> sp.1	<i>Hypostomus</i> sp.2	<i>H. latirostris</i>	<i>Hypostomus</i> sp.4	<i>Hypostomus</i> sp.3	<i>H. boulengeri</i>	<i>H. renestoi</i>	<i>H. regani</i>	<i>H. pyrineusi</i>	<i>Hypostomus</i> sp.6	<i>H. faveolus</i>
<i>H. cf. latirostris</i>	0%*														
<i>Hypostomus</i> sp.5	4,59%	n/c*													
<i>H. khimaera</i>	5,47%	5,32%	0%*												
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	5,89%	5,63%	2,67%	0,18%*											
<i>Hypostomus</i> sp.1	4,78%	4,82%	3,73%	4,03%	0,17%*										
<i>Hypostomus</i> sp.2	8,40%	8,27%	9,09%	9,15%	8,09%	n/c*									
<i>H. latirostris</i>	0,85%	4,63%	5,27%	5,51%	4,35%	8,08%	0,41%*								
<i>Hypostomus</i> sp.4	5%	1,80%	4,71%	5,03%	3,84%	8,27%	4,61%	0%*							
<i>Hypostomus</i> sp.3	4,61%	4,06%	3,39%	3,17%	2,19%	7,87%	4,24%	3,88%	0%*						
<i>H. boulengeri</i>	5,44%	5,72%	4,66%	3,98%	2,96%	8,42%	5,10%	5,08%	1,85%	0,19%*					
<i>H. renestoi</i>	3,05%	3,64%	5,23%	4,72%	5,11%	8,62%	3,07%	3,83%	4,20%	5,74%	0,20%*				
<i>H. regani</i>	4,49%	1,09%	4,78%	4,89%	4,22%	8,21%	4,13%	1,39%	3,38%	5,01%	2,98%	n/c%*			
<i>H. pyrineusi</i>	6,23%	6,07%	1,99%	2,68%	3,89%	9,73%	5,78%	5,22%	3,93%	5,17%	5,55%	5,31%	0,22%*		
<i>Hypostomus</i> sp.6	5,19%	5,42%	1,40%	2,22%	3,28%	8,26%	4,79%	4,61%	2,96%	3,82%	4,75%	4,69%		0%*	
<i>H. faveolus</i>	5,18%	4,82%	3,75%	4,50%	3,83%	8,24%	4,76%	4,23%	3,50%	4,56%	4,37%	4,11%		3,68%	0%*

Os resultados dos métodos de delimitação de espécies baseados em distância genética (ASAP e Ótimo *Threshold*) e coalescência (PTP e GMYC) apresentaram certa congruência entre si, com algumas exceções. Dentre as 15 espécies identificadas *a priori* com base em características morfológicas, foram observadas no ASAP a existência de apenas 13 MOTUs; todavia, a análise do OT revelou 16 MOTUs. Os resultados das análises de coalescência (PTP e GMYC), também apresentaram congruência entre si e concordância com as identificações morfológicas, salvo algumas situações específicas. A análise do PTP revelou a presença de 14 MOTUs e o GMYC identificou 15 MOTUs (Figura 4).

AS MOTUs que apresentaram congruência com a identificação morfológica e as análises de delimitação de espécies, foram 13: MOTU 1 – *Hypostomus* cf. *hemicochliodon* (Juína - MT, afluente da bacia dos rios Madeira e Juruena), MOTU 2 - *H. khimaera* (três espécimes do rio Coxipó em Distrito da Guia Cuiabá e Jangada – MT afluentes da bacia do Paraguai e os outros dois espécimes do Córrego Último Gole – MS, bacia do rio Paraguai), MOTU 3 – *Hypostomus* sp.6 (Nova Gease d'Oeste em Alta Floresta d'Oeste - RO, rio Branco, bacia do rio Guaporé), MOTU 4 – *H. pyrineusi* (Nova Gease d'Oeste em Alta Floresta d'Oeste - RO, rio Branco, bacia do rio Guaporé), MOTU 5 - *Hypostomus* sp.3 (Fontanillas em Juína – MT, bacia do rio Juruena), MOTU 6 - *H. boulengeri* (Mimoso – MT, rio Mutum, bacia do rio Paraguai), MOTU 7 - *Hypostomus* sp.1 (Nova Gease d'Oeste em Alta Floresta d'Oeste - RO, rio Branco, bacia do rio Guaporé), MOTU 8 - *H. faveolus* (Barra do Garças – MT, córrego Taquaral, bacia do rio Araguaia), MOTU 9 - *H. renestoi* (Jangada – MT, afluente da bacia do rio Paraguai), MOTU 12 – *Hypostomus* sp.5 (Cabaçal – MT, rio Cabaçal, bacia do rio Paraguai), MOTU 13 - *H. regani* (Cuiabá, São Gonçalo Beira Rio em Cuiabá – MT, rio Cuiabá, bacia do rio Paraguai), MOTU 14 - *Hypostomus* sp.4 (Barra do Garças – MT, rio Araguaia, bacia do rio Araguaia) e MOTU 15 - *Hypostomus* sp.2 (Nova d'Oeste em Alta Floresta d'Oeste - RO, rio Branco, bacia do rio Guaporé) (Figura 4).

No total, foram identificadas 15 MOTUs consenso determinadas por meio das análises de distância e coalescência. As MOTUs consenso que apresentaram falta de congruência entre os quatro métodos foram: MOTU 10 e 11, em que os métodos ASAP e PTP consideraram como sendo uma única MOTU as espécies *Hypostomus latirostris* e *H. cf. latirostris*. Porém, na análise do GMYC 13 sequências de *H. latirostris* são alocadas em uma mesma MOTU e as outras duas sequências da mesma espécie se agrupam com

as amostras de *H. cf. latirostris*, fragmentando assim *H. latirostris* em duas MOTUs distintas. Em contrapartida, a análise do Ótimo *Threshold* foi a que mais se aproximou da designação nominal para essa espécie, pois separou os indivíduos de *H. latirostris* e *H. cf. latirostris* em MOTUs distintas. Com relação a distância interespecífica *H. latirostris* e *H. cf. latirostris* se diferenciam por 0,85%, esse valor está abaixo do limite do OT (1,53%) e do limite de 2% (Herbert et al. 2003). Com base na identificação morfológica e na análise do Ótimo *Threshold*, nós assumimos a espécie *H. latirostris* e *H. cf. latirostris* como espécies distintas. A MOTU 12 e 13 (*Hypostomus* sp.5 e *H. regani*), apresentou incongruência apenas no ASAP, e apesar da distância interespecífica ter dado um resultado abaixo (1,09%) do *Threshold* de 1,53%, os demais métodos de análises genéticas foram congruentes entre si, demonstrando que são espécies distintas (Figura 4).

Os resultados ainda evidenciam que há, provavelmente, seis novas espécies, que apresentam congruência entre os métodos empregados no presente trabalho, são elas: MOTU 3 *Hypostomus* sp.6 do rio Branco em Rondônia, bacia do Guaporé; MOTU 5 representada por *Hypostomus* sp.3 coletada no distrito de Fontanillas em Juína afluente da bacia do rio Juruena; MOTU 7 *Hypostomus* sp.1, coletada no rio Branco em Rondônia, Bacia do rio Guaporé; MOTU 12 *Hypostomus* sp.5, coletada no rio Cabaçal em Mato Grosso na bacia do Paraguai; MOTU 14 *Hypostomus* sp.4 afluente da bacia do rio Araguaia e MOTU 15 *Hypostomus* sp.2 coletada no rio Branco em Rondônia, Bacia do rio Guaporé (Figura 4).

