

DINAÍZA ABADIA ROCHA REIS

**ESTUDOS CITOGÉNÉTICO-MOLECULARES EM ESPÉCIES DO GÊNERO
Hypostomus (TELEOSTEI, LORICARIIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R375e
2016

Reis, Dinaíza Abadia Rocha, 1992-
Estudos citogenético-moleculares em espécies do
gênero *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) / Dinaíza
Abadia Rocha Reis. - Viçosa, MG, 2016.
x, 84f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador : Karine Frehner Kavalco.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.67-84.

1. *Hypostomus*. 2. Peixes. 3. Filogenia. 4. Cromossomos
sexuais. 5. Polimorfismos (Genética). I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral.
Programa de Pós-graduação em Ecologia. II. Título.

CDD 22. ed. 597.49

DINAÍZA ABADIA ROCHA REIS

**ESTUDOS CITOGENÉTICO-MOLECULARES EM ESPÉCIES DO GÊNERO
Hypostomus (TELEOSTEI, LORICARIIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2016.

Mónica Sonia Rodriguez
(Coorientadora)

Marcelo de Bello Cioffi

Karine Frehner Kavalco
(Orientadora)

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê”*

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus, pela oportunidade da vida, por sempre guiar meus passos, iluminando a melhor direção do caminho. Agradeço ainda pela saúde, sabedoria e pela família linda a qual me permite fazer parte.

Aos meus pais Nilma e José Maria, por toda atenção, carinho, amor e compreensão. Vocês são meus maiores exemplos de vida, meu alicerce em todos os momentos, peças fundamentais para a conquista de mais esta etapa em minha vida. Sou muito grata por tudo que fizeram e fazem por mim.

Aos meus irmãos Emerson e Alexsânia, por todo apoio e atenção, seja pela preocupação constante nas ligações ou pela companhia até tarde no laboratório. Vocês são muito especiais pra mim e com certeza, possuem papel importante nesta conquista.

Ao meu namorado Rafael, por todo companheirismo, amor, apoio e paciência. Além de namorado você é meu grande amigo, com quem sei que posso contar em todas as horas. Estes últimos dias foram complicados e com sua presença tudo se resolveu mais facilmente. Agradeço também por toda a ajuda na preparação deste trabalho, tanto nas questões técnicas quanto intelectuais. Você foi essencial para a conclusão de tudo isso.

À princesa da minha vida, por toda inocência e simplicidade, que com apenas duas palavras (“Bença” e “dindinha”) consegue fazer com que eu me esqueça de todo problema, toda dificuldade. Obrigada Maria Emília, por renovar minhas energias e esperanças com todo seu carinho.

A todos os meus familiares, em especial aos meus avós Maria, Darcy e Leny, por toda preocupação e carinho, mesmo sem compreenderem totalmente meu estudo e trabalho.

À D. Maria Abadia, ao Seu João Batista, ao Raniel, ao Renato e à Juliana, por todo carinho e atenção comigo sempre. Vocês são parte da minha família!

À minha orientadora Dra. Karine Kavalco pelos ensinamentos, discussões e amizade. Tudo que vivenciamos me fez engratecer muito como pessoa e profissional. Obrigada inclusive por todo apoio psicológico nos momentos difíceis. Agradeço também ao meu co-orientador Dr. Rubens Pazza por todo apoio e transmissão de conhecimentos. São quase oito anos de convivência no LaGEEvo, oito anos de muitas histórias, conhecimento e amizades.

Aos meus colegas de laboratório, pela boa convivência, prestatividade e amizade. Em especial à Rosana, Snaydia e Renan, que me auxiliaram tantas vezes nas horas de sufoco. Muito obrigada por tudo!

À minha co-orientadora Dra. Mónica Rodriguez, pelo conhecimento compartilhado e por me demonstrar quão importante a taxonomia é para todos os estudos.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite e por contribuírem com o trabalho.

Ao Dr. Cláudio Henrique Zawadzki pela atenção e disponibilidade em identificar os exemplares deste estudo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Ecologia pela estrutura e apoio para realização deste trabalho. Aos professores do Programa, que apesar do pouco contato que temos, sei que são excelentes profissionais e que contribuem muito para a formação de todos os discentes da PPG-Eco.

Ao Prof. José Henrique Schoereder, coordenador do Programa, pela solicitude com minhas inúmeras dúvidas e com a resolução dos processos acadêmicos.

À CAPES, pela bolsa concedida nestes 24 meses. À FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamento dos projetos que permitem nossa pesquisa.

À todas as minhas amigas, Letícia, Rayra, Juliene, Lorena, Maíra, Viviane, que mesmo passando meses sem nos vermos, quando nos encontramos é como se nunca tivéssemos ficado longe.

Ao meu grande amigo João Paulo, a quem eu devo muito, principalmente deste trabalho. O auxílio nas análises, a discussão dos dados, a resolução de dúvidas... Muito obrigada!

Às minhas amigas do pensionato, Cynthia, Bia, Jamile, Ana Carolina, Stella, Clarisse, Karen e Pi, pelas boas conversas, risadas e diversão. Vocês foram essenciais para minha adaptação quando cheguei sozinha em Viçosa. Em especial à Juana, pela amizade, conselhos e reflexões que contribuíram para o meu amadurecimento longe de casa.

Caso tenha esquecido alguém, peço desculpas. São tantos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho que sou muito grata em estar cercada de tantas pessoas de bem.

A todos vocês, muito obrigada!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Bacia do rio Paraná	1
1.2. Família Loricariidae: diversidade e classificação	2
1.3. Subfamília Hypostominae.....	4
1.4. Cromossomos sexuais em peixes	5
1.5. Marcadores cromossômicos	6
1.6. DNA mitocondrial	7
1.7. Citogenética e biologia molecular	8
1.8. Objetivos.....	10
2. METODOLOGIAS E PROTOCOLOS	11
2.1. Técnica alternativa para preparações cromossômicas em peixes (HANKS)(Gold et al., 1990)	11
2.2. Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda-C) (Sumner, 1972).....	12
2.3. Ag-RONs de microondas (Kavalco e Pazza, 2004)	13
2.4. Dupla coloração CMA ₃ /DAPI (Sola et al., 1982, com modificações)	14
2.5. Hibridação Fluorescente in situ (Pinkel et al., 1985; Hamkalo e Elgin, 1991)	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
CAPÍTULO I	20
CHAPTER I.....	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
Local de coleta e identificação do material	23

Preparações cromossômicas e técnicas de bandamento	23
Hibridação Fluorescente in situ (FISH)	24
Análises filogenéticas	24
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	27
CAPÍTULO II.....	38
CHAPTER II	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
Locais de coleta e identificação do material.....	41
Preparações cromossômicas e técnicas de bandamento	42
Hibridação Fluorescente in situ (FISH)	42
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	45
CAPÍTULO III	49
CHAPTER III.....	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	52
RESULTADOS	53
DISCUSSÃO	54
Apêndice A	60
Apêndice B	64
4. CONCLUSÃO GERAL	66
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bacia hidrográfica do Alto rio Paraná demonstrando seus principais tributários. Retirado de Lowe-McConnell, 1999.....	2
Figura 2. Representante de <i>Hypostomus ancistroides</i> (LIRP 2716, 55,2 cm de comprimento padrão). Retirado de Casatti et al. (2005).	5
Figura 3. Fórmulas cariotípicas para a população de <i>H. aff. ancistroides</i> . Em A, cariótipo para fêmeas, em B para machos, em C macho com cromossomo supranumérico. Cromossomos sexuais e supranumérico destacados nas caixas.....	26
Figura 4. Metáfases de machos (A) e fêmeas (B) após detecção de RONS (sítios). Em A, sítio encontrado no cromossomo Y evidenciado pela ponta de seta e associação de RONS entre cromossomos diferentes marcada com asterisco.	27
Figura 5. Distribuição da heterocromatina constitutiva em fêmeas (A) e machos (B). Em C, metáfase que demonstra a constituição heterocromática do cromossomo supranumérico (círculo).....	29
Figura 6. Fenótipos encontrados para bandamento C, Ag-RONS, CMA3 e FISH com rDNA 18S e 5S	30
Figura 7: Ideogramas de fêmeas (A) e machos (B) de <i>H. aff. ancistroides</i> , demonstrando as marcações cromossômicas presentes nos indivíduos.	31
Figura 8: Árvore de Máxima Verossimilhança para <i>H. ancistroides</i> do Alto Paraná obtida com COI. Os números representam os valores de bootstrap encontrados.....	33
Figura 9: Árvore de Máxima Verossimilhança para <i>H. ancistroides</i> do Alto Paraná obtida com Cyt b. Os números representam os valores de bootstrap encontrados.....	34
Figura 10: Pontos de coleta das populações de <i>H. ancistroides</i> analisadas.	41
Figura 11: Cariótipos encontrados para as populações de <i>H. ancistroides</i> . A: Araras, B: Botucatu, C: Indaiatuba, D: Terra Roxa.	43
Figura 12: Distribuição da heterocromatina constitutiva. A: Araras, B: Botucatu, C: Indaiatuba, D: Terra Roxa.	44
Figura 13: FISH com sonda de rDNA 5S. A: Araras, B: Botucatu, C: Indaiatuba; D: Terra Roxa.	45
Figura 14: Ideogramas das populações de <i>H. ancistroides</i> analisadas. A: Araras, B: Botucatu, C: Indaiatuba, D: Terra Roxa.	46
Figura 15: Rede de haplótipos encontrada para <i>H. ancistroides</i> , com formação de dois haplogrupos.	57

Figura 16: Árvore de Máxima Verossimilhança obtida para espécies de *Hypostomus* analisadas. Os números representam os valores de bootstrap. 58

Figura 17: Árvore Bayesiana obtida para espécies de *Hypostomus* analisadas. Os valores de probabilidade posterior superiores a 70% são demonstrados por círculos pretos nos nós. 59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Dados citogenéticos disponíveis para *Hypostomus* ancistroides. Adaptado de Lorscheider et al. (2015). 32

Tabela 2. Total de indivíduos coletados em cada localidade..... 41

Tabela 3. Detalhes dos exemplares coletados e utilizados no estudo..... 60

Tabela 4. Dados citogenéticos disponíveis para espécies de *Hypostomus* utilizadas neste estudo. Adaptado de Lorscheider et al. (2015)..... 64

RESUMO

REIS, Dinaíza Abadia Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2016. **Estudos citogenético-moleculares em espécies do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae)**. Orientadora: Karine Frehner Kavalco. Coorientadores: Rubens Pazza e Mónica Sonia Rodriguez.

Loricariidae é uma família encontrada exclusivamente em região Neotropical e possui representantes conhecidos como cascudos. É classificada em sete subfamílias, das quais Hypostominae apresenta o maior número de estudos citogenéticos. Nas subfamílias, o cariótipo e o número diploide apresentam tendências evolutivas diferentes, ao contrário dos fenótipos de RONS, que são características cromossômicas compartilhadas. O gênero *Hypostomus* é considerado um grupo parafilético, só diagnosticável por similesiomorfias. *H. ancistroides* apresenta distribuição natural nas bacias do rio Tietê, do rio Ribeira de Iguape e do Alto rio Paraná. Há indícios que o táxon *H. ancistroides* represente um complexo de espécies nesta região, pois análises morfológicas prévias revelam diferentes morfotipos em diferentes bacias de sua área de distribuição. O objetivo geral do trabalho foi resgatar as relações evolutivas entre populações de *Hypostomus* spp. distribuídas na bacia do Alto rio Paraná. Para isso, foram definidos os complementos cromossômicos de cinco populações alopátricas de *H. ancistroides* utilizando citogenética clássica e molecular e foram inferidas árvores filogenéticas para algumas espécies de *Hypostomus*. *H. aff. ancistroides* de São Miguel Arcanjo é uma nova espécie do complexo de espécies. Esta ideia é corroborada pela redução do número diploide apresentado com consequente isolamento reprodutivo, pela existência de um sistema cromossômico sexual e pelo monofiletismo em relação às outras populações de *H. ancistroides*. Populações de *H. ancistroides* apresentam polimorfismos na fórmula cariotípica, Ag-RONS e rDNA 5S, reforçando a ideia deste ser um grupo complexo. Além disso, foi possível identificar a dispersão como mecanismo de evolução para esta espécie com base em rDNA 5S, que é um potencial marcador populacional. Existem pelo menos dois grandes grupos dentro do gênero *Hypostomus*, corroborados por dados morfológicos, cariotípicos e moleculares. As análises filogenéticas realizadas conseguiram validar as similesiomorfias cromossômicas encontradas entre as espécies. Assim, por se tratar de um grupo recente e muito diverso, as espécies de *Hypostomus* necessitam de mais estudos para compreensão de sua diversidade e evolução.

ABSTRACT

REIS, Dinaíza Abadia Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Cytogenetic-molecular studies in the species of genus *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae)**. Adviser: Karine Frehner Kavalco. Co-advisers: Rubens Pazza and Mónica Sonia Rodriguez.

Loricariidae is a family found exclusively in the Neotropics and has representatives known as cascudos. It is classified into seven subfamilies, including Hypostominae, which has the highest number of cytogenetic studies. In the subfamilies, the karyotype and diploid number have different evolutionary trends, unlike the NOR phenotypes, which have shared chromosomal characteristics. The *Hypostomus* genus is considered a paraphyletic group, and is only diagnosable by symplesiomorphy. *H. ancistroides* has a natural distribution in the basins of the Tietê river, Ribeira de Iguape river and the Upper Paraná river. There is evidence that the *H. ancistroides* taxon represents a species complex in this region because previous morphological analysis revealed different morphotypes in different basins of their range. The objective of this work was to rescue the evolutionary relationships among populations of *Hypostomus* spp. distributed in the basins of the Upper Paraná river. For this, chromosomal complements of five allopatric populations of *H. ancistroides* were defined using classical and molecular cytogenetics, and phylogenetic trees were inferred for some species of *Hypostomus*. The population of *H. aff. ancistroides* of the São Miguel Arcanjo is a new species of this complex. This idea is supported by the reduction of the diploid number presented with consequent reproductive isolation, the existence of a sex chromosome system and the monophyly in relation to other populations of *H. ancistroides*. *H. ancistroides* populations showed polymorphisms in the karyotype formula, Ag-NORs and 5S rDNA, reinforcing the idea of this being a complex group. Moreover, the dispersion was identified as the mechanism of evolution for this species based on 5S rDNA, which is a potential population marker. There are at least two larger groups within the genus *Hypostomus*, which is supported by morphology, karyotype and molecular data. Phylogenetic analysis was able to validate the chromosomal symplesiomorphy found between species. Thus, because it is a recent and very diverse group, species *Hypostomus* need more studies to understand their diversity and evolution.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Peixes são excelentes modelos para estudos de diversidade e evolução, pois além de representarem 50% de todos os vertebrados (Nelson, 2006), ocupam uma posição basal na filogenia dos Vertebrata (Pough et al., 2008). A Região Neotropical abriga a maior biodiversidade destes organismos (Lowe-McConnell, 1999), compreendendo aproximadamente 71 famílias e 4.475 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2016) caracterizadas por alto grau de endemismo (Reis et al., 2003).

1.1. Bacia do rio Paraná

Na América do Sul, o rio Paraná é o segundo maior em extensão e o principal da bacia da Prata. Percorre 3.809 km desde sua nascente, na Serra da Mata da Corda (MG), até desembocar no rio da Prata (Lowe-McConeell, 1999). Em território brasileiro encontra-se seu trecho Superior (rio Paranaíba), Alto (da confluência dos rios Paranaíba e Grande até as antigas Sete Quedas) e parte do Médio (das antigas Sete Quedas até a foz do rio Iguaçu) (Paiva Filho, 1982).

A bacia do Alto rio Paraná (Figura 1) drena aproximadamente 900.000 km² incluindo os estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás (Souza Filho e Stevaux, 1997). Este sistema abriga grandes tributários, como os rios Paranaíba, Grande, Tietê e Paranapanema (Castro et al., 2003).

A configuração geológica atual desta bacia é proveniente de um soerguimento de terras que resultou na formação da Serra do Mar, e este acontecimento teria separado os rios das bacias costeiras - cujos cursos drenam diretamente para o Oceano Atlântico -, dos rios que drenam para o interior do continente (Oyakawa et al., 2006). Dessa forma, é observado um evidente endemismo de peixes na bacia do rio Paraná (Castro et al., 2005).

Segundo Castro e Menezes (1998) apud Casatti et al. (2001), grande parte da ictiofauna existente é “composta por espécies de pequeno porte (menos de 15 cm de comprimento), que habitam pequenos riachos de cabeceiras, apresentando elevado grau de endemismo, distribuição geográfica restrita, sem valor comercial e dependentes da vegetação ripárias para alimentação, reprodução e abrigo, havendo ainda muito o que ser explorado nestes ambientes”. Entretanto, com a intensa degradação ambiental há o

risco da biodiversidade dessa bacia nunca ser corretamente estimada, pois a maioria de seus ambientes naturais já não existe (Menezes, 1996).