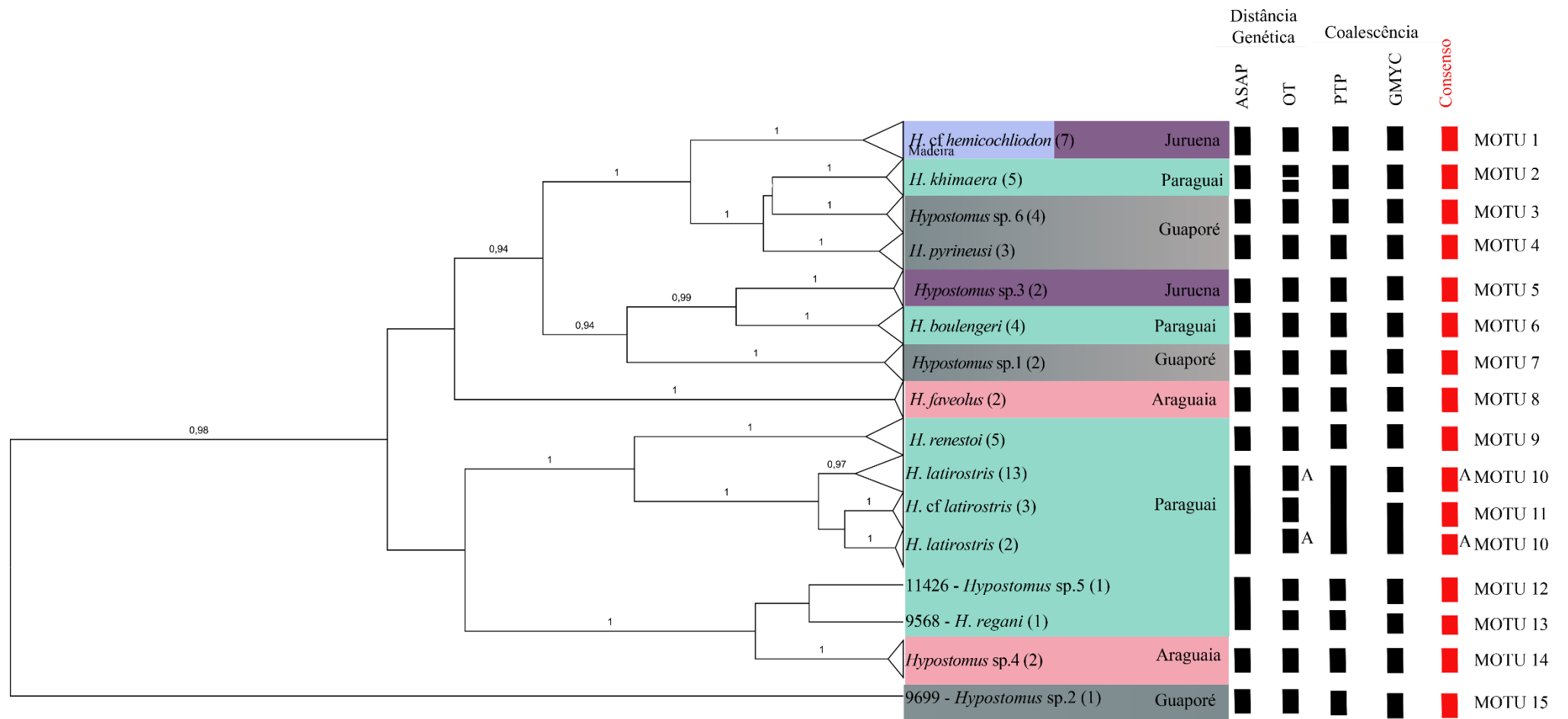


Figura 4: Dendrograma gerado através da análise bayesiana de *Hypostomus* obtida com base em dados do gene COI. As barras de cor preta representam as Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) construídas por meio dos métodos de delimitação de espécies (distância genética e coalescência), as letras ao lado de algumas barras determinam que as mesmas pertencem a uma única MOTU na análise. Já as barras de coloração vermelha representam as MOTUs consenso, definidas com base na congruência entre os métodos de delimitação de espécies aplicadas neste trabalho.

4. DISCUSSÃO

A questão acerca da identificação das espécies de *Hypostomus* é relativamente complexa tanto para os taxonomistas quanto para os geneticistas, uma vez que, as espécies pertencentes a esse gênero possuem uma taxonomia confusa, com diferenças morfológicas em alguns casos expressas de forma sutil, tornando um desafio a delimitação das espécies com base apenas em sua morfologia (Maurutto et al. 2012; Cardoso et al. 2019; Mezzomo et al. 2020). Essa diversidade de formas em *Hypostomus* pode ser explicada por sua história biogeográfica, que começou aproximadamente 12,5 milhões de anos atrás, na qual, o gênero passou por uma dispersão transcontinental com taxas aceleradas de especiação e diversificação na forma do corpo (Silva et al. 2016).

Especificamente para a bacia do Prata, a diversificação neste grupo também pode ser explicada pela ocupação que as espécies ancestrais de *Hypostomus* fizeram no Alto rio Paraná e, a partir daí, seus descendentes migraram para a bacia do Prata quando o nível do mar regrediu, abrindo assim oportunidades de especiação para o grupo (Cardoso et al. 2021). De acordo com esses mesmos autores, o rio Paraná agiu como um corredor biogeográfico para *Hypostomus* colonizar e se divergir em outros rios da bacia do Prata.

De Queiroz et al 2020, propõem para *Hypostomus* a divisão em quatro supergrupos: *H. cochliodon*, *H. plecostomus*, *H. auroguttatus* e *H. hemiurus*. Os dados apresentados nesse trabalho corroboram parcialmente essa proposição, uma vez que as espécies de *Hypostomus* analisadas se enquadram em três desses supergrupos. *H. cf. hemicochliodon* (MOTU1), *H. khimaera* (MOTU2), *H. pyrineusi* (MOTU4), que estão alocadas no supergrupo *H. cochliodon*, mais a nova espécie *Hypostomus* sp.6 (MOTU3) constituem um grupo bem definido. Já, *H. boulengeri* (MOTU6) que faz parte do supergrupo *H. plecostomus* e as candidatas a espécies novas *Hypostomus* sp.1 (MOTU7) e *Hypostomus* sp.3 (MOTU5), também formam um segundo agrupamento relativamente coeso de *H. renestoi* (MOTU9) e *H. regani* (MOTU13) pertencem ao supergrupo *H. auroguttatus*, que no presente estudo também está associado com as espécies *H. latirostris* (MOTU10), *H. cf. latirostris* (MOTU11), *Hypostomus* sp.5 (MOTU12), *Hypostomus* sp.4 (MOTU14) e *Hypostomus* sp.2 (MOTU15). *Hypostomus faveolus* é a única espécie que não corrobora os dados de De Queiroz et al 2020, pois não está associado ao supergrupo *H. auroguttatus*.

Os dados encontrados no presente trabalho também corroboram com os descritos por De Queiroz et al 2020 em relação a distribuição dos supergrupos de *Hypostomus*. De acordo com esses autores, a maior parte das espécies do supergrupo *H. cochliodon* fazem parte das drenagens Amazônicas e bacia do Prata, sendo observado também para as espécies analisadas no presente estudo, três das espécies que consideramos pertencer ao supergrupo *H. cochliodon* fazem parte de bacias que compõem a grande bacia Amazônica e apenas uma delas (*H. khimaera*) tem distribuição pela bacia do Paraguai.

A falta de congruência entre os métodos para delimitar *Hypostomus latirostris* e *H. cf. latirostris*, que se agruparam em uma mesma MOTUs nas análises do ASAP e PTP e em MOTUs distintas nas análises OT e GMYC, pode ser explicada por eventos de plasticidade fenotípica, uma vez que, para lidar com as pressões ambientais que cada habitat exige, os espécimes podem se adaptar ao ambiente alterando suas características fisiológicas, morfológicas e comportamentais, ou seja, um único genótipo pode produzir diferentes fenótipos em resposta a variação ambiental (Pigliucci 2001; Moczek et al. 2011; Wund 2012). Evento de plasticidade fenotípica já foi descrito para as populações de *H. strigaticeps* coletadas na bacia do rio Paraná (Baumgärtner et al. 2014). Plasticidade fenotípica causa divergências não só em *Hypostomus* como também em outras espécies de Loricariidae. A associação entre os estudos morfológicos e moleculares, conhecidos como taxonomia integrativa, vem sendo sugerido entre os autores como alternativa para elucidação dessas questões de plasticidades fenotípicas (Padial et al. 2010; Pereira et al. 2013).

A metodologia do DNA *barcoding*, empregada neste estudo, se mostrou eficiente para delimitar os espécimes de *Hypostomus*. Trabalhos similares com peixes neotropicais também demonstraram a eficiência dessa metodologia (Pereira et al. 2013, Arruda et al 2019, Braga et al 2021). Mezzomo et al. (2020) revisaram 51 artigos *peer-review* que se utilizam de marcadores genéticos voltados para os estudos de *Hypostomus* e concluem que apesar de haver um avanço nos trabalhos citogenéticos/moleculares neste gênero, ainda são poucos perto da demanda que o grupo exige. Logo, os dados gerados neste trabalho buscam contribuir para um melhor entendimento da diversidade de espécies de *Hypostomus* para as localidades amostradas, preenchendo assim as lacunas nos estudos para esse gênero.

Os limites de divergência genética para delimitação de espécies em peixes neotropicais é de 2% (Hebert et al. 2003; Ward et al. 2005). Apesar desse limite ser bem

estabelecido por Hebert et al. (2003), Pereira et al. (2013) sugerem que esse valor seja usado como ponto inicial, uma vez que, não é possível aplicar a todas as espécies de peixes neotropicais. De Queiroz et al. (2020) propõem que o limite clássico (2%) utilizado para delimitar as espécies pode estar subestimando o número correto das espécies de *Hypostomus*, propõem ainda, que os limites genéticos sejam analisados levando em consideração vários aspectos voltados ao processo de especiação entre as linhagens, como o tempo de divergência, monofilia recíproca e tamanho populacional (Pereira et al. 2011, 2013; Berbel et al. 2018; De Queiroz et al. 2020). No conjunto de dados analisados no presente trabalho, o limiar para delimitação das espécies de *Hypostomus* foi de 1,53%, corroborando com a proposta de De Queiroz et al (2020). Valores inferiores a 2% já foram encontrados na delimitação de espécies de *Hypostomus velhomonge* e *H. johnii* do rio Parnaíba (1,2%) (Lustosa-Costa et al. 2022), *Brycon* (1,82%) (Arruda et al. 2019), *H. jaguar* e *H. unae* (1,5) (Anjos et al. 2020).