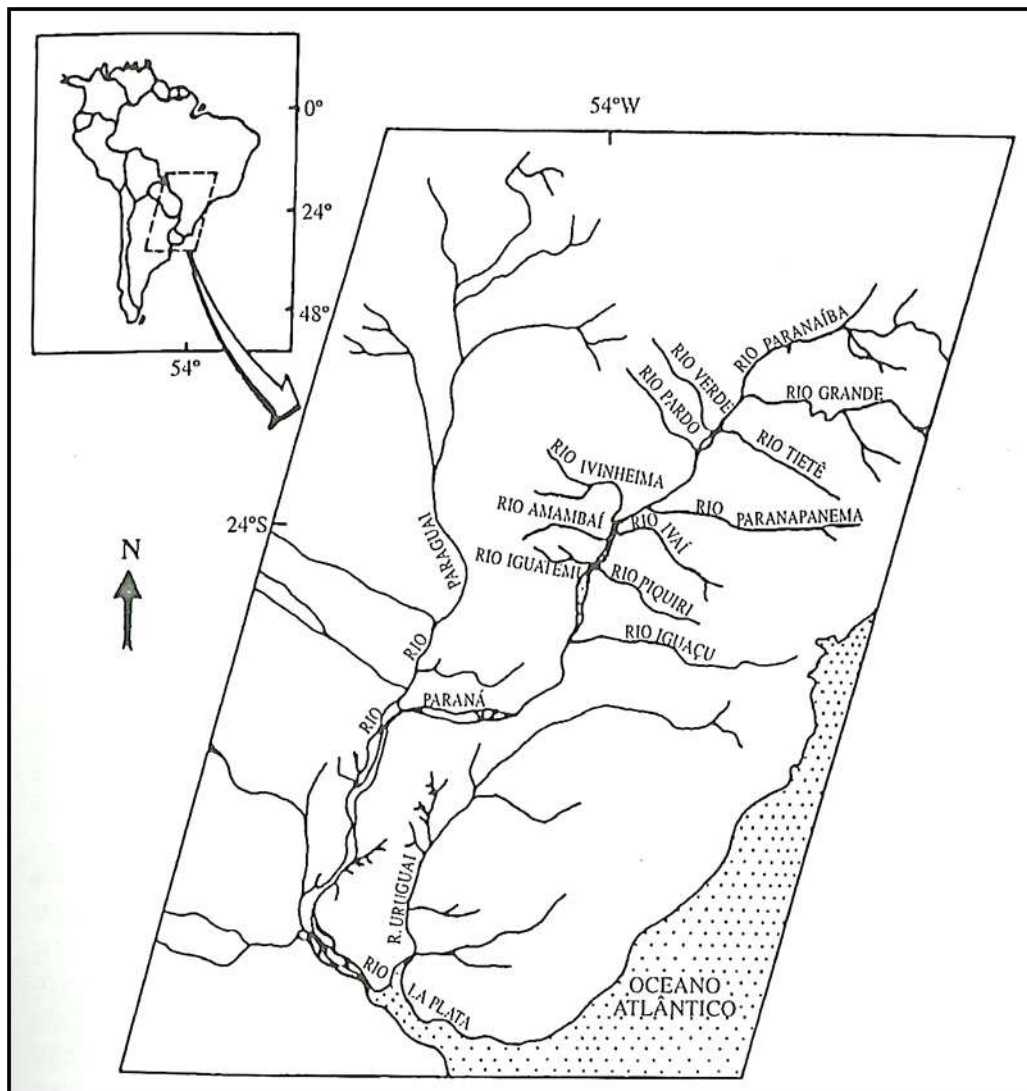


Figura 1. Bacia hidrográfica do Alto rio Paraná demonstrando seus principais tributários. Retirado de Lowe-McConnell, 1999.

1.2. Família Loricariidae: diversidade e classificação

A ordem Siluriformes compõe um grupo diverso, possuindo 39 famílias e mais de 5.199 espécies nomeadas, das quais 3.707 são consideradas válidas (Eschmeyer e Fong, 2016).

Segundo Nelson (2006), a família Loricariidae é a maior dentre os Siluriformes e uma das maiores dentre todas as famílias de peixes do mundo, contabilizando 919 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2016). Esta diversidade ocasiona muitos

problemas na identificação e novas espécies são descritas frequentemente (Tan e Armbruster, 2012; Martins et al., 2013; Roxo et al., 2013, Zawadzki e Hollanda Carvalho, 2014). Em função disso, é considerada uma das famílias de peixes mais complexas do ponto de vista taxonômico. Seus representantes, conhecidos popularmente como cascudos, são encontrados em região Neotropical, da Costa Rica à Argentina (Reis et al., 2003).

Além de sua grande riqueza e diversidade, loricariídeos possuem ampla distribuição geográfica e exibem tolerâncias ecológicas (Langeani, 1990; Sabaj et al., 1999), com muitas espécies habitando ambientes extremos, e outras altamente endêmicas ocupando pequenas áreas geográficas (Bizerril, 1994; Ribeiro, 2006).

Armbruster (2004) relata em seus estudos que a taxonomia dentro de Loricariidae ainda não é resolvida, o que causa conflito na classificação de suas subfamílias. Em 1987, Schaefer reconheceu dentro de Loricariidae seis subfamílias: Lithogeneinae, Neoplecostominae, Hypoptomatinae, Loricariinae, Ancistrinae e Hypostominae. Em um amplo estudo acerca dos loricariídeos, focado principalmente em Hypostominae e Ancistrinae, Armbruster (2004) descobriu que esta última subfamília é, na verdade, parte de Hypostominae e propôs sua classificação como tribo Ancistrini. Uma sexta subfamília, Delturinae, foi descrita por Reis et al. (2006) com apenas dois gêneros, *Delturus* e *Hemipsilichthys*.

Chiachio et al. (2008) propôs uma sétima subfamília, Otothyrinae, a montagem da antiga tribo Otothyriini, e mantendo Hypoptopomatinae composta apenas por membros da antiga tribo Hypoptopomatini. Apesar de Cramer et al. (2011) refutar tal tentativa de elevar este grupo à subfamília, alegando esta ser parafilética, Roxo et al. (2014) mostra o monofiletismo de Otothyrinae, além de evidenciar que Neoplecostominae está mais relacionada com Otothyrinae do que com Hypoptopomatinae.

Quanto ao cariótipo e ao número diploide, as subfamílias apresentam tendências evolutivas diferentes, ao contrário dos fenótipos de Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs), que são características cromossômicas compartilhadas, podendo indicar ancestralidade comum ou como sendo um caráter homoplásico (Kavalco et al., 2004; 2005).

1.3. Subfamília Hypostominae

A subfamília Hypostominae é composta por pelo menos 40 gêneros (Lujan et al., 2015) e 538 espécies nominais, das quais 464 são consideradas válidas (Eschmeyer e Fong, 2016). É a subfamília com maior número de estudos citogenéticos, além de ser considerada um grupo complexo, com número diploide variando de $2n = 38$ em *Ancistrus* sp. (Alves et al., 2003) a $2n = 84$ em *Hypostomus* sp. (Cereali et al., 2008). Armbruster (2004) reconheceu cinco tribos monofiléticas em Hypostominae: Corymbophanini, Rhinelepini, Pteroplichthyni, Ancistrini e Hypostomini.

As espécies desta subfamília apresentam grande variação na morfologia externa e coloração, sendo relativamente poucos os caracteres diagnósticos (Oyakawa et al., 2005; Zawadzki et al., 2008a). Esta variação morfológica, juntamente com a alta riqueza de espécies, representa um desafio para os esforços que visam esclarecer fronteiras entre as espécies (Zawadzki et al., 2012).

Em Hypostominae, o gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) é o que apresenta maior número de espécies cariotipadas e, segundo Britski (1972), este é o gênero de cascudos mais dominantes nos rios do Brasil. É considerado um grupo parafilético (Armbruster, 2004) e só diagnosticável por simplesiomorfias (Zawadzki et al., 2012). Este gênero compreende cerca de 132 espécies válidas (Zawadzki e Hollanda Carvalho, 2014; Zawadzki et al., 2014) e o número diplóide varia de $2n = 52$ em *H. emarginatus* (Artoni e Bertollo, 2001) a $2n = 84$ em *Hypostomus* sp. 2 do rio Perdido (Cereali et al., 2008), com $2n = 72$ sendo o mais comumente encontrado. Artoni e Bertollo (1996, 2001) observaram a relação inversa entre número diploide e número de cromossomos com dois braços, sugerindo que rearranjos cromossômicos, como fissões cêntricas e inversões pericêntricas, desempenham um papel importante na evolução cariotípica dos Hypostominae.

As espécies do gênero *Hypostomus* ocorrem numa vasta gama de habitats, dos lagos de várzea a rápidos córregos de montanhas (Burgess, 1989), e exibem estratégias reprodutivas, como o macho cuidando de ovos e larvas dentro de algum tipo de cavidade ou ninho (Suzuki et al., 2000). Além disso, a sua boca sugadora permite que se alimentem de algas e detritos, um recurso abundante na região Neotropical não disponível para a grande maioria dos peixes (Zawadzki et al., 2012). São ativos principalmente após o pôr do sol, permanecendo durante o dia sob rochas ou troncos submersos (Weber, 2003).

Hypostomus ancistroides Ihering (1911) (Figura 2) apresenta distribuição natural nas bacias do rio Tietê, do rio Ribeira de Iguape e do Alto rio Paraná (Eschmeyer e Fong, 2016), com localidade tipo no rio Tatuhy, afluente do lado esquerdo do rio Sorocaba, rio Piracicaba, estado de São Paulo (Reis et al., 2003). São estritamente herbívoros, encontrados principalmente em trechos de igarapés (Casatti et al., 2001).

Esta espécie apresenta grande número de polimorfismos relacionados à fórmulas cariotípicas, padrão de coloração e forma do corpo (Endo et al., 2012), o que a torna um potencial complexo de espécies e excelente modelo de organismo para estudos de diversidade e evolução.



Figura 2. Representante de *Hypostomus ancistroides* (LIRP 2716, 55,2 cm de comprimento padrão). Retirado de Casatti et al. (2005).

1.4. Cromossomos sexuais em peixes

Oliveira et al. (2015) relatam que apenas em 5,9% das espécies estudadas de peixes da região Neotropical foram encontrados cromossomos sexuais. Estes cromossomos sexuais encontrados abrangem tanto sistemas simples quanto sistemas sexuais múltiplos.

Segundo Cioffi et al. (2012), cromossomos sexuais e sua diferenciação são alguns dos temas mais interessantes da genética evolutiva, e este fenômeno é frequentemente associado à acumulação de heterocromatina nos cromossomos sexuais (Nanda et al., 2000; Kondo et al., 2004; Marchal et al., 2004; Peichel et al., 2004; Kejnovsky et al., 2009; Cioffi e Bertollo, 2010; apud Cioffi et al., 2012).

Em espécies com sistemas cromossômicos sexuais heteromórficos, existe diferença cariotípica entre os sexos e o cromossomo específico para o sexo (W ou Y, de

sistemas simples ZZ/ZW ou XX/XY, por exemplo), normalmente são menores, degenerados e interiramente heterocromáticos (Cioffi et al., 2012) quando comparados com os outros cromossomos do sistema sexual.

A grande diversidade da família Loricariidae inclui diversos desses sistemas. Apesar de terem sido considerados eventos isolados no grupo, já foram observados sistemas XX/X0, XX/XY, ZZ/ZW, XX/XY₁Y₂ e Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂ (Michelle et al., 1977; Andreatta et al., 1992, 1993; Scavone e Júlio Jr., 1995; Artoni et al., 1998; Alves et al., 2006; de Oliveira et al., 2007, 2010).

1.5. Marcadores cromossômicos

O uso de marcadores cromossômicos no estudo de peixes permite caracterizar e relacionar grupos por meio da comparação de padrões de bandas em cromossomos mitóticos, o que pode fornecer informações sobre estrutura cromossômica eucariótica (Moraes, 2007) e relações evolutivas, filogenéticas e taxonômicas entre tais grupos.

A maioria dos estudos em citotaxonomia de peixes têm utilizado técnicas de citogenética convencional, como coloração com Giemsa. A visualização dos cromossomos mitóticos a partir desta técnica permite a determinação do número diploide e da constituição cariotípica das espécies, o que possibilita comparações intra e interespecíficas.

O bandamento C (ou detecção de regiões de heterocromatina constitutiva) consiste em remover as regiões eucromáticas do DNA após tratamento com ácido, base e solução salina, permanecendo praticamente intactas as regiões heterocromáticas (Sumner, 1972). Ao contrário da eucromatina, que é composta pela maioria dos genes estruturais e sequências de DNA de cópia única, a heterocromatina é caracterizada pela ausência de atividade gênica, pelo grande grau de condensação e pela presença de sequências altamente repetidas (Guerra, 1988). Embora alguns estudos demonstrem que regiões de heterocromatina têm papel importante no comportamento cromossômico (Wallrath, 1998), ainda não é bem determinada a função dessas sequências.

Outra técnica utilizada é a detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs), que pode ser realizada de forma e rápida pela impregnação e nitrato de prata (AgNO₃). Esta metodologia é considerada indireta porque o nitrato de prata se liga à uma proteína não-histona ácida presente nas RONs ativas durante a interfase, e não ao rDNA propriamente dito (Miller et al., 1976; Nirchio e Oliveira, 2006). Apesar disso, a

determinação destes sítios, que podem ser simples ou múltiplos, são importantes marcadores cromossômicos pois sua localização e número de sítios podem ser característicos de populações e espécies (Lourenço et al., 1998).

Também são utilizadas técnicas com fluorocromos base-específicos, como por exemplo Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que permitem identificar regiões ricas em GC e AT, respectivamente. Grandes quantidades de pares de bases GC são encontradas em espaçadores de genes ribossomais (Amemiya e Gold, 1986), o que possibilita a utilização de CMA₃ para detecção de RONS independente de sua atividade transcricional (Phillips e Reed, 1996). Apesar disso, há casos em que este fluorocromo demonstra sítios adicionais e que não estão associados a rDNA, criando falsos positivos (Galetti Jr. e Martins, 2004; Phillips e Reed, 1996).

Além destas técnicas que são consideradas clássicas, a citogenética se uniu à manipulação de DNA – citogenética molecular –, permitindo a detecção de sequências de DNA específicas nos cromossomos (Artoni et al., 2000). A Híbridação Fluorescente in situ (FISH) é uma técnica refinada que permite a localização física nos cromossomos de sequências de DNA conhecidas. Consiste na inserção de sondas de DNA ou RNA no DNA da espécie estudada, que possui uma sequência complementar de nucleotídeos desta sonda utilizada, e que será visualizada posteriormente com corante fluorescente (Guerra, 2004). Algumas das sondas mais usadas nos estudos são constituídas de DNA ribossomais (rDNA), tornando-se importantes ferramentas no mapeamento físico cromossômico (Sczepanski, 2008).

1.6. DNA mitocondrial

A análise da similaridade de sequências nucleotídicas pode ser utilizada em estudos genéticos da biologia de populações e em estudos de realções evolutivas. Os dados obtidos a partir de sequenciamento de genes mitocondriais ou nucleares permitem a visualização de diferenças moleculares com alta resolução (Avisé, 2004) e podem ser aplicados em diversos tipos de análises, a depender do táxon estudado.

O DNA mitocondrial (mtDNA) codifica praticamente as mesmas proteínas, apesar de possui organizações gênicas distintas, de organismos como a levedura até animais como os mamíferos (Boore, 1999). O mtDNA apresenta-se como uma molécula circular, fechada e com conteúdo gênico conservado (Billington e Hebert, 1991). É pequena, com cerca de 14.000 a 26.000 pares de bases e apresenta regiões interagências

pequenas ou ausentes, e ausência de íntrons, pseudogenes e elementos transponíveis (Moritz et al., 1987)

Algumas vantagens tornam o genoma mitocondrial instrumento para estudos genéticos e evolutivos, como: herança predominantemente materna, genoma compacto com estrutura e organização simples, alta taxa de evolução e ausência de recombinação (Lewin, 1994). Uma outra vantagem sobre o genoma nuclear é o grande número de cópias de moléculas por célula (10^2 a 10^4), o que facilita a técnica de isolamento e extração (Pereira, 2000).

1.7. Citogenética e biologia molecular

Os primeiros trabalhos citogenéticos tinham por interesse descobrir quais genes que os cromossomos continham (White, 1954). Atualmente, o interesse está nas relações evolutivas, filogenéticas e taxonômicas dos grupos, isso porque em quase todas as populações naturais ocorre polimorfismo cromossômico, sendo este adaptativo ao permitir que a população responda geneticamente de forma mais eficiente às mudanças ambientais (White, 1973; John e Lewis, 1979; Pazza, 2005).

A associação entre as abordagens consideradas clássicas e moleculares, é a mais usada nos estudos cromossômicos atuais. Isso é possível pois sondas obtidas a partir de uma espécie podem ser hibridizadas nos cromossomos de outras espécies, permitindo a detecção de regiões homeólogas (cross-FISH) e conservadas entre as espécies. Além de trabalhos abordando aspectos morfológicos e citogenéticos, estudos moleculares usando DNA mitocondrial (mtDNA) estão sendo cada vez mais utilizados para identificar espécies e auxiliar na determinação das relações filogenéticas entre membros deste grupo (Zawadzki et al., 2008b).

A genética de populações juntamente com a filogeografia têm sido muito utilizadas em estudos que buscam correlacionar história evolutiva e padrões biogeográficos (Hickerson et al., 2010), o que pode auxiliar na taxonomia de várias espécies associadas (Hollanda Carvalho et al., 2015). A citogenética também pode contribuir para identificação e relação de espécies, como apresentado em *Hoplias malabaricus* (Bertollo et al., 1986). Em Siluriformes, Garcia (2009) com base em estudos cariotípicos demonstra que a espécie *Rhamdia quelen* trata-se na verdade de um complexo de espécies não diagnosticável com dados morfológicos.

Assim, a citotaxonomia aliada aos avanços da biologia molecular são potencialmente muito úteis na identificação de peixes e nos estudos evolutivos de espécies e de populações, constituindo ferramentas importantes em genética e biologia animal.

1.8. Objetivos

O objetivo geral do trabalho foi resgatar as relações evolutivas entre populações de *Hypostomus* spp. distribuídas nas bacias dos rios Paranaíba, Grande, Tietê e Paranapanema, através do estudo de sua organização cariotípica e do sequenciamento de parte de seu genoma mitocondrial. Para isso, foram definidos os complementos cromossômicos, utilizando técnicas citogenéticas clássicas e moleculares, de cinco populações do complexo de espécies *Hypostomus* ancistroides: São Miguel Arcanjo (Capítulo 1), Araras, Botucatu, Indaiatuba e Terra Roxa (Capítulo 2), pertencentes às bacias dos rios Grande, Tietê e Paranapanema. Além disso, foi feita a correlação de dados citogenéticos e da filogenia molecular, a fim de compreender um pouco mais sobre a história evolutiva deste grupo (Capítulo 3).

2. METODOLOGIAS E PROTOCOLOS

2.1. Técnica alternativa para preparações cromossômicas em peixes (HANKS)(Gold et al., 1990)

1. Retirar o rim e colocá-lo em uma cuba de vidro contendo 8mL de solução modificada de Hanks (ou meio 1640 ou TC199, com ou sem soro fetal bovino).
2. Dissociar o material, com auxílio de uma pinça de dissecação e de uma seringa de vidro desprovida de agulha.
3. Adicionar uma ou quatro gotas de colchicina a 0,0125%.
4. Incubar em estufa a 36-37°C por cerca de 25 minutos.
5. Ressuspender o material, utilizando uma pipeta Pasteur, e centrifugá-lo, por 10 minutos, a 900 rpm.
6. Remover o sobrenadante, com uma pipeta Pasteur, e acrescentar solução hipotônica de KCl a 0,075M (10-12 mL).
7. Ressuspender o material e incubá-lo, por aproximadamente 25 minutos, em estufa a 36-37°C.
8. A partir deste passo, o material é trabalhado segundo os procedimentos de fixação da técnica de “air-drying”.

HANK'S:

Solução A:

- 8 g de NaCl
- 0,4 g de KCl
- 0,047 g de Na₂HPO₄ ou
- 0,0898 g de Na₂HPO₄.7H₂O ou
- 0,12 g de Na₂HPO₄.12H₂O
- 0,06 g de KH₂PO₄
- 100 mL de água destilada.

Solução B:

- 0,14 g de CaCl₂
- 0,2 g de MgSO₄.7H₂O
- 100 mL de água destilada.

Solução de Vermelho Fenol:

- 0,14 g de vermelho fenol
- 0,2 g de NaOH 0,1 N
- 100 mL de água destilada

Misturar as soluções A e B juntamente, com 0,35 g de bicarbonato de sódio, 1 g de dextrose e 2 mL de vermelho fenol. Completar com água bidestilada até 1 litro. Deve ficar com uma coloração vermelha. Armazenar em frasco âmbar a 4° C. (OBS: a solução de vermelho fenol deve ser armazenada no freezer).

2.2. Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda-C) (Sumner, 1972)

1. Tratar o material preparado, segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2N à temperatura ambiente durante 15 minutos.
2. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar.
3. Colocar a lâmina em solução aquosa de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})\cdot 28\text{H}_2\text{O}$) 5%, recém-preparada e filtrada, a 42°C, durante 1,5 minutos.
4. Para interromper a ação da solução de hidróxido de bário e evitar precipitação, submergir rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar secar ao ar.
5. Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°C durante 25 minutos.
6. Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar.
7. Corar com solução de Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (pH=6,8), durante 5 minutos.

Ácido Clorídrico - HCl 0,2 N:

- 16,6 mL de HCl
- q.s.p. 1 litro de água destilada

Colocar 900 mL de água destilada em uma proveta ou Erlenmeyer e deixar o ácido escorrer lentamente pela parede do frasco. Completar para 1 litro. OBS: nunca diluir a água no ácido.

Hidróxido De Bário (5%)

- 2,5 g de Ba(OH)₂. 8H₂O
- q.s.p. 50 mL de água destilada

Diluir o hidróxido de bário em um frasco e filtrar. A solução será supersaturada. Deixar em banho-maria a 42° C.

Solução de 2xSSC

- 17,53 g de NaCl
- 8,82 g de Na₃C₆H₅O₇.2H₂O (citrato de sódio cristalino)
- q.s.p. 800 mL de água destilada

Dissolver tudo e acertar o pH 7,0 com NaOH 10 N (se estiver ácido) ou com HCl 1 N (se estiver básico). Completar com água destilada para um volume de 1000mL. Guardar em frasco âmbar.

2.3. Ag-RONs de microondas (Kavalco e Pazza, 2004)

1. Pingar em duas regiões centrais de uma lâmina, preparada anteriormente conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 4 gotas de solução aquosa de gelatina a 1% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1mL para cada 100mL de solução) mantida em frasco escuro e em geladeira. Pode-se utilizar gelatina comercial sem sabor e incolor.
2. Adicionar, sobre as gotas anteriores, 2 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 25% mantida em frasco escuro e em geladeira. Cobrir com uma lamínula.
3. Incubar em microondas dentro de um suporte (duas placas de petri, suspendendo a lâmina), por um período de aproximadamente 5 a 8 segundos, até se escutar um estalo da lamínula.
4. Lavar em água destilada, possibilitando que a lamínula seja retirada pela própria água. Corar com Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato (pH=6,8), durante 20 a 30 segundos, e lavar em água corrente.

Gelatina 1%

- 0,5 g de gelatina em pó sem sabor
- 50 mL de água destilada
- 0,5 mL de ácido fórmico

Levar a gelatina e água ao microondas e aquecer até completa dissolução. Esperar chegar à temperatura ambiente e acrescentar o ácido fórmico. Guardar em frasco âmbar a 4° C.

Nitrato de Prata 25%

- 0,25 g de AgNO_3
- 1 mL de água destilada

Diluir o nitrato de prata e filtrar com papel filtro. Guardar em um frasco envolto em papel alumínio e guardar a 4° C.

2.4. Dupla coloração CMA_3 /DAPI (Sola et al., 1982, com modificações)

1. Adicionar em uma cubeta de plástico 50 mL de tampão McIlvaine + 150 μL de DAPI (cubeta 1).
2. Adicionar em outra cubeta de plástico 50 mL de tampão McIlvaine (cubeta 2).
3. Lavar as lâminas em tampão McIlvaine (cubeta 2) por 15 minutos. Deixar secar ao ar.
4. Adicionar 100 μL de CMA_3 em cada lâmina e cobrir com lamínula. Levar em câmara escura por 60 minutos 37°C.
5. Lavar as lâminas em tampão + DAPI (cubeta 1) apenas para retirar lamínulas. Posteriormente lavar em jato de água.
6. Lavar as lâminas em tampão (cubeta 2) por 10 minutos. Deixar secar ao ar.
7. Lavar as lâminas em tampão + DAPI (cubeta 1) por 30 minutos.
8. Retirar as lâminas e rapidamente lavá-las em tampão (cubeta 2) por 5 minutos. Deixar secar ao ar.
9. Montar cada lâmina com 25 μL de antifade e cobrir com lamínula.
10. Armazenar as lâminas em local escuro a 4°C.

2.5. Hibridação Fluorescente in situ (Pinkel et al., 1985; Hamkalo e Elgin, 1991)

Marcação da Sonda de DNA:

Preparo de 8 a 10 lâminas

Com Biotina (Kit Bionick Labeling System – Invitrogen):

1. Pipetar em um tubo de 1,5 mL no gelo (caso use termociclador, use tubo de 0,2 mL):
 - Adicionar 5 μ L de dNTP mix 10x.
 - Adicionar ___ μ L (1 μ g) de DNA.
 - Adicionar ___ μ L de água destilada (q.s.p. 45 μ L).
 - Adicionar 5 μ L de Enzima mix 10x.
2. Fechar o tubo e centrifugar rapidamente (spin 15000g).
3. Incubar a 16°C por uma hora (para sondas pequenas, o tempo de incubação pode ser de até duas horas).
4. Adicionar 5 μ L de Stop Buffer;
5. Precipitar o DNA com acetato de sódio 3M (5 μ L) e etanol absoluto gelado (110 μ L). Misturar invertendo o tubo. Levar a freezer -20°C por duas horas ou overnight.
6. Centrifugar a 15000g por 10 minutos.
7. Cuidadosamente, remover o sobrenadante e secar o pellet.
8. Ressuspender o pellet em 50 μ L de água destilada;
9. Repetir os passos 5 e 6.
10. Ressuspender em 80 μ L de TE (10 mM Tris-HCl (pH 7,5) – 1 mM EDTA) e armazenar a -20°C. Caso a sonda seja utilizada no mesmo dia, pode-se usar água destilada (do próprio kit).

Preparação das lâminas

Todas as lavagens devem ser feitas sob agitação

Tratamento com RNase

1. Incubar as lâminas em 90 μ L de RNase 0,4% em 2xSSC, por uma hora, em câmara úmida a 37°C.
2. Lavar três vezes em 2xSSC por 5 minutos cada.
3. Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente.

Solução de RNase para 8 lâminas:

- 3,2 μ L RNase 10mg/mL
- 796,8 μ L 2xSSC

Solução de 20xSSC:

- 175,3 g de cloreto de sódio (NaCl);
 - 88,2 g de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
 - água destilada qsp 800 mL;
- Dissolver os sais e acertar o pH 7,0. Completar com água destilada para um volume de 1000 mL.

Tampão PBS 10x:

- 8 g de cloreto de sódio (NaCl);
- 0,2 g de cloreto de potássio (KCl);
- 1,15 g de fosfato de sódio (Na_2HPO_4) ou 2,17 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 0,2 g de KH_2PO_4 ;
- água destilada qsp 1000 mL;

Pós-fixação

1. Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50nM de cloreto de magnésio durante 10 minutos, em temperatura ambiente.
2. Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente.
3. Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70% (sob agitação), 85% e 100%, por 5 minutos cada.

Solução pós-fixação para cubeta de 100mL:

- 100 mL de formaldeído.
- 10 mL de PBS 10x.
- 5 mL de MgCl_2 1M.
- 84 mL de água destilada.

Pré-hibridação

1. Desnaturar o DNA das lâminas em formamida 70% em 2xSSC por 5 minutos a 70°C.
2. Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada.
3. Deixar secar ao ar, enquanto prepara-se a solução de hibridação.

Solução formamida para cubeta de 50mL:

- 35 mL de formamida pura.
- 15 mL de 2xSSC

O etanol 70% deve estar gelado, numa cuba com gelo, para dar o choque térmico.

Solução de Hibridação

1. Adicionar aos 80 μL de sonda marcada:
2. 200 μL de formamida pura;
3. 80 μL de sulfato dextrano 50% (concentração final 10%).
4. 40 μL de 20xSSC.

Hibridação

1. Levar a solução de hibridação ao banho fervente por 10 minutos e levar ao gelo imediatamente depois.

- Colocar 40 μL da solução de hibridação sobre uma lamínula e inverter a lâmina seca sobre a lamínula.
- Deixar as lâminas com material voltado para baixo em câmara úmida a 37°C overnight.

Lavagens

- Lavar as lâminas em 2xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos, apenas para soltar as lamínulas.
- Lavar duas vezes em formamida 20% em 0,1xSSC a 42°C, durante 5 minutos cada.
- Lavar duas vezes em 0,1xSSC a 42°C durante 5 minutos cada.
- Lavar uma vez em 2xSSC a 42°C durante 5 minutos.
- Lavar em Tween 20/20xSSC durante 5 minutos, em temperatura ambiente.

Solução de Tween20/20xSSC:

- 200 mL de 20xSSC;
- 5 mL da solução estoque de Tween 20 (10%)
- Água destilada qsp 1000 mL;

As lavagens devem ser feitas sempre sob agitação, e as lâminas não devem ser deixadas secando. A montagem para amplificação deve ser feita escorrendo a lâmina, porém em seguida das lavagens anteriores.

Detecção do Sinal

- Incubar as lâminas em tampão NFDm por 15 minutos.
- Lavar duas vezes em Tween 20/20xSSC por 5 minutos cada, em temperatura ambiente.
- Incubar as lâminas com 90 μL de solução de FITC-avidina (preparada 30 minutos antes), durante 30 minutos em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente.
- Lavar 3 vezes em Tween 20/20xSSC por 5 minutos cada, em temperatura ambiente.
- Incubar as lâminas com 90 μL de solução de anti-avidina conjugada com biotina (preparada 30 minutos antes), durante 30 minutos em câmara úmida escura, em temperatura ambiente.
- Repetir passo 4 (lavagem).
- Repetir passo 3 (FITC-avidina).
- Repetir passo 4 (lavagem).
- Repetir passo 5 (anti-avidina)

Tampão NFDm (non fat dry milk):

- 20 mL de 2xSSC;
- 80 mL de água destilada;
- 5 g de leite em pó desnatado (Molico Ca^{++})

Solução de FITC-avidina:

- 1 μL FITC-avidina (250 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$);
- 1000 μL de NFDm;

Solução de anti-avidina (conjugada com biotina):

10. Repetir passo 4 (lavagem).
11. Repetir passo 3 (FITC-avidina).
12. Repetir passo 4 (lavagem).
13. Desidratar as lâminas em série alcoólica de etanol 70% (sob agitação), 85% e 100%, por 5 minutos cada, e deixar secar ao ar.

Montagem das lâminas

1. Monte as lâminas com solução de iodeto de propídio e antifade, na proporção de 200 μL de antifade para 8 μL de PI a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com lamínula longa (60 x 24 mm).
2. Caso use Vectashield Mounting Medium **with PI** (1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) da marca Vector, acrescentar mais PI, para melhor contraste:
 - 200 μL de antifade com PI.
 - 2 μL de PI (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$).
3. Alternativamente pode ser usado DAPI com antifade, ou Vectashield Mounting Medium **with DAPI**;
4. Guardar as lâminas montadas numa caixa escura, em geladeira, por pelo menos um dia antes da análise em microscópio de epifluorescência. As lâminas, se conservadas adequadamente podem ser analisadas a qualquer tempo. Não é preciso escorrer o óleo de imersão (que deve ser próprio para fluorescência) das lâminas durante as análises.

Não usar a versão Hard-set do Vectashield Mounting Medium da Vector, pois este não espalha bem pela lâmina, deixando bolhas.
--

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão, a seção Resultados e Discussão foi organizada na forma de três capítulos.

CAPÍTULO I

Evidência de nova espécie com sistema cromossômico sexual XX/XY pertencente ao complexo de espécies *H. ancistroides* (Loricariidae)

Dinaíza Abadia Rocha Reis, Karina de Oliveira Brandão, Lurdes Foresti de Almeida Toledo, Rubens Pazza, Karine Frehner Kavalco

RESUMO – O gênero *Hypostomus* apresenta ampla distribuição em rios brasileiros. A existência de diversos morfotipos em bacias diferentes sugere que *H. ancistroides* represente um complexo de espécies na região do Alto rio Paraná. O objetivo deste trabalho é apresentar os subsídios citogenéticos e moleculares necessários para a caracterização de uma nova espécie pertencente ao complexo de espécies *H. aff. ancistroides*. Todos os exemplares apresentaram 66 cromossomos, exceto por um macho que revelou $2n = 67$. O acréscimo deste cromossomo ao complemento o caracterizou como supranumérico. Exceto por uma descrição para a bacia do rio Tibagi, todas as populações descritas de *H. ancistroides* apresentam $2n = 68$. Houve heteromorfismo de sexo, caracterizando um sistema sexual do tipo XX/XY, onde o macho é o sexo heterogamético. O cromossomo X é um acrocêntrico pequeno e o Y é o maior metacêntrico do complemento. Blocos de heterocromatina foram observados em regiões pericentroméricas e terminais de diversos pares. Ag-RONs mostraram 2-5 sítios em região terminal de subtelocêntricos/acrocêntricos, incluindo o cromossomo Y. Regiões AT-ricas não foram evidenciadas, enquanto que GC-ricas foi evidenciada em apenas um homólogo do par e coincidente com Ag-RONs. FISH com rDNA 18S marcou quatro sítios em fêmeas e cinco sítios em machos, todos em região terminal. A variação é devida à presença de um sítio no cromossomo Y. FISH com rDNA 5S evidenciou dois sítios em região terminal dos cromossomos para ambos os sexos. Análise filogenética demonstrou que esta população forma um grupo monofilético em relação a outras populações de *H. ancistroides*. A redução do número diploide com consequente isolamento reprodutivo, a existência de um sistema cromossômico sexual e o monofiletismo apresentado evidenciam que esta população é uma nova espécie do complexo *H. ancistroides*.

Palavras-chave: Complexo de espécies, Alto Paraná, Diversidade cariotípica.

CHAPTER I

Evidence of new species with sex chromosome system XX / XY belonging to the species complex *H. ancistroides* (Loricariidae)

Dinaíza Abadia Rocha Reis, Karina de Oliveira Brandão, Lurdes Foresti de Almeida Toledo, Rubens Pazza, Karine Frehner Kavalco

ABSTRACT – Fish of the *Hypostomus* genus are widely distributed in Brazilian rivers. The existence of several morphotypes in different basins suggests that *H. ancistroides* represents a complex of species in the Upper Paraná River region. The objective of this work is to present the cytogenetic and molecular subsidies necessary for the characterization of a new species belonging to the species complex *H. aff. ancistroides*. All specimens showed 66 chromosomes, except for one male who showed $2n = 67$. The addition of this chromosome to the complement characterized it as supernumerary. Except for a description of specimens from the Tibagi river basin, all populations described in *H. ancistroides* have $2n = 68$. There was heteromorphic sex, featuring a sexual system type XX/XY, where the male is the heterogametic sex. The X chromosome is a small acrocentric and the Y is the largest metacentric complement. Heterochromatin blocks were observed at pericentromeric regions and several pairs of terminals. Ag-NOR staining showed 2-5 sites in the terminal region of subtelomeric/acrocentric chromosomes, including the Y chromosome. AT-rich regions were not evidenced, while GC-rich regions were evidenced in only one pair of the homolog and coincides positive with Ag-NORs. Fish with 18S rDNA scored four sites in females and five sites in males, all in the terminal area. The variation is due to the presence of a site on chromosome Y. Fish with 5S rDNA revealed two sites in the terminal region of the chromosomes in both sexes. Phylogenetic analysis shows that this population forms a monophyletic group in relation to other populations of *H. ancistroides*. The reduction of the diploid number with consequent reproductive isolation, the existence of a sexual chromosome monophyletism system and the characteristics presented show that this population is a new species of the complex *H. ancistroides*.

Key words: Karyotype diversity, Species complex, Upper Paraná.

INTRODUÇÃO

A subfamília Hypostominae é composta por 464 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2016), com o gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) sendo dominante nos rios brasileiros (Britski, 1972). Devido à grande variabilidade de morfologia e coloração e à ausência de revisões taxonômicas recentes, é problemática a identificação ao nível de espécies neste grupo (Maurutto, 2010).

O padrão de distribuição e alto desempenho adaptativo dos Hypostominae pode levar a grupos distintos, sem aparentes barreiras geográficas, o que torna úteis os estudos de citogenética molecular para a identificação de espécies crípticas (Alves et al., 2005; Bickford et al., 2007).