Outro aspecto evolutivo que dificulta a identificação corretadas espécies de *Hypostomus* é a diversidade críptica, como por exemplo, nas análises morfológicas e de filogenia moleculares baseadas em marcador mitocondrial *D-loop*, revelaram que *Hypostomus commersoni* está separado em dois subclados, indicando ser um complexo de espécies (Cardoso et al. 2019). A diversidade críptica não foi observada no presente estudo, todavia, no grupo dos *Hypostomus* parece ser um fator limitante na identificação precisa das espécies. Associar diferentes técnicas (morfologia e genética) para a identificação das espécies é de extrema importância, principalmente para um grupo tão diverso como os *Hypostomus*. Além disso, a correta identificação dos espécimes, gera conhecimento sobre a diversidade da ictiofauna e consequentemente sobre a história biogeográfica das bacias hidrográficas neotropicais (Cardoso et al. 2019).

As análises de delimitação de espécies propostas no presente estudo corroboraram, em sua maioria, com a designação nominal proposta *a priori* para os espécimes de *Hypostomus*. Nosso conjunto de dados evidência que há seis novas espécies candidatas de *Hypostomus*, mostrando que a diversidade existente para o gênero ainda está subestimada para a região amostrada. Revisões taxonômicas e a adição de novos marcadores moleculares são necessárias para melhor reconhecer essas espécies e suas relações dentro do gênero.

5. CONCLUSÕES

Com base na metodologia do DNA *barcoding* e nos diferentes métodos de delimitação de espécies, o conjunto de dados analisados evidenciam que para as localidades amostradas a diversidade de *Hypostomus* encontra-se subestimada, visto que, existem seis prováveis novas espécies para o gênero, o que faz necessário mais estudos para sabermos se de fato trata-se de novas espécies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abilhoa, V., Valduga, M. O., Frehse, F. D. A., Vitule, J. R. (2016). Use of food resources and resource partitioning among five syntopic species of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) in an Atlantic Forest river in southern Brazil. *Zoologia (Curitiba)*, 33.
- Aljanabi, S. M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22), 4692-4693.
- Anjos, M. S., Bitencourt, J. A., Nunes, L. A., Sarmento-Soares, L. M., Carvalho, D. C., Armbruster, J. W., Affonso, P. R. (2020). Species delimitation based on integrative approach suggests reallocation of genus in Hypostomini catfish (Siluriformes, Loricariidae). *Hydrobiologia*, 847, 563-578.
- Aparecida Perna, S., Fernandes, M. N. (1996). Gill morphometry of the facultative air-breathing loricariid fish, *Hypostomus plecostomus* (Walbaum) with, special emphasis on aquatic respiration. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(3), 213-220.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Armbruster, J. W. (2003). *The species of the Hypostomus cochliodon group* (Siluriformes: Loricariidae). Magnolia Press.
- Armbruster, J. W. (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141(1), 1-80.
- Artoni, R. F., Bertollo, L. A. C. (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia*, 49(1), 81-90.
- Artoni, R. F., Carlos Bertollo, L. A. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134(3), 201-210.
- Arruda, P. S., Ferreira, D. C., Oliveira, C., Venere, P. C. (2019). DNA barcoding reveals high levels of divergence among mitochondrial lineages of Brycon (Characiformes, Bryconidae). *Genes*, 10(9), 639.
- Avise, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*, 36(1), 3-15.

- Azeredo, A. M. L. (2005). O Código de barras da vida baseado no DNA “Barcoding of Life”: considerações e perspectivas. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. SP, CBMEG UNICAMP.
- Baumgartner, G., Pavanelli, C. S., Baumgartner, D., Bifi, A. G., Debona, T., Frana, V. A. (2012). *Peixes do baixo rio Iguaçu*. Eduem.
- Baumgaertner, L., Paiz, L. M., Zawadzki, C. H., Margarido, V. P., Portela Castro, A. L. D. B. (2014). 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*, 11(5), 479-487.
- Braga, G. S., Ferreira, D. C., Marques, D. K., Centofante, L., Carvalho, F. R., Venere, P. C. (2021). *Gymnotus paraguensis*, a Good Example of Phenotypic Plasticity in the Pantanal Biome, Brazil. *Zebrafish*, 18(2), 162-173.
- Berbel-Filho, W. M., Ramos, T. P., Jacobina, U. P., Maia, D. J., Torres, R. A., Lima, S. M. (2018). Updated checklist and DNA barcode-based species delimitations reveal taxonomic uncertainties among freshwater fishes from the mid-north-eastern Caatinga ecoregion, north-eastern Brazil. *Journal of fish biology*, 93(2), 311-323.
- Britski, H. A., Silimon, K. Z. S., Lopes, B. S. (2007). *Peixes do Pantanal: Manual de Identificação*, 2nd edição. *EMBRAPA, Brasília: 227pp*.
- Brown, S.D.J., Collins, R.A., Boyer, S., Lefort, M.C., Malumbres-Olarte, J., Vink, C.J. and Cruickshank, R.H. (2012). Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12: 562–565.
- Buckup, P. A., Menezes, N. A., Ghazzi, M. S. A. (2007). *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil (Vol. 23)*. Rio de Janeiro: Museu Nacional.
- Cardoso, Y. P., Brancolini, F., Protogino, L., Paracampo, A., Bogan, S., Posadas, P., Montoya-Burgos, J. I. (2019). An integrated approach clarifies the cryptic diversity in *Hypostomus* Lacépède 1803 from the Lower La Plata Basin. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.
- Cardoso, Y. P., Jardim de Queiroz, L., Bahechar, I. A., Posadas, P. E., Montoya-Burgos, J. I. (2021). Multilocus phylogeny and historical biogeography of *Hypostomus* shed light on the processes of fish diversification in La Plata Basin. *Scientific Reports*, 11(1), 5073.
- Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A., De Mattia, F. (2010). DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in bioinformatics*, 11(4), 440-453.
- Darnell, R. M. (1961). Trophic spectrum of an estuarine community, based on studies of Lake Pontchartrain, Louisiana. *Ecology*, 42(3), 553-568.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772-772.
- De Almeida, I. M., De Resende, E. K. (2012). Alimentação dos peixes detritívoros da Baía Tuiuiú, rio Paraguai, Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil.

- De Queiroz, L. J., Cardoso, Y., Jacot-des-Combes, C., Bahechar, I. A., Lucena, C. A., Py-Daniel, L. R., Montoya-Burgos, J. I. (2020). Evolutionary units delimitation and continental multilocus phylogeny of the hyperdiverse catfish genus *Hypostomus*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 145.
- De Paula, G. B., Gavazzoni, M., Zawadzki, C. H., Fernandes, C. A., Portela-Castro, A. L., Lui, R. L., Margarido, V. P. (2022). Identification of cryptic species in allopatric populations of *Hypostomus tietensis* (Siluriformes: Loricariidae) through cytogenetics analyses. *Neotropical Ichthyology*, 20.
- Duarte, S., Araújo, F. G., Bazzoli, N. (2011). Reproductive plasticity of *Hypostomus affinis* (Siluriformes: Loricariidae) as a mechanism to adapt to a reservoir with poor habitat complexity. *Zoologia (Curitiba)*, 28, 577-586.
- Edgar, C. R. (2004). Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. 1792–1797.
- Ferraris, C. J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418(1), 1-628.
- Fricke, R., Eschmeyer, W.N. (Ed.), 2022. Catalog of Fishes: Genera, Species, References. Versão eletrônica acessada em. <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>, version (08/2022).
- Fricke, R., Eschmeyer, W.N. (Ed.), 2023. Catalog of Fishes: Genera, Species, References. Versão eletrônica acessada em. <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>, version (01/2023).
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1996). Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). In: Stiassny, M.L.J.; Parenti, L.R.; Johnson, G.D. (Eds). *Interrelationships of fishes*. San Diego: Academic Press, pp.209-49.
- Froese, R., Pauly, D. (2022). Editors. 2022. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (06/2022).
- Fujisawa, T., Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic biology*, 62(5), 707-724.
- Geerinckx, T., Herrel, A., & Adriaens, D. (2011). Suckermouth armored catfish resolve the paradox of simultaneous respiration and suction attachment: a kinematic study of *Pterygoplichthys disjunctivus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 315(3), 121-131.
- Gomes, I. D., Araújo, F. G., Do Nascimento, A. A., Sales, A. (2015). Equilibrium reproductive strategy of the armored catfish *Hypostomus auroguttatus* (Siluriformes, Loricariidae) in a tropical river in Southeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 98(1), 249-260.
- Guindon, S., Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5), 696-704.