Apesar de estudos citogenéticos revelarem que a maioria dos Loricariidae não apresenta diferenciação cromossômica sexual (Artoni e Bertollo 2001; Alves et al., 2005; Kavalco et al., 2005), já foram descritos alguns casos. Em Hypostominae, foram relatados alguns sistemas cromossômicos sexuais, como, por exemplo, ZZ/ZW em *Hypostomus* sp. (Artoni et al., 1998), *Hemiancistrus spilomma* (de Oliveira et al., 2006) e *H. cf. plecostomus* (Oliveira et al., 2015), XX/X0 em *Ancistrus* n. sp.1 (Alves et al., 2006), XX/XY em *Ancistrus cf. dubius* (Mariotto e Miyazawa, 2006). Há ainda uma possível descrição do sistema XX/XY para *Hypostomus ancistroides* por Michelli et al. (1977).

Cromossomos B, ou supranuméricos, são adicionais e não homólogos ao complemento A, possuem evolução independente e são considerados dispensáveis para o desenvolvimento dos organismos (Camacho, 1993). Cerca de metade das espécies de peixes neotropicais com cromossomos B são Characiformes, seguido de 35% de Siluriformes, que apresenta relatos em apenas cinco famílias: Callichthyidae, Heptapteridae, Pimelodidae, Trichomycteridae e Loricariidae (Carvalho et al., 2008).

A região do Alto rio Paraná, abriga cerca de 25 espécies do gênero *Hypostomus* (Weber, 2003), o que revela que existe nesta região uma complexa história evolutiva para o gênero. Há indícios que o táxon *H. ancistroides* nesta região represente um complexo de espécies, pois análises morfológicas prévias revelam diferentes morfotipos em diferentes bacias de sua área de distribuição. Crê-se que esses diferentes morfotipos sejam potencialmente diferentes espécies que necessitam ser descritas (Hollanda Carvalho, 2011).

O objetivo deste trabalho é apresentar os subsídios citogenéticos e moleculares necessários para a caracterização de uma nova espécie pertencente ao complexo de espécies *H. aff. ancistroides*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta e identificação do material

A coleta dos exemplares ocorreu nas proximidades da cidade de São Miguel Arcanjo, estado de São Paulo, na região pertencente à bacia do Alto Paranapanema (23°54'14.30"S; 47°55'46.75"O). Foram capturados 27 indivíduos, 11 machos e 16 fêmeas.

Os espécimes foram levados ao Laboratório de Ictiologia da Universidade de São Paulo (LIUSP) para processamento, sendo posteriormente fixados em formol e armazenados em etanol 70%. Em seguida, foram levados ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MUZUSP) para identificação, onde foram considerados integrantes de uma nova espécie, semelhante morfologicamente à *H. ancistroides*. Assim, foram descritos como *H. aff. ancistroides*. Atualmente, estes exemplares fazem parte da coleção ictiológica do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva (LaGEEvo) da Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba.

Preparações cromossômicas e técnicas de bandamento

As preparações para obtenção de cromossômicos mitóticos a partir de suspensão de células do rim anterior seguiram o protocolo de Gold et al. (1990). Além de coloração convencional com Giemsa, outras técnicas de bandamentos cromossômicos foram realizadas.

A detecção de heterocromatina constitutiva foi realizada segundo protocolo de Summer (1972). Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) foram detectadas por impregnação de nitrato de prata de acordo com Kavalco e Pazza (2004). A visualização de regiões GC-ricas e AT-ricas foi realizada com Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), respectivamente, seguindo Sola et al. (1982), com algumas modificações.

Foram analisadas 12 células de cada indivíduo da população em microscópio óptico e as imagens capturadas em microscópio OLIMPUS BX 41, utilizando câmera acoplada, com 3 MP de definição, pelo do software QCapture Pro 6.0. As imagens foram editadas com o software GIMP 2.6. A classificação dos tipos cromossômicos procedeu segundo Levan et al. (1964), levando em consideração a razão de braços (RB).

Hibridação Fluorescente in situ (FISH)

A técnica de Hibridação Fluorescente in situ (FISH) foi realizada segundo os protocolos de Pinkel et al. (1986) e Hamkalo e Elgin (1991), modificados conforme Pazza et al. (2006), utilizando sondas de rDNA 18S e rDNA 5S obtidas, respectivamente, a partir do genoma de *Prochilodus lineatus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999).

A hibridação foi detectada com avidina e FITC para sondas de rDNA 18S e Cy3 para sondas de rDNA 5S. A montagem das lâminas foi realizada com antifade e iodeto de propídeo, e antifade e DAPI para sondas de rDNA 18S e rDNA 5S, respectivamente.

As análises foram feitas em microscópio óptico acoplado com fonte de epifluorescência. As imagens foram capturadas com microscópio OLIMPUS BX 41, com câmera acoplada de 3 MP, utilizando o software QCapture Pro 6.0. As imagens foram editadas com o software GIMP 2.6.

Análises filogenéticas

Foram inferidas as relações filogenéticas entre algumas populações do complexo *H. ancistroides* com base nos genes mitocondriais Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e Citocromo b (Cyt b) utilizando o método de Máxima Verossimilhança.

O Apêndice A apresenta os dados referentes às populações analisadas e seus respectivos pontos de coleta.

Os primers de mtDNA COI utilizados foram Fish F1 (5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGC-3') e Fish R1 (5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGA-3'). Para amplificação dos segmentos de Cyt b foram utilizados os primers Cyt Fc e Cyt Rc, como descrito em Lujan et al. (2015).

A análise de Máxima Verossimilhança (MV) foi conduzida em PAUP 4.0, com escolha do melhor modelo de substituição de nucleotídeos por Akaike Information Criterion (AIC) como implementado em Modeltest 2.3 (Nylander, 2004). Para COI o

melhor modelo foi HKY e para Cyt b foi selecionado TVM, ambos com distribuição gamma, com 1000 replicações de bootstrap.

RESULTADOS

Representantes de *H. aff. ancistroides* apresentaram 66 cromossomos para ambos os sexos (Fig, 3A e 3B), exceto por um macho da população que apresentou $2n = 67$ (Figura 3C). Este acréscimo de um cromossomo no complemento, neste caso um acrocêntrico, caracteriza-o como um cromossomo supranumérico (Figura 3C – caixa inferior).

As fórmulas cariotípicas obtidas foram $16M + 12SM + 12ST + 26A$ para fêmeas (Figura 3A); $17M + 12SM + 12ST + 25A$ para machos (Figura 3B); e $17M + 12SM + 12ST + 26A$ para o macho com cromossomo B (Figura 3C).

Uma análise comparativa dos cariótipos de machos e fêmeas da população evidenciou um heteromorfismo relacionado ao sexo, onde o macho representa o sexo heterogamético, representando um sistema cromossômico sexual XX/XY (Figura 3). O cromossomo X é representado por um par de acrocêntricos nas fêmeas (Figura 3A - caixa) e um único cromossomo deste tipo nos machos. O cromossomo Y é representado pelo maior cromossômico metacêntrico do complemento que não apresenta homólogo, visualizado apenas nos machos (Figura 3B - caixa).

As análises por impregnação de nitrato de prata evidenciaram variações de 2 a 5 sítios de RONS (Figuras 4 e 7), todas em regiões terminais, tanto em cromossomos subtelo-cêntricos e acrocêntricos, quanto no cromossomo Y (Figura 4A – ponta de seta). Foi observada uma metáfase onde houve associação entre os sítios de dois cromossomos de pares diferentes (Figura 4A – asterisco).

Blocos de heterocromatina constitutiva foram evidenciados na região pericentromérica dos pares 2, 6 e 7 e na região terminal do par 15 e nos dois cromossomos X nas fêmeas. Destaque para apenas um homólogo do par 5 com bandas distais (Figura 5A). Nos machos, ocorreram menos blocos conspícuos de heterocromatina, onde apenas o par 6 apresentou marcações pericentroméricas, um homólogo do par 5 com blocos distais e o cromossomo X com blocos terminais (Figura 5B). O cromossomo supranumérico do indivíduo macho já mencionado apresentou-se totalmente heterocromático (Figura 5C - círculo).

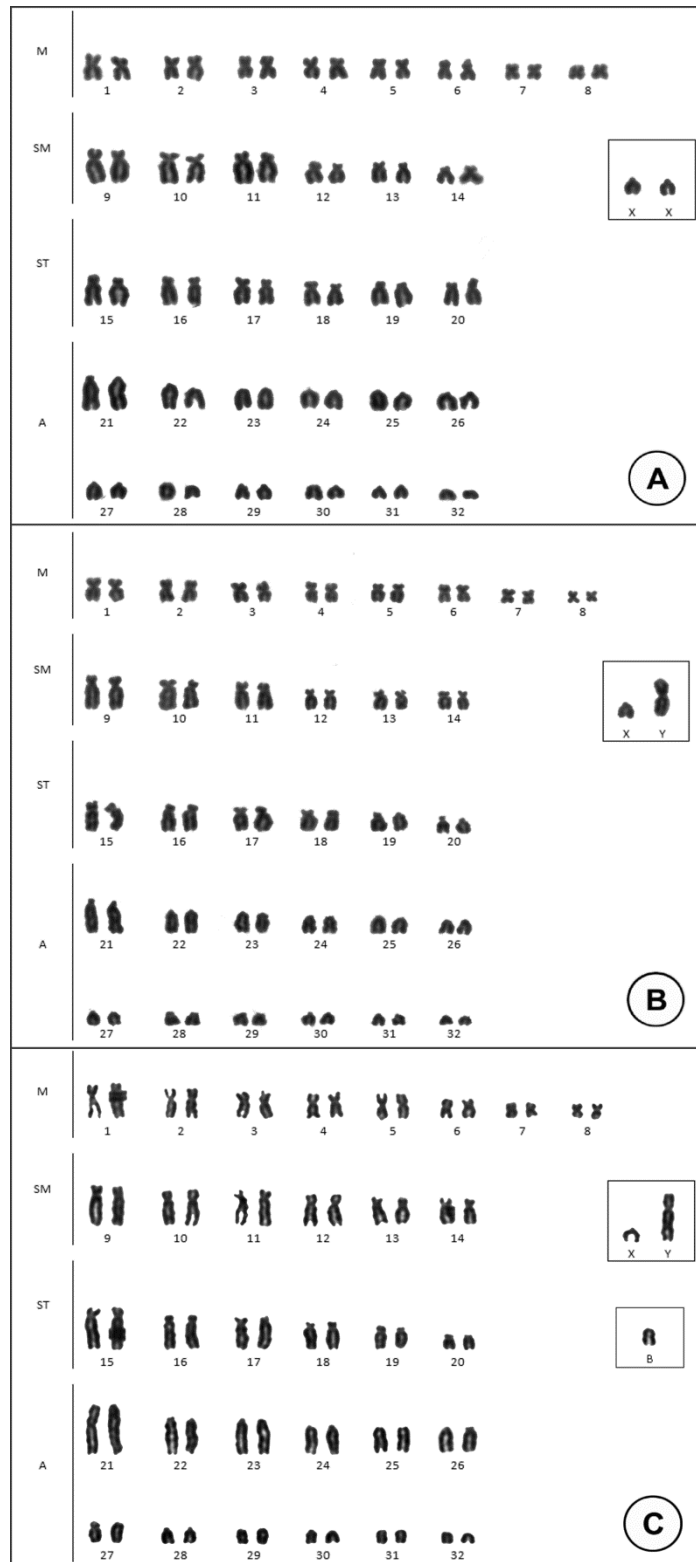


Figura 3. Fórmulas cariotípicas para a população de *H. aff. ancistroides*. Em A, cariótipo para fêmeas, em B para machos, em C macho com cromossomo supranumérico. Cromossomos sexuais e supranumérico destacados nas caixas.

Regiões GC-ricas foram detectadas em apenas um dos cromossomos subtelocêntricos do par 15 pela técnica de CMA₃ (Figuras 6 e 7), que por sua vez foi sobreposto por Ag-RONs. Não foram observados sítios AT-ricos pela coloração com DAPI (dados não apresentados).

A FISH com sonda de rDNA 18S evidenciou quatro sítios em fêmeas e cinco sítios em machos, em cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos coincidentes com Ag-RONs (Figuras 6 e 7). O quinto sítio nem sempre foi visível, provavelmente por ser muito pequeno. A variação no número de sítios entre machos e fêmeas é devido à presença de um cístron ribossomal conspícuo no cromossomo Y (Figuras 6 e 7). Utilizando sondas de rDNA 5S, foram identificados dois sítios em região terminal dos cromossomos para ambos os sexos (Figuras 6 e 7).

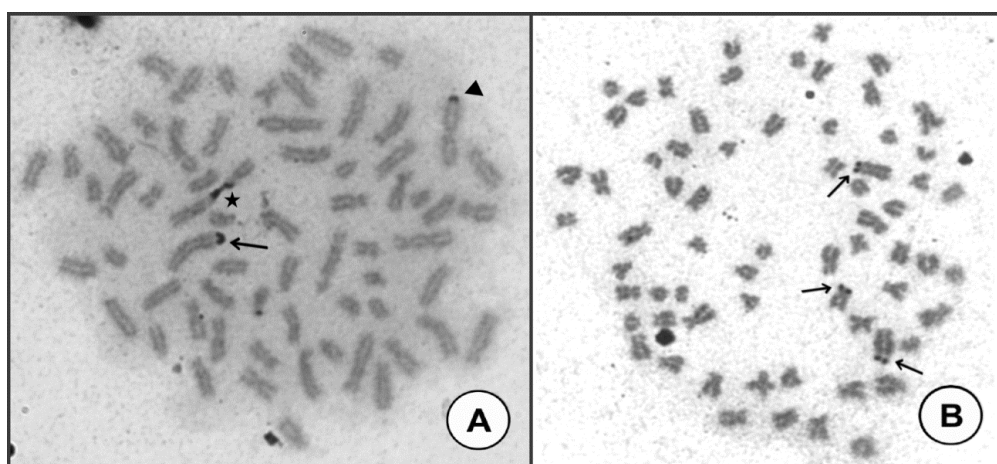


Figura 4. Metáfases de machos (A) e fêmeas (B) após detecção de RONS (sítios). Em A, sítio encontrado no cromossomo Y evidenciado pela ponta de seta e associação de RONS entre cromossomos diferentes marcada com asterisco.

A análise filogenética evidenciou a formação de um grupo monofilético composto apenas pela população de *H. aff. ancistroides* de São Miguel Arcanjo, tanto com mtDNA COI quanto com Cyt B (Figuras 8 e 9, respectivamente).

DISCUSSÃO

As espécies do gênero *Hypostomus* exibem grande diversidade cariotípica, a começar pelo número diplóide, que varia de 52 (Artoni e Bertollo, 2001) a 84 cromossomos (Cereali et al., 2008). Todas as populações de *H. ancistroides* já descritas

apresentaram 68 cromossomos, com exceção de uma população coletada no rio Tibagi em Ponta Grossa/PR (Maurutto et al., 2012) e o presente estudo (Figura 3A e 3B), onde o número diplóide encontrado foi 66 cromossomos. Como rearranjos Robertsonianos são muito importantes e fazem parte da história evolutiva de Hypostominae (Artoni e Bertollo, 2001), assim como fissões cêntricas, poderiam ocorrer fusões que consequentemente diminuiriam o número diploide encontrado.

Não foram encontrados híbridos entre populações de 66 e 68 cromossomos. Caso fossem encontrados, devido à redução do número diploide poderia acontecer não-balanceamento de cromossomos na divisão celular, inviabilizando a prole. Isso sugere que esta população encontra-se isolada reprodutivamente de *H. ancistroides* que possuem 68 cromossomos.

Apesar de certa manutenção do número diploide, todas as populações de *H. ancistroides* apresentam fórmula cariotípica diferente (Tabela 1). Este fato reforça a importância dos rearranjos cromossômicos, que são mais facilmente fixados em espécies com vagilidade reduzida, uma vez que populações isoladas são mais comumente envolvidas em processos de endogamia (Almeida-Toledo et al., 2000). Moreira Filho e Bertollo (1991), Maistro et al. (2000) e Alves e Martins Santos (2002) relatam fenômeno semelhante em *Astyanax scabripinnis*.

A primeira descrição da existência de um cromossomo B em peixes telósteos ocorreu em *Prochilodus lineatus*, onde foram descritos pequenos cromossomos fortemente heterocromáticos (Fenocchio e Bertollo, 1990). Outros casos foram observados em *Astyanax eigenmanniorum* (Torres-Mariano, 2001), no gênero *Rhamdia* (Centofante, 2003; Fenocchio e Bertollo, 1990), em *Harttia longipinna* (Blanco et al., 2012) e o grande cromossomo B metacêntrico em *Astyanax scabripinnis* (Mestriner et al., 2000, por exemplo).

Cromossomos B são considerados adicionais, podendo se originar de cromossomos A, mas possuem evolução independente destes (Camacho et al., 2000). Além disso são constituídos praticamente por heterocromatina, possuindo assim, replicação tardia (Volobujev, 1981). Segundo Jones e Rees (1982), a terminologia “cromossomo B” só deverá ser utilizada quando há certa frequência deste entre os indivíduos da população, tratando-se assim de um polimorfismo e não apenas variação. Neste trabalho pode-se observar então a ocorrência de um cromossomo supranumérico em um indivíduo (Figura 3C), o qual representa apenas uma variação populacional.