- Hamilton, M. B. (2021). *Population genetics*. John Wiley & Sons.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., De Waard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology*, 2(10), e312.
- Hebert, P. D., Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, 54(5), 852-859.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96-S99.
- Jones, M., Ghoorah, A., Blaxter, M. (2011). jMOTU and taxonator: turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. *PLoS one*, 6(4), e19259.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kimura, M. A. (1980) simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p.111-120.
- Kingman, J. F. C. (1982). The coalescent. *Stochastic processes and their applications*, 13(3), 235-248.
- Lara Kamei, M. C. D. S., Baumgärtner, L., Paiva, S., Zawadzki, C. H., Martins-Santos, I. C., Portela-Castro, A. L. D. B. (2017). Chromosomal diversity of three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from the Paraná River Basin, Brazil: A species complex in *Hypostomus ancistroides* reinforced by a ZZ/ZW sex chromosome system. *Zebrafish*, 14(4), 357-363.
- Loxdale, H. D., Davis, B. J., Davis, R. A. (2016). Known knowns and unknowns in biology. *Biological Journal of the Linnean Society*, 117(2), 386-398.
- Luís Alves, A., Oliveira, C., Foresti, F. (2005). Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica*, 124, 127-136.
- Lujan, N. K., Armbruster, J. W., Lovejoy, N. R., López-Fernández, H. (2015). Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 82, 269-288.
- Lustosa-Costa, S. Y., Ramos, T. P. A., Zawadzki, C. H., Lima, S. M. Q. (2022). Review of the armoured catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Parnaíba River basin, Northeastern Brazil, with description of a new species. *Neotropical Ichthyology*, 20, e210126.

- Malabarba, L. R.; Malabarba, M. C. (2020). Phylogeny and classification of Neotropical fish. In *Biology and physiology of freshwater neotropical fish* (pp. 1-19). Academic Press.
- Mattias, A. T., Rantin, F. T., Fernandes, M. N. (1998). Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(2), 311-315.
- Maurutto, F. A. M., Manvailer, L. F. S., Sczepanski, T. S., Cestari, M. M., Artoni, R. F. (2012). Cytogenetic characterization of three allopatric species of *Hypostomus* Lacépède (1803) (Teleostei, Loricariidae). *Caryologia*, 65(4), 340-346.
- Mazzoni, R., Caramaschi, E. P. (1997). Observations on the reproductive biology of female *Hypostomus luetkeni* Lacépède 1803. *Ecology of Freshwater Fish*, 6(1), 53-56.
- Mezzomo, P., Mielniczki-Pereira, A. A., Sausen, T. L., Reppold Marinho, J., Cansian, R. L. (2020). Molecular inferences about the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae): a review. *Molecular Biology Reports*, 47(8), 6179-6192.
- Moczek, A. P., Sultan, S., Foster, S., Ledón-Rettig, C., Dworkin, I., Nijhout, H. F., Pfennig, D. W. (2011). The role of developmental plasticity in evolutionary innovation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1719), 2705-2713.
- Montoya-Burgos JI, Muller S, Weber C, Pawlowski J (1998). Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, 363–374.
- Montoya-Burgos, J. I., Weber, C., Le Bail, P. Y. (2002). Phylogenetic relationships within *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and related genera based on mitochondrial D-loop sequences. *Revue suisse de Zoologie*, 109(2), 369-382.
- Montoya-Burgos, J. I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12: 1855-1867.
- Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J., Vogler, A. P. (2009). Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic biology*, 58(3), 298-311.
- Nelson, J. S. (Ed.). (2006). *Fishes of the world*. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, p.708.
- Padial, J. M., Miralles, A., Dela Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology*, 7(1), 1-14.
- Paiva, S. D., Renesto, E., Zawadzki, C. H. (2005). Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 370-375.
- Parente, T. E. M., De-Oliveira, A. C. A. X., Beghini, D. G., Chapeaurouge, D. A., Perales, J., Paumgartten, F. J. R. (2009). Lack of constitutive and inducible ethoxyresorufin-O-

deethylase activity in the liver of suckermouth armored catfish (*Hypostomus affinis* and *Hypostomus auroguttatus*, Loricariidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 150(2), 252-260.

Pereira, L. H., Maia, G. M., Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate fresh water fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial Dna*, 22(sup1), 71-79.

Pereira, L. H., Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna. *BMC genetics*, 14, 1-14.

Pérez-Ponce de León, G., Poulin, R. (2016). Taxonomic distribution of cryptic diversity among metazoans: not so homogeneous after all. *Biology letters*, 12(8), 371.

Pessoa, E. K. R., de Lima, L. T. B., Chellappa, N. T., de Souza, A. A., Chellappa, S. (2013). Aspectos alimentares e reprodutivos do cascudo, *Hypostomus puarum* (Starks, 1913) (Osteichthyes: Loricariidae) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. *Biota Amazônia* (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota), 3(3), 45-53.

Pigliucci, M. (2001). Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. JHU Press.

Provenzano, F., S.A. Schaefer, J.N. Baskin R. Royero-Leon, (2003). New, possibly extinct Lithogenine loricariid (Siluriformes, Loricariidae) from Northern Venezuela. *Copeia* 2003: 562–575.

Puillandre, N., Brouillet, S., Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609-620.

Ray, C. K., Armbruster, J. W. (2016). The genera *Isorineloricaria* and *Aphanotorulus* (Siluriformes: Loricariidae) with description of a new species. *Zootaxa*, 4072(5), 501-539.

Reis, R. E., Albert, J. S., Di Dario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., Rocha, L. A. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of fish biology*, 89(1), 12-47.

Reis, R.E., S.O. Kullander., C.J. Ferraris Jr, (2003). Check List of the Freshwater Fishes of South America. Edipucrs, Porto Alegre, RS.

Reis RE, Pereira EHL, Armbruster JW (2006). Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zoological Journal of the Linnean Society* 147: 277–299.

Rocha-Reis, D. A., Pasa, R., Menegidio, F. B., Heslop-Harrison, J. S., Schwarzacher, T., Kavalco, K. F. (2020). The complete mitochondrial genome of two armored catfish populations of the genus *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8.

Rosa, A. D. M., Paiva, S. R. (2009). Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico.

Roxo, F. F., Albert, J. S., Silva, G. S., Zawadzki, C. H., Foresti, F., Oliveira, C. (2014). Molecular phylogeny and biogeographic history of the armored Neotropical catfish

subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyridae (Siluriformes: Loricariidae). PLoS One, 9(8).

Rubert, M., da Rosa, R., Jerep, F. C., Bertollo, L. A. C., Giuliano-Caetano, L. (2011). Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. Comparative Cytogenetics, 5(5), 397.

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL (<http://www.rstudio.com/>).

Savage, J. M. (1995). Systematics and the biodiversity crisis. BioScience, 45(10), 673-679.

Schaefer, S. A., Lauder, G. V. (1986). Historical transformation of functional design: evolutionary morphology of feeding mechanisms in loricarioid catfishes. *Systematic Zoology*, 35(4), 489-508.

Silva, G. S., Roxo, F. F., Lujan, N. K., Tagliacollo, V. A., Zawadzki, C. H., Oliveira, C. (2016). Transcontinental dispersal, ecological opportunity and origins of an adaptive radiation in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae). Molecular ecology, 25(7), 1511-1529.

Soliman, S., Kamal, B., Abuo-Elhmad, A., Abd-Elhafeez, H. (2020). Morphological and Histochemical Characterization of the Dermal Plates of Pleco (*Hypostomus plecostomus*). Microscopy and Microanalysis, 26 (3), 551-566.

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular biology and evolution, 38(7), 3022-3027.

Tresbach, R. H., Cerqueira, N. M., Medeiros, S. R., Gutierrez, H. J. P., Hernández, N. O., Rodrigues, M. D. N. (2015). DNA barcoding: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes. Scientia Agraria Paranaensis, 14(2), 77-81.

Villares-Junior, G. A., Cardone, I. B., Goitein, R. (2016). Comparative feeding ecology of four syntopic *Hypostomus* species in a Brazilian southeastern river. Brazilian Journal of Biology, 76, 692-699.

Xia, X., Z. Xie, M. Salemi, L. Chen, Y. Wang. (2003). An index of substitution saturation and its application. Molecular Phylogenetics and Evolution 26:1-7.

Xia, X. and Lemey, P. (2009). Assessing substitution saturation with DAMBE. Pp. 615-630 in Philippe Lemey, Marco Salemi and Anne-Mieke Vandamme, eds. The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny. 2nd edition Cambridge University Press.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 360(1462), 1847-1857.

Weber, C., (2003). Family Loricariidae: Subfamily Hypostominae, pp. 351–372 in Check List of the Freshwater Fishes of South America, edited by R.E. Reis, S.O. Kullander., C.J. Ferraris Jr. Edipucrs, Porto Alegre, RS.

Wund, M. A. (2012). Assessing the impacts of phenotypic plasticity on evolution.

Zawadzki, C. H., Birindelli, J. L., Lima, F. C. (2008). A new pale-spotted species of *Hypostomus* Lacépède (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Tocantins and rio Xingu basins in central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6, 395-402.

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

Zawadzki, C. H., Birindelli, J. L., Lima, F. C. (2012). A new armored catfish species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Xingu basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 10, 245-253.

Zawadzki, C. H., da Silva, H. P., Troy, W. P. (2018). Redescription of *Hypostomus latirostris* (Regan, 1904) with the recognition of a new species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin, Brazil.

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.

6. APÊNDICES

Apêndice A: Relação dos espécimes e suas localidades de *Hypostomus* do banco de tecido, do Laboratório de Citogenética e Genética Animal (LabGen) da UFMT, obtidas das bacias hidrográficas do Alto rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia. Esta tabela não inclui os representantes de *Hypostomus* do *Bold Systems*.

Espécie	Localidade	Bacia e/ou Rio	Lat	Long	Id. Seq	NºReg Bold
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9145	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9146	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9147	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9148	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9149	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9239	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9541	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9542	-

<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9543	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9544	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9569	-
<i>H. latirostris</i>	Jangada–MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10376	-
<i>H. latirostris</i>	Jangada–MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10377	-
<i>H. latirostris</i>	Jangada–MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10381	-
<i>H. latirostris</i>	Distrito da Guia–MT	Paraguai/Coxipó Açu	-15,213240	-56,133556	10417	-
<i>H. boulengeri</i>	Mimoso–MT	Paraguai/Mutum	-16,201105	-55,50714	9438	-
<i>H. boulengeri</i>	Várzea Grande–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,392807	-56,42755	9694	-
<i>H. boulengeri</i>	Diamantino–MT	Paraguai/Diamantino	-14,243129	-56,27214	10415	-
<i>H. boulengeri</i>	Distrito da Guia–MT	Paraguai/Coxipó Açu	-15,213240	-56,133556	10423	-
<i>H. faveolus</i>	Barra do Garças–MT	Araguaia/Taquaral	-15,403265	-52,174169	9505	-
<i>H. faveolus</i>	Barra do Garças–MT	Araguaia/Taquaral	-15,403265	-52,174169	9506	-
<i>Hypostomus</i> sp.1	Nova Gease d'Oeste Alta-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9713	-
<i>Hypostomus</i> sp.1	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9728	-
<i>Hypostomus</i> sp.2	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/rio Branco	-11,562510	-62,21267	9699	-
<i>Hypostomus</i> sp.3	Juína (Distrito Fontanillas)-MT	Juruena	-11,201994	-58,20929	10201	-
<i>Hypostomus</i> sp.3	Juína (Distrito Fontanillas)-MT	Juruena	-11,201994	-58,20929	10203	-
<i>Hypostomus</i> sp.4	Barra do Garças–MT	Araguaia/Araguaia	-15,533422	-52,151078	9539	-
<i>Hypostomus</i> sp.4	Barra do Garças–MT	Araguaia/Araguaia	-15,533422	-52,151078	9540	-
<i>Hypostomus</i> sp.6	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9695	-
<i>Hypostomus</i> sp.6	Nova Gease d'Oeste -RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9696	-
<i>Hypostomus</i> sp.6	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9697	-

<i>Hypostomus</i> sp.6	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9703	-
<i>H. pyrineusi</i>	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9719	-
<i>H. pyrineusi</i>	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9720	-
<i>H. pyrineusi</i>	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9725	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10195	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10196	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10197	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10198	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10199	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10200	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,201994	-58,20929	10202	-
<i>H. renestoi</i>	Jangada-MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10375	-
<i>H. renestoi</i>	Jangada-MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10380	-
<i>H. renestoi</i>	Jangada-MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10396	-
<i>H. renestoi</i>	Diamantino-MT	Paraguai/Diamantino	-14,243129	-56,27214	10414	-
<i>H. renestoi</i>	Diamantino-MT	Paraguai/Diamantino	-14,243129	-56,27214	10416	-
<i>H. cochliodon</i>	Jangada-MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10383	-
<i>H. cochliodon</i>	Jangada-MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10386	-
<i>H. cochliodon</i>	Distrito da Guia- MT	Paraguai/Coxipó	-15,213240	-56,133556	10422	-
<i>H. regani</i>	São Gonçalo beira rio-MT	Paraguai/Cuiabá	-15,689781	-57,060000	9568	-
<i>H. cf. latirostris</i>	Coxipó do Ouro- MT	Paraguai/Coxipó do Ouro	-15,360144	-55,933308	11083	-
<i>H. cf. latirostris</i>	Coxipó do Ouro- MT	Paraguai/Coxipó do Ouro	-15,360144	-55,933308	11084	-
<i>H. cf. latirostris</i>	Coxipó do Ouro- MT	Paraguai/Coxipó do Ouro	-15,360144	-55,933308	11086	-

<i>Hypostomus</i> sp.5	Cabaçal–MT	Paraguai/Cabaçal	-15,366122	-58,212131	11426	-
<i>H. khimaera</i>	MS	Paraguai/Córrego Último Gole	-17,928722	-54,691861	11454	-
<i>H. khimaera</i>	MS	Paraguai/Córrego Criminoso	-18,490278	54,753917	11458	-

Apêndice B: Relação dos espécimes de *Hypostomus* e suas localidades, do banco de tecido do Laboratório de Citogenética e Genética Animal (LabGen) da UFMT, obtidas das bacias hidrográficas do Alto rio Paraguai, Guaporé, Juruena, Madeira e Araguaia, além de outras localidades que foram extraídas do banco de dados genéticos *Bold Systems*.

Espécie	Localidade	Bacia e/ou Rio	Lat	Long	Id. Seq	NºReg Bold
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9145	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9146	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9147	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9148	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9149	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9239	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9541	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9542	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9543	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9544	-
<i>H. latirostris</i>	Nossa Sra. Do Livramento–MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9569	-
<i>H. latirostris</i>	Jangada–MT	Paraguai	-15,143075	-56,29007	10376	-
<i>H. latirostris</i>	Jangada–MT	Paraguai	-15,143075	-56,29007	10377	-
<i>H. latirostris</i>	Jangada–MT	Paraguai	-15,143075	-56,29007	10381	-

<i>H. latirostris</i>	Distrito da Guia–MT	Paraguai/Coxipó Açú	-15,213240	-56,133556	10417	-
<i>H. boulengeri</i>	Mimoso–MT	Paraguai/Mutum	-16,201105	-55,50714	9438	-
<i>H. boulengeri</i>	Várzea Grande-MT	Paraguai	-15,392807	-56,42755	9694	-
<i>H. boulengeri</i>	Diamantino-MT	Paraguai	-14,243129	-56,27214	10415	-
<i>H. boulengeri</i>	Distrito da Guia–MT	Paraguai/Coxipó Açú	-15,213240	-56,133556	10423	-
<i>H. faveolus</i>	Barra do Garças-MT	Araguaia/Taquaral	-15,403265	-52,174169	9505	-
<i>H. faveolus</i>	Barra do Garças-MT	Araguaia/Taquaral	-15,403265	-52,174169	9506	-
<i>Hypostomus</i> sp.1	Nova Gease d'Oeste-RO	Amazônica/Branco	-11,562510	-62,21267	9713	-
<i>Hypostomus</i> sp.1	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9728	-
<i>Hypostomus</i> sp.2	Rondônia/Brasil	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9699	-
<i>Hypostomus</i> sp.3	Juína-MT	Tapajós/Juruena	-11,201994	-58,20929	10201	-
<i>Hypostomus</i> sp.3	Juína-MT	Tapajós/Juruena	-11,201994	-58,20929	10203	-
<i>Hypostomus</i> sp.4	Barra do Garças-MT	Araguaia/Araguaia	-15,533422	-52,151078	9539	-
<i>Hypostomus</i> sp.4	Barra do Garças-MT	Araguaia/Araguaia	-15,533422	-52,151078	9540	-
<i>Hypostomus</i> sp.6	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9695	-
<i>Hypostomus</i> sp.6	Nova Gease d'Oeste - RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9696	-
<i>Hypostomus</i> sp.6	Nova Gease d'Oeste - RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9697	-
<i>Hypostomus</i> sp.6	Nova Gease d'Oeste - RO	Madeira/Amazônica/Branco	-11,562510	-62,21267	9703	-
<i>H. pyrineusi</i>	Nova Gease d'Oeste - RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9719	-
<i>H. pyrineusi</i>	Nova Gease d'Oeste - RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9720	-
<i>H. pyrineusi</i>	Nova Gease d'Oeste-RO	Guaporé/Branco	-11,562510	-62,21267	9725	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10195	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10196	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10197	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10198	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10199	-
<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,32674	-59,113852	10200	-