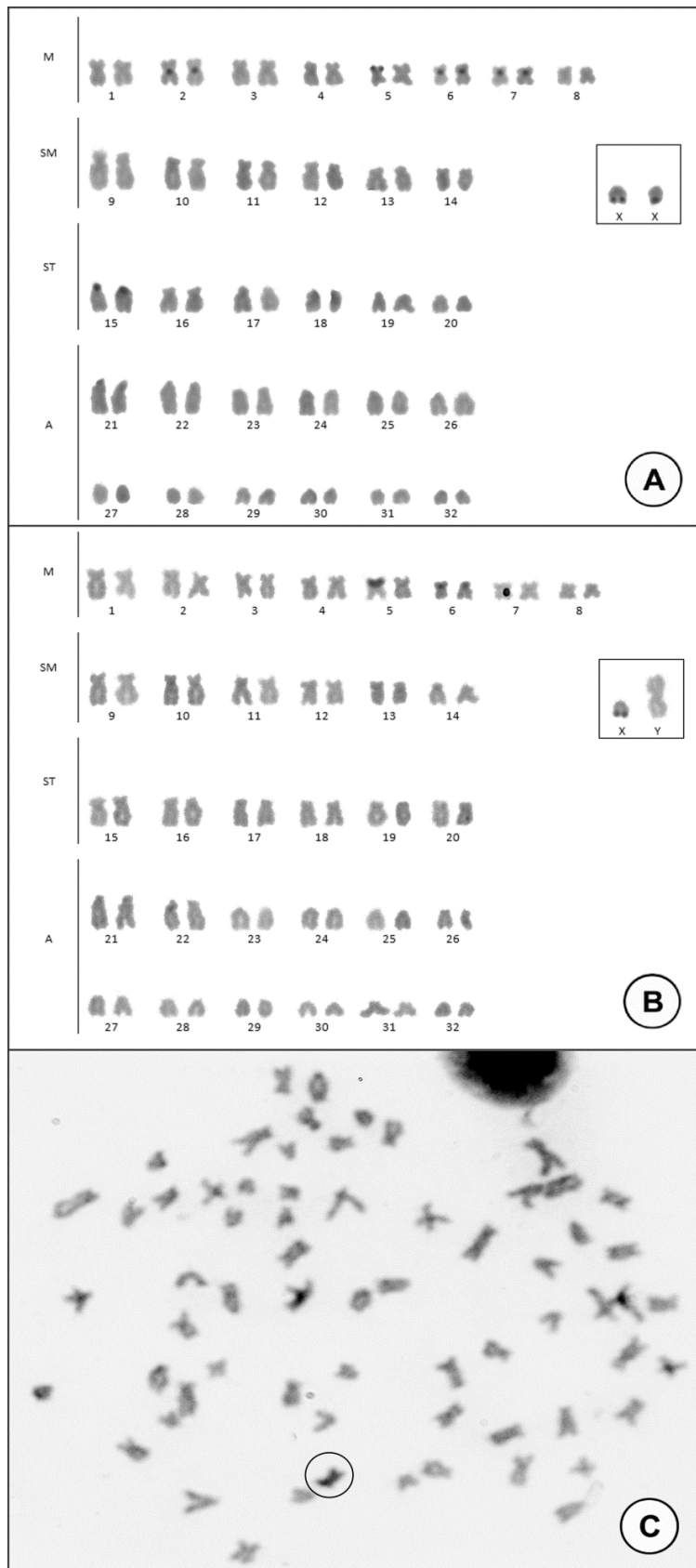


Figura 5. Distribuição da heterocromatina constitutiva em fêmeas (A) e machos (B).

Em C, metáfase que demonstra a constituição heterocromática do cromossomo supranumérico (círculo).

Segundo Foresti et al. (1981), polimorfismos numérico e de tamanho de Ag-RONs são comuns em peixes neotropicais de água doce. A presença de RONS simples (apenas um par de sítios) é considerada uma condição comum em Loricariidae, entretanto, o gênero *Hypostomus* apresenta RONS múltiplas (Artoni e Bertollo 2001; Kavalco et al., 2005; Alves et al., 2006; Martinez et al., 2011; Rubert et al., 2011), incluindo *H. ancistroides* (Tabela 1). Os resultados das Ag-RONs deste trabalho reforçam tal padrão já observado, onde foram evidenciados 2 a 5 sítios (Figuras 4 e 7). A respeito da posição, todas as Ag-RONs aqui encontradas estavam localizadas em região terminal dos cromossomos, uma característica que parece estar conservada no grupo (Artoni e Bertollo 1996; Artoni e Bertollo 2001; Kavalco et al., 2005; Alves et al., 2006; Cereali et al., 2008; Martinez et al., 2011; Rubert et al., 2011, Endo et al., 2012; Traldi et al., 2013, entre outros).

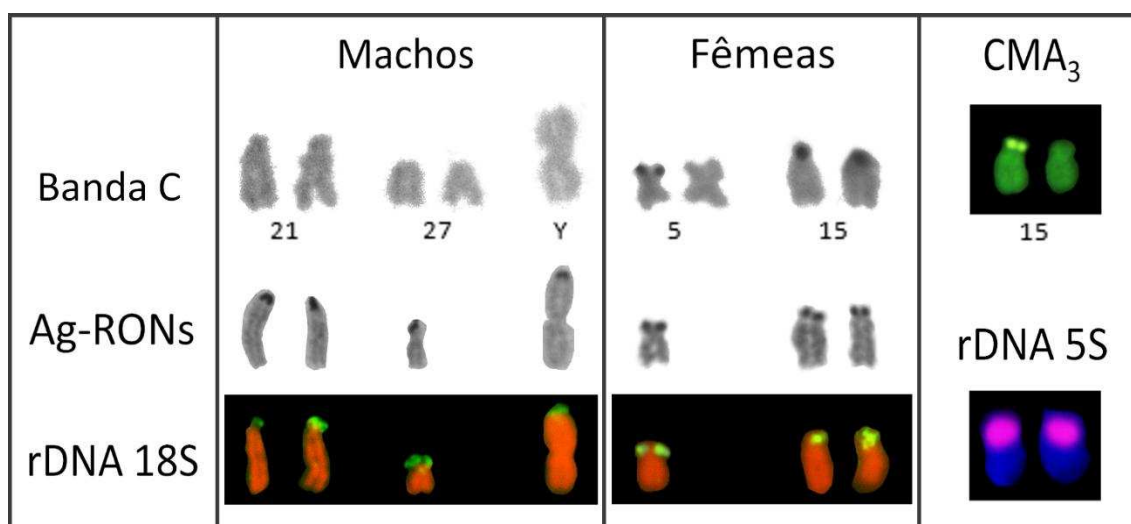


Figura 6. Fenótipos encontrados para bandamento C, Ag-RONs, CMA3 e FISH com rDNA 18S e 5S

Para a detecção de Ag-RONs, admite-se a necessidade de atividade transcricional dos genes ribossomais durante a interfase anterior (Howell, 1977; Hubbel, 1985), pois a prata se liga a proteínas nucleolares e não ao rDNA (Miller et al., 1976). Este fato pode explicar a variação de sítios de RONS em cromossomos homólogos, assim como a associação de sítios de cromossomos de pares diferentes, como demonstrado na Figura 4A.

De acordo com Mariotto et al. (2009), loricariídeos geralmente apresentam pouca heterocromatina constitutiva. Neste trabalho, assim como descrito para *H. ancistroides*

por Artoni e Bertollo (1996), Rubert et al. (2011) e Traldi et al. (2013), os blocos de heterocromatina se localizaram em região pericentromérica e terminal (Figuras 5 e 7). Houve correspondência de Ag-RONs com blocos de heterocromatina em fêmeas nos pares 5 e 15, como mostrado nas Figuras 6 e 7. Essas sobreposições são frequentes em peixes neotropicais, o que possibilita a dispersão de RONS ao longo do genoma (Moreira-Filho et al., 1984; Vicari et al., 2008).

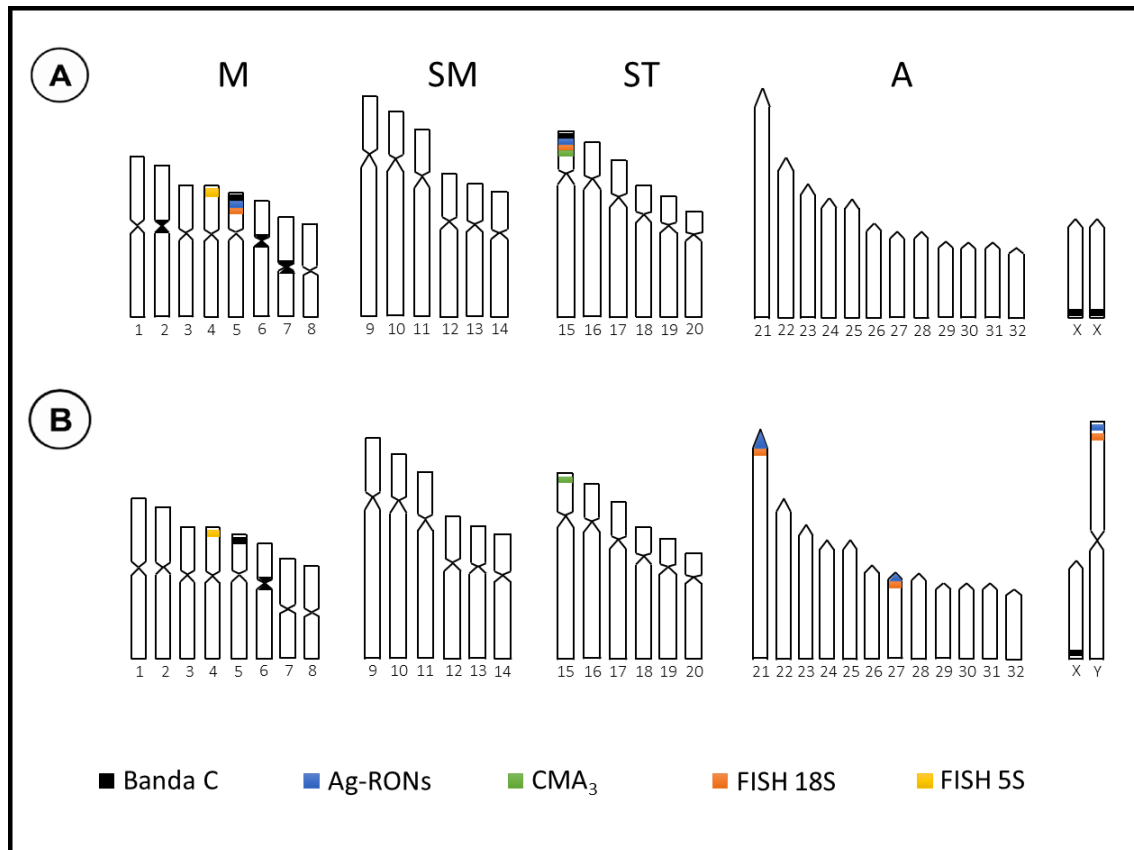


Figura 7: Ideogramas de fêmeas (A) e machos (B) de *H. aff. ancistroides*, demonstrando as marcações cromossômicas presentes nos indivíduos.

Regiões ricas em GC já foram observadas em algumas espécies de *Hypostomus* (Kavalco et al., 2004a; Rubert et al., 2008; 2011; Bitencourt et al., 2011), e são comumente associadas a RONS, tornando a coloração com fluorocromos GC-específicos uma técnica utilizada de forma indireta para detecção de sítios ribossômicos (Mayr et al., 1985; Schmid e Guttenbach, 1988). Foi observado apenas um sítio em um homólogo do par (Figuras 6 e 7), provavelmente devido a trocas desiguais durante a interfase, que apresentou correspondência com Ag-RONs (maior par subtelocêntrico em ambos os sexos – Figuras 6 e 7). Entretanto, esta sobreposição pode nem sempre

acontecer, demonstrando que outras heterocromatinas podem responder a CMA₃, como observado por Artoni et al. (1999) para *Liposarcus anisitsi*. Pela coloração com DAPI, não foram observadas marcações positivas, visto que regiões AT-ricas são raras em peixes. Mas este fato já foi relatado em algumas espécies do gênero *Hypostomus* (Kavalco et al., 2004a; Rubert et al., 2011; Rocha Reis et al., 2013), de peixes zebra (Gornung et al., 1997; Phillips e Reed, 2000) e de gobies (Canapa et al., 2002).

Tabela 1. Dados citogenéticos disponíveis para *Hypostomus ancistroides*. Adaptado de Lorscheider et al. (2015).

Espécie	Bacia Hidrográfica	2n	Fórmula	NOR	Referência
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Bacia do Rio Piracicaba	68	16m + 18sm + 34st/a	Múltipla	Artoni e Bertollo (1996)
<i>H. ancistroides</i>	Bacia do Rio Tietê	68	18m + 10sm + 12st + 28a	Múltipla	Alves et al. (2006)
<i>H. ancistroides</i>	Bacia do Rio Piquiri	68	14m + 14sm + 8st + 32a	Múltipla	Bueno et al. (2011, 2013)
<i>H. ancistroides</i>	Bacia do Rio Paranapanema	68	10m + 26sm + 32st /a	Múltipla	Rubert et al. (2011)
<i>H. ancistroides</i>	Bacia do Rio Pirapó	68	14m + 12sm + 18st + 24a	Múltipla	Endo et al. (2012)
<i>H. ancistroides</i>	Bacia do Rio Pirapó	68	16m + 12sm + 18st + 22a	Múltipla	Endo et al. (2012)
<i>H. ancistroides</i>	Bacia do Rio Ivaí	68	8m + 10sm + 18st + 32a	Múltipla	Endo et al. (2012)
<i>H. ancistroides</i>	Bacia do Rio Corumbataí	68	16m + 4sm + 16st + 32a	Múltipla	Alves et al. (2012)
<i>H. ancistroides</i>	Bacia do Rio Tibagi	66	12m + 16sm + 10st + 28a	Múltipla	Maurutto et al. (2012)
<i>H. ancistroides</i>	Bacia do Rio Paranapanema	68	10m + 20sm + 10st + 28a	Múltipla	Pansonato-Alves et al. (2013)
<i>H. ancistroides</i>	Bacia do Rio Passa Cinco	68	14m + 16sm + 22st + 16a	Múltipla	Traldi et al. (2013)

Os dados referentes à localização de RONS no complemento de espécies de *Hypostomus* revelam que enquanto a maioria foram obtidos por impregnação de nitrato de prata (Artoni e Bertollo 1996; Artoni e Bertollo, 2001; Kavalco et al., 2005; Alves et al., 2006; Cereali et al., 2008; Milhomem et al., 2010; Bitencourt et al., 2011; Martinez et al., 2011, entre outros), aqueles mais robustos e eficazes que mostram a localização física do rDNA 18S e que não dependem da atividade transcricional do gene (Miller et al., 1976), apesar de crescentes, ainda são escassos em relação ao número de espécies

existentes (Kavalco et al., 2005; Mendes-Neto et al., 2011; Rubert et al., 2011; Traldi et al., 2013; Maurutto et al., 2012; Pansonato-Alves et al., 2013, Bueno et al., 2014).

FISH com sondas de rDNA 18S evidenciou quatro sítios em fêmeas e cinco sítios em machos, coincidentes com as Ag-RONs observadas (Figuras 6 e 7). Isso demonstra que a maioria dos sítios estavam ativos em interfases anteriores, devido ao fato da variação de 2-5 sítios Ag-RONs. Em um trabalho sobre as tendências evolutivas de sítios ribossomais em *Hypostomus*, Bueno et al. (2014) destaca que espécies com número diploide de 68 a 72 cromossomos apresentam múltiplos sítios de rDNA 18S, corroborando com ao dados aqui apresentados.

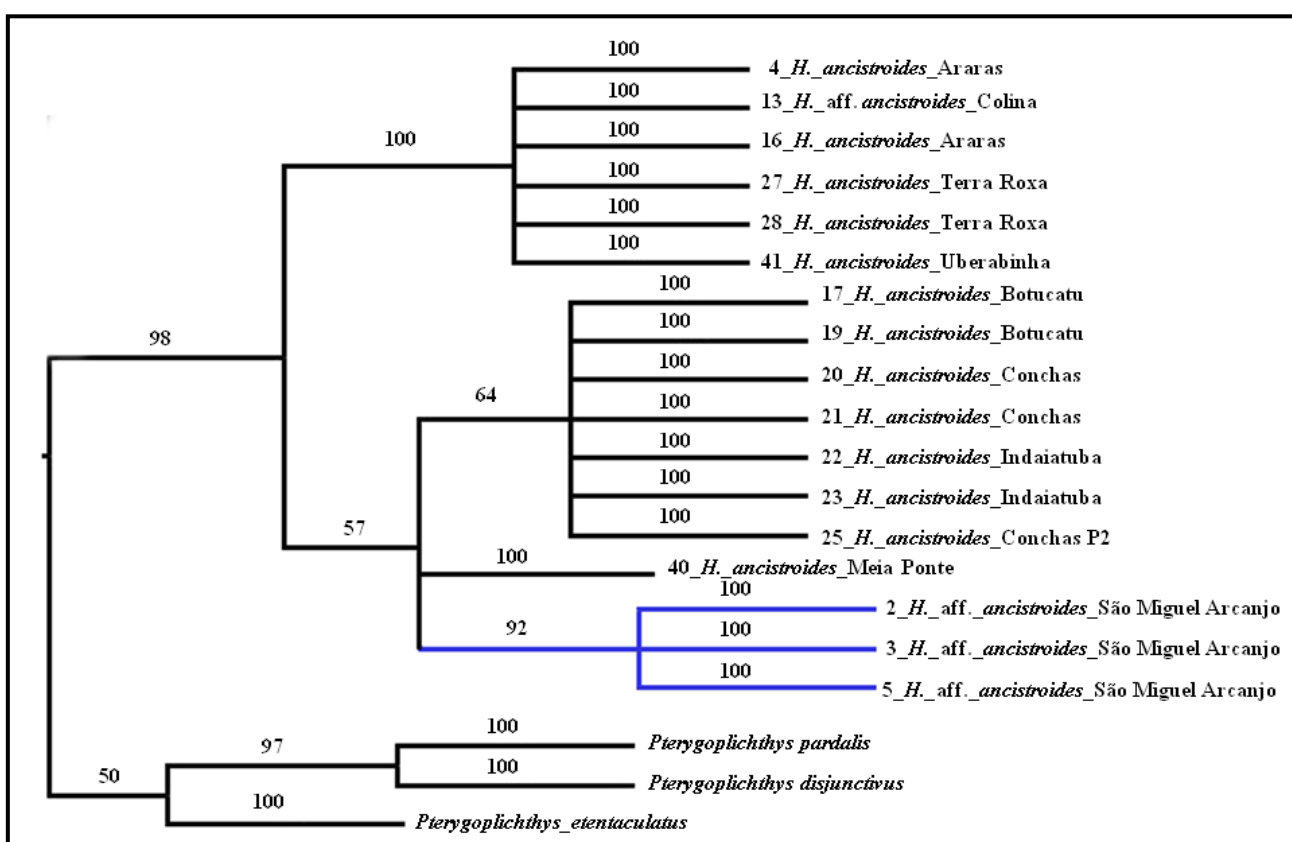


Figura 8: Árvore de Máxima Verossimilhança para *H. ancistroides* do Alto Paraná obtida com COI. Os números representam os valores de bootstrap encontrados.