<i>H. cf. hemicochliodon</i>	Juína-MT	Madeira/Juruena	-11,201994	-58,20929	10202	-
<i>H. renestoi</i>	Jangada-MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10375	-
<i>H. renestoi</i>	Jangada-MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10380	-
<i>H. renestoi</i>	Jangada-MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10396	-
<i>H. renestoi</i>	Diamantino-MT	Paraguai/Diamantino	-14,243129	-56,27214	10414	-
<i>H. renestoi</i>	Diamantino-MT	Paraguai/Diamantino	-14,243129	-56,27214	10416	-
<i>H. cochliodon</i>	Jangada-MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10383	-
<i>H. cochliodon</i>	Jangada-MT	Paraguai/afluentes	-15,143075	-56,29007	10386	-
<i>H. cochliodon</i>	Distrito da Guia-MT	Paraguai/Coxipó	-15,213240	-56,133556	10422	-
<i>H. watwata</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni	-5,67417	-53,9464	GF98-146	GBOL3045-18
<i>H. watwata</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni	-5,67417	-53,9464	GF98-144	GBOL3044-18
<i>H. topavae</i>	Getulina-SP	Paraná	-21,4331	-50,0613	LBPV-18246	FUPR611-09
<i>H. topavae</i>	Getulina-SP	Paraná	-21,4331	-50,0613	LBPV-17214	FUPR565-09
<i>H. topavae</i>	Buritama-SP	Paraná	-21,0129	-49,6903	LBPV-17215	FUPR566-09
<i>H. topavae</i>	Buritama-SP	Paraná	-21,0129	-49,6903	LBPV-17217	FUPR568-09
<i>H. topavae</i>	Getulina-SP	Paraná	-21,4331	-50,0613	LBPV-18247	FUPR612-09
<i>H. strigaticeps</i>	Buri-SP	Paraná	-22,9356	-48,3208	LBPV-23446	FUPR601-09
<i>H. strigaticeps</i>	Campo Mourão-PR	Paraná	-23,6417	-51,859	LBPV-10982	FUPR599-09
<i>H. strigaticeps</i>	Itaí-SP	Paraná	-22,9412	-48,5844	LBPV-31518	FUPR598-09
<i>H. strigaticeps</i>	SP/Brasil	Paraná	-22,9356	-48,3208	LBPV-23445	FUPR600-09
<i>H. strigaticeps</i>	Paranapanema-SP	Paraná	-22,7843	-48,4816	LBPV-10567	FUPR602-09
<i>H. strigaticeps</i>	São Pedro-SP	Paraná	-22,3686	-47,4772	LBPV-25930	FUPR603-09
<i>H. strigaticeps</i>	São Francisco de Imbaú-PR	Paraná	-22,9392	-50,2523	LBPV-11259b	FUPR977-09
<i>H. strigaticeps</i>	PR	Paraná	-22,9392	-50,2523	LBPV-11259	FUPR605-09
<i>H. strigaticeps</i>	PR	Paraná	-22,9392	-50,2523	LBPV-11258	FUPR604-09
<i>H. strigaticeps</i>	São Francisco de Imbaú-PR	Paraná	-22,9392	-50,2523	LBPV-11258b	FUPR976-09

<i>H. strigaticeps</i>	São Francisco de Imbaú-PR	Paraná	-22,9392	-50,2523	LBPV-11257	FUPR564-09
<i>H. strigaticeps</i>	Jaguapitã-PR	Paraná/Congonhas	-23,068	-50,859	PDcon04	PDCAP254-14
<i>H. strigaticeps</i>	SP/Brasil	Paraná/Paranapanema	-	-	148PEDII	PEDII148-22
<i>H. regani</i>	São Francisco de Imbaú-PR	Paraná	-22,9392	-50,2523	LBPV-11266	FUPR587-09
<i>H. regani</i>	Prof. Jamil-GO	Paraná	-17,0994	-48,7615	LBPV-35856	FUPR584-09
<i>H. regani</i>	Prof. Jamil-GO	Paraná	-17,0994	-48,7615	LBPV-35855	FUPR583-09
<i>H. regani</i>	Distrito Industrial 2, Maringá PR	Paraná	-23,3031	-52,0317	LBPV-24686	FUPR575-09
<i>H. regani</i>	Santa Isabel do Ivaí-PR	Paraná	-22,6503	-53,0916	LBPV-3208	FUPR556-09
<i>H. regani</i>	Prof. Jamil-GO	Paraná	-17,0994	-48,7615	LBPV-35854	FUPR582-09
<i>H. regani</i>	PR	Paraná	-23,3031	-52,0317	LBPV-24689	FUPR576-09
<i>H. regani</i>	PR	Paraná	-22,9392	-50,2523	LBPV-11267	FUPR588-09
<i>H. regani</i>	Paraná/Brasil	Bacia do Alto rio Paraná	-22,9392	-50,2523	LBPV-11268	FUPR589-09
<i>H. regani</i>	Jaguapitã-PR	Paraná/Congonhas	-23,068	-50,859	PDcon01	PDCAP251-14
<i>H. regani</i>	Jaguapitã-PR	Paraná/Congonhas	-23,068	-50,859	PDcon02	PDCAP252-14
<i>H. regani</i>	Jaguapitã-PR	Paraná/Congonhas	-23,068	-50,859	PDcon03	PDCAP253-14
<i>H. regani</i>	Nova Avanhadava-SP	Paraná	-21,0667	-50,115	LBPV-17040	FUPR585-09
<i>H. regani</i>	Nova Avanhadava-SP	Paraná	-21,0667	-50,115	LBPV-17041	FUPR586-09
<i>H. regani</i>	Sabáudia-SP	Paraná/Tibagi	-23,189	-50,966	361C	PRP108-16
<i>H. regani</i>	São Gonçalo Beira Rio-MT	Paraguai/Cuiabá	-15,412321	-56,62960	9568	-
<i>H. plecostomus</i>	Maripasoula-Guiana Francesa	Maroni/Petit Inini	-3,65713	-53,825	RVGF-062	GBOL3061-18
<i>H. plecostomus</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni/Serpente Creek	-5,33333	-54,15	GF10-027	GBOL1222-16
<i>H. plecostomus</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni	-5,25486	-54,2544	GFSU12-671	GBOL1232-16
<i>H. plecostomus</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni/Coswine	-5,67417	-53,9464	GF98-151	GBOL143-13
<i>H. plecostomus</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni	-5,67417	-53,9464	GF98-147	GBOL3050-18

<i>H. plecostomus</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni/Sparouine	-5,25486	-54,2544	GFSU12-673	GBOL1234-16
<i>H. plecostomoides</i>	Boyaca/Colômbia	Guavio	-4,75	-73,063	TICT-FCA-146	FBCH144-21
<i>H. paulinus</i>	MG/Brasil	Paraná	-21,5748	-46,3236	LBPV-28428	FUPR610-09
<i>H. paulinus</i>	São José do Rio Pardo–SP	Paraná	-21,3613	-46,5563	LBPV-29213	FUPR578-09
<i>H. paulinus</i>	São José do Rio Pardo–SP	Paraná	-21,3613	-46,5563	LBPV-29212	FUPR577-09
<i>H. paulinus</i>	Tapiratiba–SP	Paraná	-21,2936	-46,4853	LBPV-27986	FUPR581-09
<i>H. paulinus</i>	Andradas-MG	Paraná	-21,5748	-46,3236	LBPV-28427	FUPR609-09
<i>H. paulinus</i>	Tapiratiba–SP	Paraná	-21,2936	-46,4853	LBPV-27985	FUPR580-09
<i>H. paulinus</i>	Tapiratiba–SP	Paraná	-21,2936	-46,4853	LBPV-27984	FUPR579-09
<i>H. paulinus</i>	Andradas-MG	Paraná	-21,5748	-46,3236	LBPV-28426	FUPR608-09
<i>H. paulinus</i>	Andradas-MG	Paraná	-21,5748	-46,3236	LBPV-28425	FUPR607-09
<i>H. paulinus</i>	Andradas-MG	Paraná	-21,5748	-46,3236	LBPV-28384	FUPR606-09
<i>H. nigromaculatus</i>	Prof. Jamil–GO	Paraná	-17,0994	-48,7615	LBPV-35845	FUPR570-09
<i>H. nigromaculatus</i>	Prof. Jamil–GO	Paraná	-17,0994	-48,7615	LBPV-35847	FUPR572-09
<i>H. nigromaculatus</i>	Prof. Jamil–GO	Paraná	-17,0994	-48,7615	LBPV-35846	FUPR571-09
<i>H. luetkeni</i>	Itaocara - RJ	Rio Paraíba do Sul	-21,6581	-42,0686	MNLM6136	MNRJ839-16
<i>H. luetkeni</i>	Nanuque-MG	Paraná/Pampam	-17,7311	-40,7111	Mu040	MUCU072-13
<i>H. luetkeni</i>	Ecoporanga–ES	Paraná/Mucuri	-18,1089	-40,54	Mu076	MUCU084-13
<i>H. luetkeni</i>	Nanuque-MG	Paraná/Pampam	-17,7311	-40,7111	Mu039	MUCU026-13
<i>H. luetkeni</i>	Nanuque-MG	Paraná/Pampam	-17,7431	-40,7947	Mu050	MUCU034-13
<i>H. luetkeni</i>	Nanuque-MG	Paraná/Pampam	-17,7311	-40,7111	Mu041	MUCU073-13
<i>H. iheringii</i>	Nova Avanhadava-SP	Paraná	-21,0667	-50,115	LBPV-17039	FUPR569-09
<i>H. hondae</i>	Bolivar/Colômbia	Cauca/Pântano de La Panela	-8,88	-74,456	6157D	CIUA736-20
<i>H. hondae</i>	Lloró, Chocó/Colômbia	Cauca/El Zancudo	-4,964	-75,858	5449A	CIUA588-20
<i>H. hermanni</i>	Piracicaba-SP	Paraná	-21,9271	-47,3679	LBPV-20922	FUPR593-09