Informações acerca da exata localização de rDNA 5S também são escassas, o que dificulta a identificação de padrões de distribuição destas sequências. Kavalco et al. (2004b) observaram sítios de DNAr 5S em oito cromossomos de *H. affinis* do rio Paraíba do Sul. Em Bueno et al. (2014), a maioria das espécies de *Hypostomus* com $2n = 68 - 72$ cromossomos apresentaram múltiplos sítios de rDNA 5S, exceto por *H.*

Até o momento não foram descritos sistema cromossômicos sexuais de *H. ancistroides*, a exceção de um possível XX/XY relatado por Michelle et al. (1977) que carece de reanálises para confirmação. O fato da espécie aqui analisada possuir sistema cromossômico sexual, número diploide diferente das outras populações e viver proximamente à área de distribuição de *H. ancistroides* é mais um fator que reforça a ideia da existência do complexo de espécies nesta região.

A grande maioria, se não totalidade dos surgimentos e evolução de sistemas cromossômicos sexuais simples envolvem o acúmulo de heterocromatina, podendo ocorrer o aumento ou diminuição do tamanho do cromossomo sexo-específico (Cioffi et al., 2012). Neste trabalho, o cromossomo X apresenta blocos heterocromáticos na porção terminal do braço longo, enquanto o cromossomo Y é totalmente eucromático (Figuras 5 e 7). Este padrão também foi encontrado para *Hoplias malabaricus* do Parque Florestal do Rio Doce, que possui sistema sexual XX/XY (Born e Bertollo, 2000).

Os dados disponíveis de bandamento C para *H. ancistroides* evidenciam um par de cromossomos acrocêntricos com blocos heterocromáticos na região terminal (Rubert et al., 2011; Maurutto et al., 2012; Pansonato-Alves et al., 2013; Traldi et al., 2013), sendo este par um possível representante da ancestralidade do cromossomo X presente na população analisada.

A diminuição do número diploide nesta população juntamente com a natureza eucromática do cromossomo Y (Figura 5B) podem revelar a presença de rearranjos cromossômicos no surgimento deste sistema sexual. Em uma população de *H. malabaricus* do Baixo Paranapanema com sistema sexual múltiplo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, foi demonstrado que os cromossomos Y são resultantes da fusão de X_1 e X_2 (Bertollo et al., 1997; Bertollo e Mestriner, 1998). Sendo assim, uma teoria para o surgimento do cromossomo Y na população de *H. aff. ancistroides* de São Miguel Arcaño seria a fusão de um par de cromossomos acrocêntricos eucromáticos do complemento de *H. ancistroides*. É evidente que são necessários mais estudos com técnicas refinadas para a compreensão do surgimento deste sistema sexual, possuindo como ponto inicial a presença de rearranjos cromossômicos.

Não é rara a ocorrência de sistemas cromossômicos sexuais em peixes. Isso pode acontecer em espécies de uma mesma família, como Erythrinidae (Bertollo et al., 1979, 1983) e Parodontidae (Moreira-Filho et al., 1993); em espécies de um mesmo gênero, como o caso de *Eigenmannia* (Almeida-Toledo et al., 1984; Sene, 2011); ou ainda em

indivíduos de uma mesma espécie, como *Hoplias malabaricus* (Bertollo et al., 1979; Born e Bertollo, 2000, 2006).

A subfamília Hypostominae também apresenta representantes com alguns sistemas sexuais. O tipo ZZ/ZW já foi relatado em *Hypostomus* sp. do rio Araguaia/MT (Artoni et al., 1998) e *H. cf. plecostomus* da bacia do rio Tapajós (Oliveira et al., 2015). Este sistema também é descrito para *Hemiancistrus spilomma* do Lago Quatro Bocas/MT (de Oliveira et al., 2006), para *Ancistrus dubius* do rio Paraguai/MT (Mariotto et al., 2004) e *Ancistrus taunayi* do Córrego Cascalho/SC (Konerat et al., 2015). Alves et al. (2006) descreve o sistema sexual XX/X0 em *Ancistrus* n. sp. 1 e Mariotto e Miyazawa (2006) relatam XX/XY para *Ancistrus cf. dubius*.

Já são conhecidos alguns exemplos de rDNA 18S em cromossomos sexuais de peixes, como mostrado nas Figuras 6 e 7. Born e Bertollo (2000) observaram a ocorrência de sistema cromossômico sexual XX/XY em *Hoplias malabaricus*, onde as fêmeas apresentam os dois cromossomos X subtlocêntricos marcados por sondas de rDNA 18S. Reed e Phillips (1997) relataram variação de número, tamanho e posição do locus de rDNA 18S no cromossomo sexual de *Salvelinus alpinus*. Howell e Black (1979) encontraram Ag-RONs nos cromossomos X e Y de *Fundulus diaphanus*. Apesar desta diversidade de sistemas sexuais e da variação na localização dos sítios de rDNA 18S em cromossomos sexuais, ainda não há descrição deste fato para a subfamília Hypostominae. Assim, o presente trabalho constitui o primeiro relato de sítios de rDNA 18S em cromossomos sexuais para o gênero *Hypostomus*.

Apesar da existência de várias politomias, *H. aff. ancistroides* constitui um grupo monofilético em ambas as árvores (Figuras 8 e 9), com altos valores de bootstrap. Esta é mais uma evidência da distância genética existente entre esta população e as demais populações de *H. ancistroides*, reforçando a ideia de ser uma nova espécie do complexo.

Com o aumento dos estudos citogenéticos na bacia do rio Paraná, que apresenta um grande número de espécies de *Hypostomus*, nota-se que há frequentes variações cariotípicas, principalmente entre populações de uma mesma espécie, com polimorfismos estruturais e/ou numéricos. Considerando então *Hypostomus* como um gênero derivado em Loricariidae e que está em intensa irradiação, esta região torna-se alvo de grandes estudos devido à diversidade de espécies existentes.

A redução do número diploide com conseqüente isolamento reprodutivo, a existência de um sistema cromossômico sexual e o monofiletismo apresentado por *H. aff. ancistroides* evidenciam que esta população de São Miguel Arcanjo é diferente de

todas as outras já descritas, não apenas como polimorfismos interpopulacionais, mas como um táxon diferente. Assim, sugere-se que seja uma provável nova espécie cuja descrição possui grande importância para estudos posteriores que busquem o entendimento da história evolutiva do complexo de espécies *H. aff. ancistroides*.

CAPÍTULO II

Análise cariotípica e evolução de quatro populações alopátricas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes, Loricariidae)

Dinaíza Abadia Rocha Reis, Karina de Oliveira Brandão, Lurdes Foresti de Almeida Toledo, Rubens Pazza, Karine Frehner Kavalco

RESUMO – Hypostominae é a subfamília que apresenta mais estudos cariotípicos e o gênero *Hypostomus* apresenta o maior número de espécies cariotipadas. O sistema de drenagens do Alto Paraná abriga o potencial complexo de espécies *Hypostomus ancistroides*. Seus representantes apresentam grande número de polimorfismos relacionados à fórmulas cariotípicas, forma do corpo e padrão de coloração. O objetivo deste estudo foi analisar quatro populações alopátricas de *H. ancistroides*, buscando entender os padrões cromossômicos encontrados e propor mecanismos de evolução para possíveis marcadores populacionais. Todos os exemplares das quatro populações apresentaram 68 cromossomos, sem diferença entre os sexos. Blocos de heterocromatina constitutiva foram observados em regiões pericentroméricas e terminais de vários cromossomos, com ocorrência de polimorfismos de tamanho. Foram observados 2-4 sítios de Ag-RONs em região terminal de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, correspondentes ao bandamento C. FISH com rDNA 5S evidenciou dois sítios terminais em todos os indivíduos. Entretanto, estes sítios exibem polimorfismo de localização, pois estão em cromossomos diferentes nas populações: metacêntricos em espécimes de Araras e Indaiatuba e acrocêntricos em indivíduos de Botucatu e Terra Roxa, evidenciando a ocorrência de uma inversão pericêntrica. Através da análise de FISH 5S é possível identificar que a dispersão foi o mecanismo de evolução em *H. ancistroides* e que o rDNA 5S pode ser um potencial marcador populacional. Todos estes fatores contribuem para a formação de complexos de espécies, como o caso de *H. ancistroides*.

Palavras-chave: Hypostominae, Polimorfismos cromossômicos, rDNA 5S

CHAPTER II

Karyotype analysis and evolution of four allopatric populations of species complex

***Hypostomus ancistroides* (Siluriformes, Loricariidae)**

Dinaíza Abadia Rocha Reis, Karina de Oliveira Brandão, Lurdes Foresti de Almeida

Toledo, Rubens Pazza, Karine Frehner Kavalco

ABSTRACT – A substantial number of karyotypic studies exists for Hypostominae, a subfamily of the *Hypostomus* genus that itself presents the highest number of karyotyped species. The Alto Paraná drainage system houses a complex body of *Hypostomus ancistroides* species, which exhibit a large number of polymorphisms related to karyotypic formulas, body shape, and staining pattern. The aim of this study was to analyze four allopatric populations of *H. ancistroides* and their corresponding chromosomal patterns and to decipher possible mechanisms of evolution for population markers. All specimens of the four populations had 68 chromosomes and there was no difference based on sex. Constitutive heterochromatin blocks were observed at pericentromeric regions and various chromosomal terminals, along with occurrence length polymorphisms. The blocks were observed at two, three, or four Ag-nucleolus organizer regions (NORs) on the terminal sites of metacentric and acrocentric chromosomes, corresponding to C-banding. Fluorescence in situ hybridization (FISH) carried out with rDNA 5S revealed two terminal sites in all specimens. However, these sites also exhibited polymorphism because they were found on different chromosomes depending on the population. In particular, metacentric sites were found in specimens from Araras and Indaiatuba while acrocentric sites were found for individuals from Botucatu and Terra Roxa, thus evidencing the occurrence of a pericentric inversion. Through 5S FISH analysis it was possible to identify dispersion as the mechanism of evolution for *H. Ancistroides*, and 5S rDNA was identified as a potential population marker. All these factors contributed to the development of complex species such as *H. ancistroides*.

Key-words: Chromosome polymorphisms, Hypostominae, rDNA 5S

INTRODUÇÃO

A família Loricariidae pertence à ordem Siluriformes e apresenta aproximadamente 919 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2016). Estes peixes conhecidos como cascudos estão distribuídos da Costa Rica à Argentina (Reis et al., 2003). Sua taxonomia ainda não é bem resolvida, mas são reconhecidas atualmente sete subfamílias (Lithogeneinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Delturinae e Otothyriinae) (Schaefer, 1987; Armbruster, 2004; Reis et al., 2006; Chiachio et al., 2008; Roxo et al., 2014).

A subfamília Hypostominae apresenta-se muito diversa e complexa, com 40 gêneros (Lujan et al., 2015), 464 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2016), grande variação na coloração e morfologia externa (Oyakawa et al., 2005; Zawadzki et al., 2008a). Em Loricariidae, Hypostominae é a subfamília mais estudada citogeneticamente com o gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) apresentando o maior número de espécies cariotipadas.

Estes peixes apresentam ampla distribuição geográfica, pouca vagilidade e alto desempenho adaptativo, o que favorece a formação de populações isoladas mesmo sem barreiras físicas, tornando-os úteis em estudos de citogenética molecular e identificação de espécies crípticas (Alves et al., 2005; Bickford et al., 2007).

A partição de uma população amplamente distribuída em populações separadas e isoladas por barreiras que limitam a dispersão dos indivíduos, impedirá que haja o fluxo gênico livre entre elas (De Queiroz, 1998). Este isolamento por si só não representa a formação de novas espécies, porém essas populações isoladas geograficamente estarão evoluindo independentemente e genes diferentes poderão ser fixados em cada uma delas (Mayr, 1942, 1963; Orr e Smith, 1998; Ritchie, 2007), podendo desta forma se diferenciar a nível de espécie. Como o processo de especiação demanda certo tempo evolutivo, a análise de populações alopátricas representa então um cenário ideal para observar as possíveis diferenças existentes nas populações.

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar quatro populações alopátricas de *H. ancistroides*, buscando entender os padrões cromossômicos encontrados e se possível, propor mecanismos de evolução para possíveis marcadores populacionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais de coleta e identificação do material

Foram realizados quatro pontos de coleta em locais pertencentes às bacias dos rios Tietê, Paranapanema e Grande, todos no estado de São Paulo. Os dados das coletas estão detalhados na Tabela 2 e Figura 9. As coordenadas dos pontos estão no Apêndice A.

Tabela 2. Total de indivíduos coletados em cada localidade.

Cidade próxima	Exemplares coletados		
	Machos	Fêmeas	Total
Araras	7	9	16
Botucatu	4	5	9
Indaiatuba	6	4	10
Terra Roxa	2	3	5
Total	19	21	40

Os indivíduos vivos foram levados ao laboratório para processamento, fixação e armazenamento apropriados. Em seguida, foram levados ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MUZUSP) para identificação, sendo todos reconhecidos como *H. ancistroides*. Atualmente, estes exemplares fazem parte da coleção ictiológica do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva (LaGEEvo) da Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba.

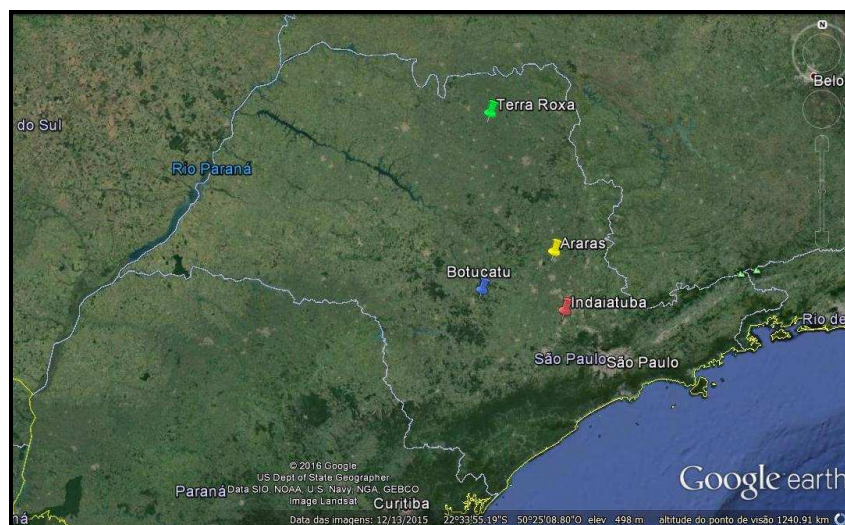


Figura 10: Pontos de coleta das populações de *H. ancistroides* analisadas.

Preparações cromossômicas e técnicas de bandamento

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada de acordo com Gold et al. (1990) a partir de suspensão celular do rim anterior dos exemplares. Além da coloração convencional com Giemsa, foram realizados bandamento C para detecção de heterocromatina constitutiva segundo Summer (1972) e detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) de acordo com Kavalco e Pazza (2004).

As análises dos materiais foram feitas em microscópio óptico e as imagens capturadas em microscópio OLIMPUS BX 41, utilizando câmera acoplada, com 3 MP de definição, pelo do software QCapture Pro 6.0, posteriormente editadas com o software GIMP 2.6.

A classificação dos cromossômicos agrupou tipos cromossômicos semelhantes para facilitar a identificação. Assim, os cromossomos foram classificados em metacêntricos/submetacêntricos (M/SM) e subtelocêntricos/acrocêntricos (ST/A).

Hibridação Fluorescente in situ (FISH)

A Hibridação Fluorescente in situ (FISH) foi realizada segundo os protocolos de Pinkel et al. (1986) e Hamkalo e Elgin (1991), modificados conforme Pazza et al. (2006), utilizando sondas de rDNA 5S obtidas a partir da amplificação desta sequência em exemplares de *H. ancistroides*. Os primers utilizados foram 5S A (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') e 5S B (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA-3') (Pendás et al., 1994).

As lâminas foram incubadas em 90 uL de RNase 0,4% em câmara úmida a 37°C durante uma hora. A desnaturação cromossômica foi realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por cinco minutos, seguido de choque térmico em etanol 70% gelado. Após desnaturação das sondas em banho fervente, foram adicionados 40 uL de solução de hibridação em cada lâmina e a preparação foi deixada em repouso overnight em câmara úmida a 37°C. Posteriormente às lavagens, a hibridação foi detectada com Cy3 e a montagem das lâminas foi realizada com antifade e 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

O material foi analisado em microscópio ótico acoplado com fonte de epifluorescência. As imagens foram capturadas com microscópio OLIMPUS BX 41, com câmera acoplada de 3 MP, utilizando o software QCapture Pro 6.0 e editadas com o software GIMP 2.6.

RESULTADOS

Todos os exemplares analisados apresentaram número diploide igual a 68 cromossomos e não ocorreram heteromorfismos relacionados ao sexo (Figura 11).

H. ancistroides de Araras apresentaram fórmula cariotípica 12M + 12SM + 16ST + 28A (Fig 11A). Marcações pericentroméricas conspícuas de heterocromatina foram observadas nos pares 2 e 7, e marcações terminais nos pares 4, 18, 27 e 33 (Figuras 12A e 14). Destaque para o polimorfismo de tamanho ocorrente entre os cromossomos do par 27. Foram observados 2 a 4 sítios de Ag-RONs (Figura 14A), na região terminal dos cromossomos dos pares 21 e 27, este último coincidente com o bandamento C. A FISH identificou dois sítios de rDNA 5S presentes na região terminal do braço curto dos cromossomos do par 6 (Figuras 13A e 14A).