<i>H. hermanni</i>	São Francisco do Imbaú-PR	Paraná	-22,9392	-50,2523	LBPV-11274	FUPR562-09
<i>H. hermanni</i>	São Francisco do Imbaú-PR	Paraná	-22,9392	-50,2523	LBPV-11275	FUPR563-09
<i>H. heraldoi</i>	Guamium-SP	Paraná	-21,9271	-47,3679	LBPV-20909	FUPR591-09
<i>H. heraldoi</i>	Guamium-SP	Paraná	-21,9271	-47,3679	LBPV-22594	FUPR596-09
<i>H. heraldoi</i>	Guamium-SP	Paraná	-21,9271	-47,3679	LBPV-20912	FUPR590-09
<i>H. heraldoi</i>	Guamium-SP	Paraná	-21,9271	-47,3679	LBPV-20868	FUPR555-09
<i>H. heraldoi</i>	Guamium-SP	Paraná	-21,9271	-47,3679	LBPV-20915	FUPR592-09
<i>H. heraldoi</i>	Guamium-SP	Paraná	-21,9271	-47,3679	LBPV-20867	FUPR595-09
<i>H. heraldoi</i>	Guamium-SP	Paraná	-21,9271	-47,3679	LBPV-20914	FUPR594-09
<i>H. gymnorhynchus</i>	São Pedro do Sul-RS	Litany	-2,93797	-54,1724	GFSU14e-1517	GBOL1154-16
<i>H. gymnorhynchus</i>	Maripasoula-Guiana Francesa	Marouini	-3,00083	-54,0833	GF00-091	GBOL2461-17
<i>H. gymnorhynchus</i>	Tapanahony-Suriname	Maroni/Marouini	-2,85858	-53,9773	GFSU14-014	GBOL1047-16
<i>H. gymnorhynchus</i>	Tapanahony-Suriname	Maroni/Marouini	-2,67692	-53,9993	GFSU14-025	GBOL1051-16
<i>H. gymnorhynchus</i>	Tapanahony-Suriname	Tampok	-3,39008	-53,926	GF15-277	GBOL1668-17
<i>H. gymnorhynchus</i>	Tapanahony-Suriname	Maroni	-3,38333	-54,0553	GF15-034	GBOL1582-17
<i>H. gymnorhynchus</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni/Marouini	-2,85858	-53,9773	GFSU14-013	GBOL1046-16
<i>H. gymnorhynchus</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni/Marouini	-2,67692	-53,9993	GFSU14-026	GBOL1052-16
<i>H. gymnorhynchus</i>	Maripasoula-Guiana Francesa	Maroni/Lawa	-3,38333	-54,0553	GF15-026	GBOL1577-17
<i>H. gymnorhynchus</i>	Tapanahony-Suriname	Maroni/Tampok	-3,39008	-53,926	GF15-278	GBOL1669-17
<i>H. gymnorhynchus</i>	Sipaliwini-Suriname	Paloemeu	-3,19833	-55,4075	SU08-292	GBOL3639-18
<i>H. gymnorhynchus</i>	Tapanahony-Suriname	Maroni	-3,30028	-54,0681	GF00-349	GBOL117-13
<i>H. gymnorhynchus</i>	Tapanahony-Suriname	Maroni/Grand Inini	-3,6	-53,8	PYLB97-6b	GBOL116-13

<i>H. gymnorhynchus</i>	Tapanahony-Suriname	Paloemeu	-3,35036	-55,4379	SU08-213	GBOL3641-18
<i>H. gymnorhynchus</i>	Sipaliwini-Suriname	Paloemeu	-3,19833	-55,4075	SU08-291	GBOL3638-18
<i>H. gymnorhynchus</i>	Sipaliwini-Suriname	Paloemeu	-3,35036	-55,4379	SU08-212	GBOL3640-18
<i>H. gymnorhynchus</i>	Carolina-Suriname	Maroni	-5,05172	-54,0889	GF06-474	GBOL2463-17
<i>H. gymnorhynchus</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni	-5,05172	-5,05172	GF06-473	GBOL2462-17
<i>H. gymnorhynchus</i>	Patamacca-Suriname	Maroni	-5,25486	-54,2544	GFSU12-670	GBOL3031-18
<i>H. gymnorhynchus</i>	São Lourenço do Maroni-Guiana Francesa	Maroni	-5,02947	-54,0884	GF06-529	GBOL2464-17
<i>H. gymnorhynchus</i>	Tapanahony-Suriname	Maroni	-4,6193	-54,34	RV-064	GBOL3036-18
<i>H. gymnorhynchus</i>	Tapanahony-Suriname	Maroni/Inini	-3,6593	-53,9625	RV-072	GBOL3037-18
<i>H. commersoni</i>	Rosario-Argentina	Banco de arena Oeste	-32,8503	-60,6651	LAR137	LARI218-13
<i>H. commersoni</i>	Rosario-Argentina	Banco de arena Oeste	-32,8503	-60,6651	LAR148	LARI229-13
<i>H. commersoni</i>	Rosario-Argentina	Banco de arena Oeste	-32,9177	-60,6287	LAR031	LARI126-12
<i>H. commersoni</i>	Buenos Aires-Argentina	Adeg 4 de novembro (Ascensão)	-34,1717	-60,9006	UNMDP-T 0490	FARGB322-11
<i>H. commersoni</i>	Buenos Aires-Argentina	Adela	-35,6881	-57,9503	UNMDP-T 0292	FARGB124-11
<i>H. commersoni</i>	Buenos Aires-Argentina	Rojas (Ascensão)	-34,0828	-61	UNMDP-T 0467	FARGB299-11
<i>H. commersoni</i>	Gen. Belgrano-Argentina	Chascomus	-35,6056	-57,9914	UNMDP-T 0293	FARGB125-11
<i>H. commersoni</i>	Gen. Arenales-Argentina	Adeg Santa Cruz (Ascensão)	-34,07	-61,0433	UNMDP-T 0468	FARGB300-11
<i>H. commersoni</i>	Buenos Aires-Argentina	Rojas	-34,07	-60,9547	UNMDP-T 0489	FARGB321-11
<i>H. commersoni</i>	Buenos Aires-Argentina	Adeg 4 de novembro (Ascensão)	-34,1717	-60,9006	UNMDP-T 0491	FARGB323-11
<i>H. commersoni</i>	Buenos Aires-Argentina	Adeg Santa Cruz (Ascensão)	-34,07	-61,0433	UNMDP-T 0488	FARGB320-11
<i>H. brevis</i>	GO-Brasil	Paraná/Verde	-17,4024	-51,2716	LBPV-16368	FUPR559-09
<i>H. brevis</i>	GO-Brasil	Paraná/Verde	-17,4024	-51,2716	LBPV-16365	FUPR557-09
<i>H. brevis</i>	GO-Brasil	Paraná/Verde	-17,4024	-51,2716	LBPV-16367	FUPR558-09
<i>H. brevis</i>	GO-Brasil	Paraná/Verde	-17,4024	-51,2716	LBPV-16369	FUPR560-09
<i>H. auroguttatus</i>	Roseira-SP	Paraíba do Sul	-22,6	-45,161	LBPV-37752	FPSR129-09