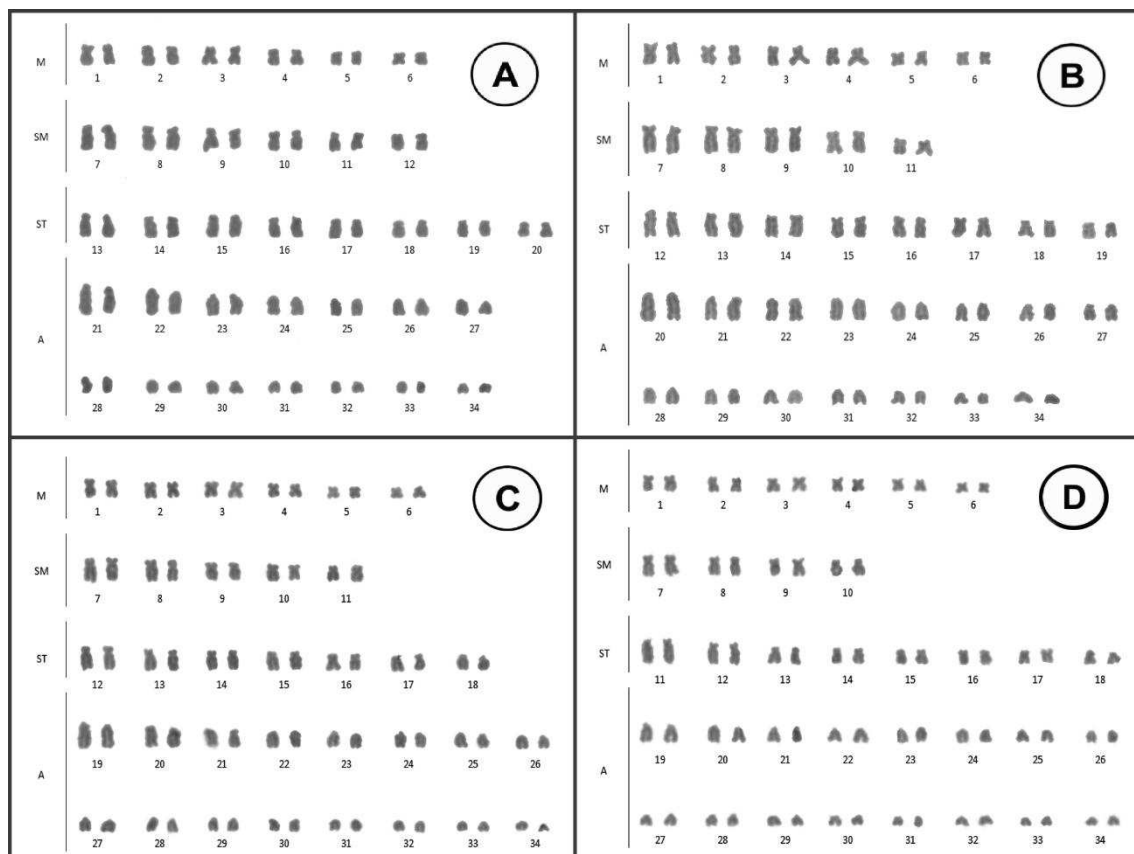


Figura 11: Cariótipos encontrados para as populações de *H. ancistroides*. A: Araras, B: Botucatu, C: Indaiatuba, D: Terra Roxa.

H. ancistroides de Botucatu apresentaram mesma fórmula cariotípica 12M + 10SM + 16ST + 30A (Figura 11B). A heterocromatina constitutiva evidenciou blocos em região pericentromérica do par 4, em região terminal dos pares 7 e 27 e no braço

curto do par 20 (Figuras 12B e 14B). RONS foram observadas no braço longo dos cromossomos do par 3 e nos cromossomos do par 27, ambas em região terminal e esta última, coincidente com o bandamento C, evidenciando 4 sítios (Figura 14B). FISH com rDNA 5S apresentou sítios nos cromossomos do par 31, em região terminal (Figuras 13B e 14B).

H. ancistroides de Indaiatuba apresentaram fórmula cariotípica 12M + 10SM + 14ST + 32A (Figura 11C). O bandamento C evidenciou marcações conspícuas nos pares 1, 4 e 10 em região pericentromérica e nos pares 7, 13 e 25 em região terminal (Figuras 12C e 14C). Foram encontrados 2 a 4 sítios de Ag-RONS, presentes na região terminal dos cromossomos do par 32 e no braço curto dos cromossomos do par 7, estes coincidentes com a banda C (Figura 14C). FISH evidenciou também dois sítios de rDNA 5S, presentes no braço curto dos cromossomos do par 3 (Figuras 13C e 14C).

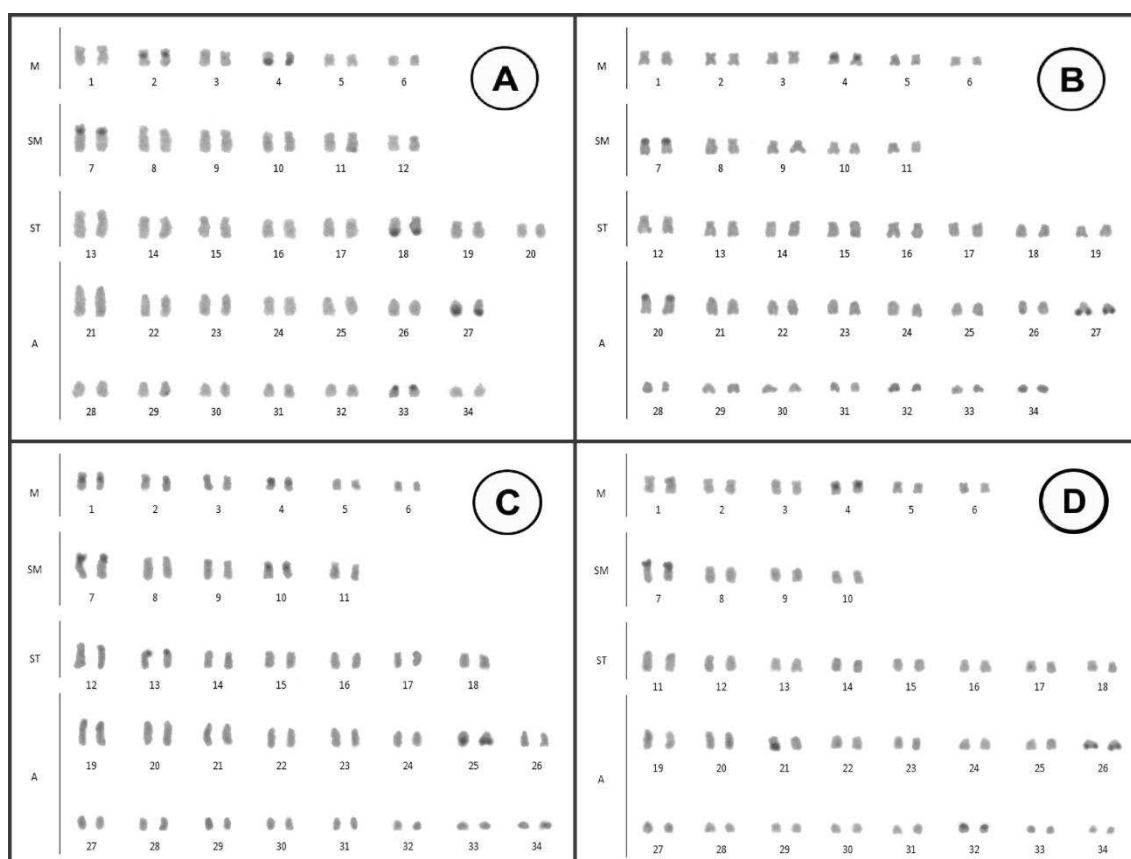


Figura 12: Distribuição da heterocromatina constitutiva. A: Araras, B: Botucatu, C: Indaiatuba, D: Terra Roxa.

H. ancistroides de Terra Roxa apresentaram fórmula cariotípica 12M + 8SM + 16ST + 32A (Figura 11D). Blocos de heterocromatina constitutiva estavam presentes na

região pericentromérica do par 4 e em região terminal dos pares 7, 27 e 32. Além disso, um grande bloco estava presente no braço longo de apenas um homólogo do par 21 (Figuras 12D e 14D). Também foram observados 2 a 4 sítios de Ag-RONs nesta população, representados por marcações no braço curto dos cromossomos do par 13 e em um dos homólogos do par 18, todos em região terminal (Figura 14D). Sítios de rDNA 5S foram evidenciados em região terminal dos cromossomos do par 27 (Figuras 13D e 14D).

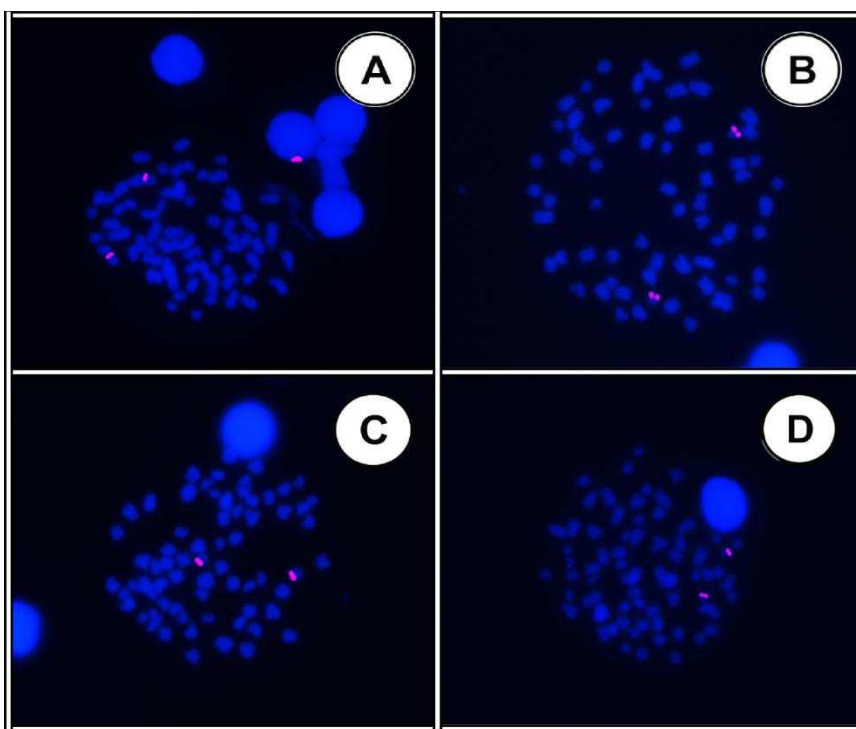


Figura 13: FISH com sonda de rDNA 5S. A: Araras, B: Botucatu, C: Indaiatuba; D: Terra Roxa.

DISCUSSÃO

Britski (1972) relata que *Hypostomus* é o gênero de cascudos dominantes no Brasil, ocorrendo em grande variedade de ecossistemas de água doce (Oyakawa et al., 2005). Apesar de ser o gênero mais estudado do ponto de vista citogenético, a grande diversidade deste grupo ainda permanece quase inexplorada (Rubert et al., 2011). Exibem grande variação cariotípica, com espécies apresentando desde 52 (*H. emarginatus* – Artoni e Bertollo, 2001) até 84 cromossomos (*Hypostomus* sp. 2 – Cereali et al., 2008). Artoni e Bertollo (1996) consideram este grupo como não conservado acerca da macroestrutura cariotípica.

A ampla distribuição de *Hypostomus* associada à grande diversidade encontrada favorece o aparecimento de morfotipos diferentes em bacias diferentes, caracterizando um complexo de espécies. Este é o caso de *H. ancistroides* que possivelmente tem uma complexa história evolutiva na bacia do Alto rio Paraná.

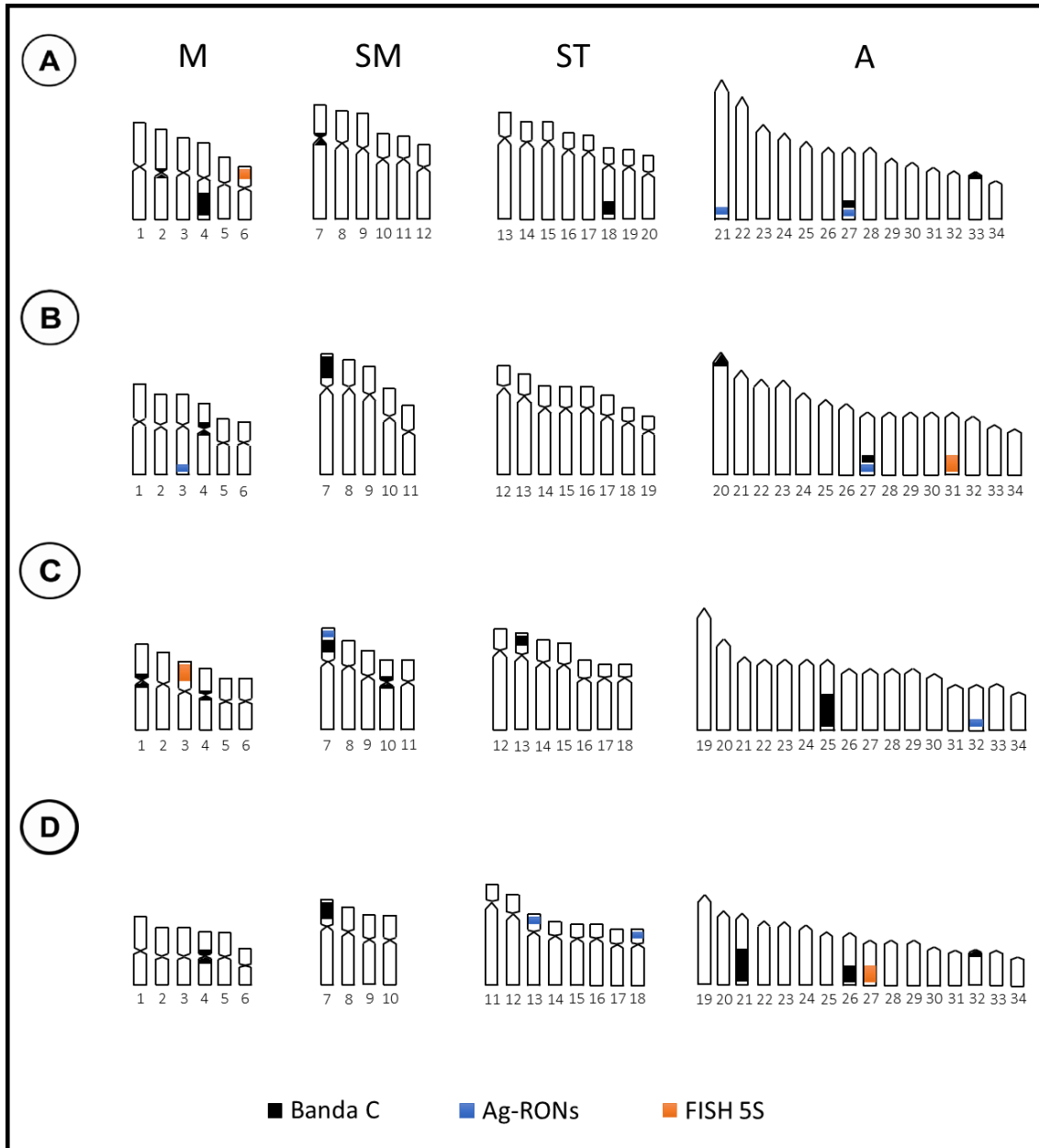


Figura 14: Ideogramas das populações de *H. ancistroides* analisadas. A: Araras, B: Botucatu, C: Indaiatuba, D: Terra Roxa.

Exceto por Maurutto et al. (2012) e os dados descritos no Capítulo I, todo o restante das populações de *H. ancistroides* apresentam $2n = 68$ cromossomos (Artoni e

Bertollo, 1996; Alves et al., 2006; Bueno et al., 2012; Rubert et al., 2011; Endo et al., 2012; Alves et al., 2012; Maurutto et al., 2012; Pansonato-Alves et al., 2013; Traldi et al., 2013), assim como as quatro populações aqui descritas (Figura 11). Diferenças nas fórmulas cariotípicas, apesar de existirem, foram muito sutis. Isso pode ser explicado devido à presença de rearranjos Robertsonianos, como fissões cêntricas e inversões pericêntricas, que desempenham papel importante na evolução de Hypostominae (Artoni e Bertollo, 2001). A fixação destes rearranjos nas populações é facilitada pelo habitat destes animais, pois como são organismos não-migratórios, formam populações isoladas que estão mais propícias à endogamia (Almeida-Toledo et al., 2000).

Variações em *Hypostomus* não estão restritas apenas à fórmulas cariotípicas, ocorrem também em número e localização de sítios de RONS e padrões de heterocromatina observados.

Regiões organizadoras de nucléolo simples e em posição terminal são consideradas um caráter basal em Loricariidae (Artoni e Bertollo, 1996; Oliveira e Gosztonyi, 2000). Entretanto, o fenótipo mais observado em *Hypostomus* é a presença de RONS múltiplas (Artoni e Bertollo 2001; Kavalco et al., 2005; Alves et al., 2006; Martinez et al., 2011; Rubert et al., 2011; presente estudo – Figura 13), sugerindo que *Hypostomus* seja um grupo derivado dentro da família. Outra característica conservada neste gênero é a presença de RONS terminais (Artoni e Bertollo 1996; Artoni e Bertollo 2001; Kavalco et al., 2005; Alves et al., 2006; Cereali et al., 2008; Martinez et al., 2011; Rubert et al., 2011, Endo et al., 2012; Traldi et al., 2013, entre outros), corroborada pelos resultados deste trabalho (Figuras 13 e 14).

Não foram encontradas metáfases que mostravam ao mesmo tempo os dois pares de cromossomos com Ag-RONS nas populações de Araras e Botucatu. Este polimorfismo está relacionado com a atividade do cístron, que pode estar ativo ou não, dependendo das pressões seletivas do ambiente ou apenas por acaso.

Os blocos de heterocromatina constitutiva estavam presentes em regiões pericentroméricas e terminais dos cromossomos (Figura 12), assim como também descrito para *H. ancistroides* por Artoni e Bertollo (1996), Rubert et al. (2011), Traldi et al. (2013), tornando-se um padrão comum nesta espécie. A correspondência de sítios ribossomais com blocos de heterocromatina constitutiva é comum em peixes Neotropicais (Traldi et al., 2013), pois tais sequências estão adjacentes ou intercaladas entre si, o que facilita a dispersão de RONS pelo genoma (Moreira-Filho et al., 1984; Vicari et al., 2008).

H. ancistroides de Terra Roxa apresentaram polimorfismos relacionados à distribuição de heterocromatina. A ausência de blocos em um dos homólogos (Figura 12D), revelam a ocorrência de trocas desiguais durante o período de divisão celular, onde uma parte ou o bloco inteiro de heterocromatina foi translocado para outro cromossomo.