<i>H. auroguttatus</i>	Biritiba-SP	Paraíba do Sul	-23,374	-46,053	LBPV-29082	FPSR122-09
<i>H. auroguttatus</i>	Biritiba-SP	Paraíba do Sul	-23,369	-46,024	LBPV-29100	FPSR115-09
<i>H. auroguttatus</i>	SP-Brasil	Paraíba do Sul	-23,374	-46,053	LBPV-29086	FPSR126-09
<i>H. auroguttatus</i>	SP-Brasil	Paraíba do Sul	-22,6	-45,161	LBPV-37753	FPSR130-09
<i>H. auroguttatus</i>	SP-Brasil	Paraíba do Sul	-23,369	-46,024	LBPV-29108	FPSR116-09
<i>H. auroguttatus</i>	SP-Brasil	Paraíba do Sul	-23,374	-46,053	LBPV-29085	FPSR125-09
<i>H. auroguttatus</i>	Roseira-SP	Paraíba do Sul	-22,584	-45,169	LBPV-37785	FPSR135-09
<i>H. auroguttatus</i>	Roseira-SP	Paraíba do Sul	-22,584	-45,169	LBPV-37784	FPSR134-09
<i>H. auroguttatus</i>	SP-Brasil	Paraíba do Sul	-23,374	-46,053	LBPV-29083	FPSR123-09
<i>H. auroguttatus</i>	SP-Brasil	Paraíba do Sul	-22,6	-45,161	LBPV-37755	FPSR132-09
<i>H. auroguttatus</i>	SP-Brasil	Paraíba do Sul	-22,6	-45,161	LBPV-37756	FPSR133-09
<i>H. auroguttatus</i>	SP-Brasil	Paraíba do Sul	-22,584	-45,169	LBPV-37786	FPSR136-09
<i>H. auroguttatus</i>	SP-Brasil	Paraíba do Sul	-22,6	-45,161	LBPV-37754	FPSR131-09
<i>H. auroguttatus</i>	Pedra Corrida-MG	Doce	-19,018	-42,121	LGC1672	RDOCE028-13
<i>H. auroguttatus</i>	Pedra Corrida-MG	Doce	-19,018	-42,121	LGC1674	RDOCE029-13
<i>H. auroguttatus</i>	Pedra Corrida-MG	Doce	-19,018	-42,121	LGC07	RDOCE003-13
<i>H. auroguttatus</i>	Pedra Corrida-MG	Doce	-19,018	-42,121	LGC16	RDOCE009-13
<i>H. auroguttatus</i>	Pedra Corrida-MG	Doce	-19,018	-42,121	LGC19	RDOCE011-13
<i>H. auroguttatus</i>	Pedra Corrida-MG	Doce	-19,018	-42,121	LGC17	RDOCE010-13
<i>H. auroguttatus</i>	Pedra Corrida-MG	Doce	-19,018	-42,121	LGC03	RDOCE002-13
<i>H. ancistroides</i>	São Pedro-SP	Paraná	-22,3642	-47,5136	LBPV-25965	FUPR616-09
<i>H. ancistroides</i>	São Pedro-SP	Paraná	-22,3642	-47,5136	LBPV-25966	FUPR617-09
<i>H. ancistroides</i>	São Pedro-SP	Paraná	-22,3642	-47,5136	LBPV-25964	FUPR615-09
<i>H. ancistroides</i>	Novo Horizonte-SP	Paraná	-21,1768	-49,1725	LBPV-32288	FUPR613-09
<i>H. ancistroides</i>	Novo Horizonte-SP	Paraná	-21,1768	-49,1725	LBPV-32289	FUPR614-09
<i>H. ancistroides</i>	Corumbá de Goiás-GO	Tocantins/Queima Lençol	-15,5461	-47,8615	JCB90	BFFDF086-19
<i>H. ancistroides</i>	Corumbá de Goiás-GO	Tocantins/Queima Lençol	-15,5461	-47,8615	JCB91	BFFDF087-19
<i>H. ancistroides</i>	Corumbá de Goiás-GO	Tocantins/Queima Lençol	-15,5461	-47,8615	JCB92	BFFDF088-19

<i>H. ancistroides</i>	Jandaia do Sul-PR	Paraná/Apertados	-23,391	-50,996	PDapt33	PDCAP214-14
<i>H. ancistroides</i>	SP-Brasil	Paraná	-22,3642	-47,5136	LBPV-25962	FUPR573-09
<i>H. albopunctatus</i>	Campo Mourão-PR	Paraná	-24,0735	-52,2911	LBPV-29929	FUPR554-09
<i>H. albopunctatus</i>	Campo Mourão-PR	Paraná	-24,0735	-52,2911	LBPV-29927	FUPR552-09
<i>H. albopunctatus</i>	Campo Mourão-PR	Paraná	-24,0735	-52,2911	LBPV-29928	FUPR553-09
<i>H. alatus</i>	Pará de Minas-MG	Francisco/ Jaboticatubas	-19,468	-43,868	DCC01190	BSB297-10
<i>H. alatus</i>	Riachinho-MG	São Francisco/Urucuia	-16,152	-45,694	DCC00436	BSB292-10
<i>H. alatus</i>	Inimutaba-MG	Curimatai	-17,984	-44,169	DCC01159	BSB295-10
<i>H. alatus</i>	São Francisco-MG	São Francisco/Pandeiros	-15,672	-44,637	DCC0052	BSB293-10
<i>H. alatus</i>	MG	São Francisco/ Curimatai	-17,984	-44,169	DCCO1170	BSB296-10
<i>H. affinis</i>	Naque-MG	Doce	-19,114	-42,176	LGC12	RDOCE008-13
<i>H. affinis</i>	Fidelândia-MG	Paraná/Pampam	-17,7311	-40,7111	Mu042	MUCU027-13
<i>H. affinis</i>	Fidelândia-MG	Paraná/Pampam	-17,7431	-40,7947	Mu051	MUCU035-13
<i>H. affinis</i>	Fidelândia-MG	Paraná/Pampam	-17,7431	-40,7947	Mu052	MUCU036-13
<i>H. affinis</i>	Ecoporanga-ES	Paraná/Mucuri	-18,1089	-40,54	Mu078	MUCU045-13
<i>H. affinis</i>	Revés do Belém-MG	Doce/ Corrente Grande	-18,972	-42,286	LGC08	RDOCE004-13
<i>H. affinis</i>	MG	Doce	-19,114	-42,176	LGC11	RDOCE007-13
<i>H. affinis</i>	Biritiba Mirim-SP	Paraíba do Sul	-23,369	-46,024	LBPV-29110	FPSR118-09
<i>H. affinis</i>	SP	Paraíba do Sul	-23,369	-46,024	LBPV-29111	FPSR119-09
<i>H. affinis</i>	SP	Paraíba do Sul	-23,369	-46,024	LBPV-29113	FPSR121-09
<i>H. affinis</i>	SP	Paraíba do Sul	-23,369	-46,024	LBPV-29112	FPSR120-09
<i>H. affinis</i>	SP	Paraíba do Sul	-22,633	-44,6	LBPV-29355	FPSR128-09
<i>H. affinis</i>	SP	Paraíba do Sul	-22,633	-44,6	LBPV-29354	FPSR127-09
<i>H. affinis</i>	SP	Paraíba do Sul	-23,369	-46,024	LBPV-29109	FPSR117-09
<i>H. affinis</i>	Cachoeiras de Macacu-RJ	Guandu/Ribeirão do Macaco	-21,8342	-41,9606	MNLM6159	MNRJ833-16
<i>H. affinis</i>	Caputira-MG	Manhaçu/José Pedro	-20,079	-41,733	LGC138	RDOCE015-13
<i>H. cf. latirostris</i>	Coxipó do Ouro-MT	Paraguai/Coxipó do Ouro	-15,360144	-55,933308	11083	-
<i>H. cf. latirostris</i>	Coxipó do Ouro-MT	Paraguai/Coxipó do Ouro	-15,360144	-55,933308	11084	-

<i>H. cf. latirostris</i>	Coxipó do Ouro-MT	Paraguai/Coxipó do Ouro	-15,360144	-55,933308	11086	-
<i>H. fuscomaculatus</i>	Cuiabá-MT	Paraguai/Cuiabá	-15,620358	-56,134292	11424	-
<i>Hypostomus</i> sp.5	Cabaçal-MT	Paraguai/Cabaçal	-15,366122	-58,212131	11426	-

Apêndice C: Dendrograma gerado através da análise bayesiana de *Hypostomus* das sequências deste estudo e do *Bold Systems* obtidas com base em dados do gene COI com ramos não colapsados e todas as sequências de DNA em evidência.



Apêndice D: Dendrograma gerado através da análise bayesiana de *Hypostomus* das sequências deste estudo e do *Bold Systems* obtida com base em dados do gene COI.