A presença de um par de sítios de rDNA 18S e rDNA 5S é considerada plesiomórfica para Loricariidae, dado que esta característica está presente no grupo externo (Trichomycteridae) e em alguns gêneros considerados basais por análise morfológica: Neoplecostomus, Kronichthys, Isbrueckerichthys e Parotocinclus (Armbruster, 2004; Ziemniczak et al., 2012). Artoni e Bertollo (1996) consideram RONS simples como basal em Loricariidae e Bueno et al. (2014) acreditam que este fenótipo seja basal em Hypostomus, pois também aparecem nas tribos Pterygoplichthini e Ancistrini, pertencentes à Hypostominae.

Os exemplares analisados seguiram esta tendência, pois todos apresentaram dois sítios de rDNA 5S, entretanto, estes sítios exibem polimorfismo de posição. Em exemplares de Araras e Indaiatuba, os sítios estão localizados no braço curto de cromossomos metacêntricos (Figuras 13 e 14), enquanto que em indivíduos de Botucatu e Terra Roxa, os sítios estão localizados no braço longo de cromossomos acrocêntricos (Figuras 13 e 14). Esta variação entre número e/ou localização de rDNA em indivíduos de uma mesma espécie sugere a existência de mecanismos para dispersão destas sequências (Bueno et al., 2014). Neste caso, ocorreu inversão pericêntrica, pois houve mudança do tipo cromossômico.

A existência destes dois fenótipos de rDNA 5S nas bacias dos rios Tietê e Grande pode ser explicada por dispersão da espécie. Uma metapopulação ancestral apresentava os dois fenótipos observados, que surgiram por inversão pericêntrica. Com o aumento do nível dos rios em eras interglaciais, esta metapopulação conseguiu dispersar-se pela região entre as bacias, formando populações isoladas em cabeceiras de rios após a diminuição das águas. Foi observado apenas um fenótipo de rDNA 5S em cada população, sendo consequência de efeito fundador ou talvez pressão seletiva. Porém, são observados os dois fenótipos em pontos de coleta próximos, sem correspondência de fenótipo e geografia. Isso evidencia evolução por dispersão, que é corroborada pelas árvores filogenéticas apresentadas para a espécie deste trabalho (Figuras 8 e 9 – Capítulo 1), além de demonstrar que o rDNA 5S pode ser um potencial marcador populacional.

CAPÍTULO III

Filogeografia de espécies do gênero *Hypostomus*: padrões na variação cariotípica e molecular

Dinaíza Abadia Rocha Reis, Karina de Oliveria Brandão, Lurdes Foresti de Almeida Toledo, Mónica Sonia Rodriguez, Rubens Pazza, Karine Frehner Kavalco

RESUMO – A tribo Hypostomini é composta apenas pelo gênero *Hypostomus* e a possibilidade deste este gênero ser composto por alguns grupos monofiléticos por apresentar é sugerida pela presença de variação morfológica significativa e diversos números diploides e fórmulas cariotípicas. O objetivo deste trabalho foi traçar a filogeografia de espécies de *Hypostomus* e analisar a diversidade genética de algumas populações de *Hypostomus* ancistroides, com posterior identificação da relação existente entre variações cromossômicas e moleculares presentes neste grupo. Rede de haplótipos foi construída para espécimes de *H. ancistroides*, utilizando o método Median Joining. Árvores filogenéticas foram inferidas utilizando Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana. A análise de rede mostrou 18 haplótipos e a formação de dois haplogrupos: um composto por haplótipos da bacia do rio Paranaíba e outro composto por haplótipos de todas as outras bacias estudadas, Tietê, Paranapanema e Grande. Os resultados das árvores filogenéticas aliados aos dados cromossômicos disponíveis para o gênero evidenciaram a formação de três haplogrupos pela Análise Bayesiana. O haplogrupo 1 foi formado por *H. ancistroides* pertencentes às bacias dos rios Tietê e Paranapanema e praticamente todos os indivíduos apresentam 68 cromossomos. O haplogrupo 2 foi formado por diversas espécies provenientes dos rios Paranaíba e Grande e todos possuem 72, 74 ou 76 cromossomos, a depender da espécie. O haplogrupo 3 foi formado apenas por *H. faveolus* com $2n = 64$. A presença de altos números diploides, grande número de cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos em relação ao complemento e RONS múltiplas sugerem que *Hypostomus* seja um gênero derivado em Loricariidae. As análises filogenéticas realizadas conseguiram validar as simplesiomorfias cromossômicas encontradas entre as espécies. Os dados apresentados reforçam a existência de pelo menos dois grupos dentro do gênero *Hypostomus*, formados através de dados morfológicos, cariotípicos e moleculares.

Palavras-chave: Bayesiana, Máxima Verossimilhança, Rede de haplótipos.

CHAPTER III

Phylogeography of species of the genus *Hypostomus*: standards in the karyotype and molecular variation

Dinaíza Abadia Rocha Reis, Karina de Oliveira Brandão, Lurdes Foresti de Almeida Toledo, Mónica Sonia Rodriguez, Rubens Pazza, Karine Frehner Kavalco

ABSTRACT – The Hypostomini tribe is composed of the genus *Hypostomus*, and the possibility that this genus consists of some monophyletic groups is suggested from the presence of significant morphological variation and several diploid numbers and karyotypes formulas. The objective of this work was to trace the phylogeography of various *Hypostomus* species and analyze the genetic diversity of several populations of *Hypostomus ancistroides*, with subsequent identification of the relationship between chromosomal and molecular variations present in this group. Phylogenetic trees for all species were inferred using Maximum Likelihood and Bayesian analysis, while a haplotype network was built for the species *H. ancistroides* using the Median Joining method. Network analysis revealed 18 haplotypes and the formation of two haplogroups for *H. ancistroides*, the first deriving from the Paranaíba river basin and the second from all other basins investigated, namely Tietê, Paranapanema and Grande. Phylogenetic trees combined with the available gendered chromosomal data showed the formation of three haplogroups by Bayesian analysis for all species considered. Here, the first group was formed by *H. ancistroides* belonging to the the Tietê and Paranapanema river basins, and virtually all individuals exhibited 68 chromosomes. The second group was formed by various species from the Paranaíba and Grande rivers, which exhibited 72, 74, or 76 chromosomes. The third haplogroup was formed only by *H. faveolus* with 64 chromosomes. The presence of high diploid numbers as well as a large number of subtelocentric and acrocentric chromosomes relative to complement and multiple nucleolus organizer regions (NORs) suggested that *Hypostomus* derives from the family Loricariidae. Phylogenetic analyses also confirmed chromosomal symplesiomorphy between *Hypostomus* species, while morphological, molecular, and karyotypic data supported the existence of at least two groups within the genus *Hypostomus*.

Key-words: Bayesian, Haplotype network, Maximum Likelihood.

INTRODUÇÃO

A subfamília Hypostominae compreende 40 gêneros (Lujan et al., 2015) e 464 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2016), e grande variação na coloração e morfologia externa (Oyakawa et al., 2005; Zawadzki et al., 2008a). Armbruster (2004) dividiu esta subfamília em cinco tribos: Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Ancistrini e Pterygoplichthini. A tribo Hypostomini possui o maior número de estudos citogenéticos, sendo composta apenas pelo gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Reis et al., 2003).

A possibilidade deste gênero ser composto por alguns grupos monofiléticos foi sugerida com base na grande variação morfológica existente (Muller e Weber, 1992; Montoya-Burgos, 2003; Armbruster, 2004; Zawadzki et al., 2004; Alves et al., 2006) aliada à identificação de diversos números diploides e fórmulas cariotípicas (Artoni e Bertollo, 1996; Alves et al., 2006).

Hypostomus ancistroides Ihering (1911) apresenta polimorfismos de fórmula cariotípica, forma do corpo e coloração (Endo et al., 2012). Sua ocorrência em diversas bacias do Alto rio Paraná com diferentes morfotipos sugere que represente um complexo de espécies e que nesta região exista uma complexa história evolutiva para o grupo.

Estes peixes apresentam ampla distribuição geográfica, comportamento não-migratório e alto desempenho adaptativo, favorecendo a formação de populações isoladas sem a necessidade de barreiras físicas (Alves et al., 2005; Bickford et al., 2007). Desta forma, estudos de populações de *Hypostomus* integrando ferramentas citogenéticas e moleculares podem fornecer informações valiosas sobre filogeografia e processos microevolutivos.

O objetivo deste trabalho foi traçar as relações filogenéticas e evolutivas de algumas espécies de *Hypostomus* e analisar a diversidade genética de algumas populações de *H. ancistroides*, com posterior identificação da relação existente entre variações cromossômicas e moleculares presentes neste grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de *Hypostomus* foram coletados na bacia do rio Paranaíba, Grande, Tietê e Paranapanema, totalizando 61 indivíduos pertencentes às espécies *H. faveolus*, *H. ancistroides*, *H. cf. tietensis*, *H. paulinus*, *H. regani*, *H. strigaticeps*, *H. margaritifer*, *Hypostomus* sp. e *Hypostomus* sp. 2 (Apêndice A). No Apêndice B são apresentados os dados citogenéticos disponíveis para estas espécies.

Amostras de tecidos de fígado e coração dos exemplares foram utilizadas para obtenção do DNA genômico. As extrações foram realizadas com kit apropriado, seguindo protocolo do fabricante.

Foram amplificadas sequências de dois genes mitocondriais, Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e Citocromo b (Cyt b), e dois genes nucleares, RAG 1 e RAG 2. Os primers utilizados para COI foram Fish F1 (5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGC-3') e Fish R1 (5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGA-3'). Para Cyt b foram utilizados CytbFc e CytbFc; para RAG 1, RAG1Fa e RAG1R1186; e para RAG 2, RAG2Fc e RAG2R196, como descrito em Lujan et al. (2015).

A PCR foi conduzida com ciclos de 95°C por 2 min, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 s, X°C por 30 s (a depender dos pares de primers), 72°C por 1 min, como extensão final de 72°C por 10 min. Após o término da reação foi realizada checagem dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel de agarose 1%, e caso fossem positivos, foram enviados para sequenciamento realizado por empresa terceirizada.

As sequências obtidas foram editadas através do programa Chromas Lite v2.01, verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do programa "Blastn", e alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW v1.6 (Thompson et al., 1994) pelo software MEGA v6 (Tamura et al., 2013).

Rede de haplótipos para populações de *H. ancistroides* foi inferida com o mtDNA COI utilizando o método Median Joining (MJ) como implementado em Network 4.5.0.2 (Fluxus Technology Ltd). Foi realizado Teste D de Tajima (Tajima, 1989) para testar a neutralidade da evolução do mtDNA COI.

Análises de Máxima Verossimilhança (MV) foram conduzidas com o software PAUP 4.0, e a escolha do melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi estimada usando Akaike Information Criterion (AIC) como implementado Modeltest 2.3 (Nylander, 2004).

Análise Bayesiana (AB) foi conduzida usando Beast v1.8.2 (Drummond et al., 2012) com modelo HKY. Após a corrida de 50 milhões de MCMC, o comprimento da cadeia de amostragem a cada mil gerações foi avaliado com Tracer v.1.6 para verificar o tamanho efetivo da amostra (ESS) e a convergência da cadeia. Com o software Tree Annotator v.1.8 descartou-se as 25% primeiras árvores como burn-in. A observação de ambas as árvores obtidas (MV e AB) foram realizadas em FigTree v.1.4.2.

RESULTADOS

21 sequências de *H. ancistroides* foram encontradas, com 623 pb e 18 haplótipos. A rede de haplótipos (Figura 14) mostrou um grande número de passos mutacionais entre os haplótipos. Três haplótipos, H1, H4 e H5, foram os mais comuns, todos compostos por dois espécimes e o restante dos haplótipos constituíram singletons. H1 e H5 foram formados por indivíduos do Alto Paranapanema, dois de São Miguel Arcaño e dois de Botucatu, respectivamente. H4 apresentou espécimes do Grande e Tietê, um de Colina e um de Araras. O maior número de passos mutacionais observados ocorreu entre haplótipos da bacia do rio Paranaíba e o restante da rede, evidenciando a existência de dois haplogrupos. Apesar disso, dois haplótipos desta bacia (H13 e H14) ficaram distantes deste grupo. Detalhe para H14 que além de distante, surge a partir de H4.

O teste de neutralidade revelou D negativo (D: -1,85669) e significativo ($p < 0,05$), o que indica a ocorrência de um excesso de polimorfismos de baixa frequência, dado comprovado pelo grande número de singletons existentes na rede de haplótipos.

Árvores obtidas pelos genes Cyt b, RAG 1 e RAG 2 apresentam muitas politomias e ausência de formação de grupos (dados não apresentados), não sendo informativas para a filogeografia do gênero *Hypostomus*.

Entretanto, as árvores filogenéticas obtidas pela COI com os métodos MV e AB evidenciaram a presença de duas linhagens em *Hypostomus* (Figura 15 e 16, respectivamente). A primeira linhagem (nomeada por haplogrupo 1) é composta por *H. ancistroides* oriundos praticamente apenas das bacias dos rios Tietê e Paranapanema, acrescidos de *H. cf. tietensis* da bacia do rio Paranaíba. A segunda linhagem (haplogrupo 2) é composta por espécies provenientes das bacias dos rios Paranaíba e Grande. A análise bayesiana ainda evidencia uma terceira linhagem (haplogrupo 3) composta apenas por *H. faveolus* (Figura 16).

DISCUSSÃO

Pela Teoria do Coalescente haplótipos que localizam-se no centro da rede são considerados ancestrais, enquanto que haplótipos nas extremidades indicam origem mais recente (Posada e Crandall, 2001). Diante disso, H5 então seria o haplótipo mais ancestral, considerado centro de diversidade da espécie (Figura 14). O grande número de passos mutacionais na rede separa dois haplogrupos: A – formado apenas por haplótipos da bacia do rio Paranaíba; e B – formado por todos os outros haplótipos. Entretanto, há ocorrência de haplótipos da bacia do rio Paranaíba juntamente ao restante da rede (H13 e H14). Essa condição pode ser apenas uma convergência de sequências, ocasionada por homoplasia, porém pode se tratar de algo mais complexo. Como H5 é o centro de diversidade, a partir dele pode ter ocorrido a dispersão dos haplótipos para outras regiões. Na bacia do rio Paranaíba, este haplótipo pode ter acumulado mudanças e originado outros, sem que ele desaparecesse. Assim, H13 e H14 podem compartilhar mais semelhanças com o haplótipo ancestral do que os outros haplótipos da bacia a que pertencem, agrupando-se próximo ao haplótipo ancestral.

A relação existente entre H7 e H9 formou um círculo na rede de haplótipos (Figura 14). A formação deste círculo indica eventos de homoplasia, similaridades nas sequências que não são resultado de ancestralidade. Elas aparecem por convergência paralela ou por mutações reversas (Posada e Crandall, 2001).

Mesmo dentro de um haplogrupo, a maioria dos haplótipos está separada por muitos passos mutacionais. Isso pode estar relacionado ao modo de habitat destes animais, pois peixes não migratórios formam populações isoladas que facilitam a fixação de mudanças pela endogamia (Almeida-Toledo et al., 2000). Assim, mesmo habitando a mesma bacia hidrográfica, podem acumular muitas mutações nas sequências e se diferenciarem.

A ocorrência de grande número de polimorfismos de baixa frequência – singletons – na rede de haplótipos (Figura 14) pode ser interpretada como uma expansão populacional (Simonsen et al., 1995). O aumento da população juntamente com o aumento da área de distribuição possibilita o aparecimento de novas mutações que possuem baixa frequência. Isso explica porque cerca de 80% dos haplótipos (15 em 18) estão representados apenas por um indivíduo. Uma alternativa para este cenário é a presença de seleção purificadora, que não permite a presença de novos polimorfismos, ou seja, mutações raras só são observadas em sítios silenciosos (Simonsen et al., 1995).

O gênero *Hypostomus* apresenta grande diversidade cariotípica, com números diploides variando de 52 em *H. emarginatus* (Artoni e Bertollo, 2001) a 84 cromossomos em *Hypostomus* sp. 2 (Cereali et al., 2008).

Apesar de não ser considerado um grupo conservado (Artoni e Bertollo, 1996), as árvores filogenéticas obtidas neste trabalho (Figura 15 e 16), principalmente por análise Bayesiana (Figura 16), demonstram a formação de grupos que podem ser associados com dados citogenéticos.

Pela análise Bayesiana, o haplogrupo 1 é formado por exemplares de *H. ancistroides* pertencentes às bacias dos rios Tietê e Paranapanema e todos os indivíduos apresentam 68 cromossomos (Artoni e Bertollo, 1996; Alves et al., 2006; Bueno et al., 2012; Rubert et al., 2011; Endo et al., 2012; Maurutto et al., 2012; Alves et al., 2012; Pansonato-Alves et al., 2013; Traldi et al., 2013), exceto a população de São Miguel Arcanjo que apresenta 66, como demonstrado no Capítulo I. Três indivíduos da bacia do rio Paranaíba ainda fazem parte deste grupo (2 exemplares de *H. ancistroides* e 1 indivíduo de *H. cf. tietensis*), reafirmando a tendência dos agrupamentos por número cromossômico, pois todos apresentam 68 cromossomos. O haplogrupo 2 é formado por diversas espécies provenientes dos rios Paranaíba e Grande e todos possuem 72, 74 ou 76 cromossomos, a depender da espécie. Um exemplar de *H. ancistroides* do rio Paranaíba faz parte deste haplogrupo, e apesar de não existir dados citogenéticos confirmando seu número diploide acima de 70 cromossomos, pode-se sugerir equívoco na identificação devido ao ramo que pertence. O haplogrupo 3 formado apenas por *H. faveolus* reforça a separação deste ramo do restante, visto que descrições para *H. faveolus* demonstram $2n = 64$ cromossomos (Bueno et al., 2013).

Em *Hypostomini*, Muller e Weber (1992) sugerem a divisão de *Hypostomus* em dois grupos com base em morfologia e coloração do corpo: um grupo chamado *plecostomus* e outro grupo chamado *regani*. Os dados apresentados pelas árvores filogenéticas (Figuras 15 e 16) confirmam a existência de pelo menos dois grandes grupos dentro de *Hypostomus* (Haplogrupos 1 e 2), validando as simplesiomorfias cromossômicas encontradas nas espécies.

H. faveolus constitui o haplogrupo 3 (Fig. 16) na análise Bayesiana, porém, são necessárias mais sequências desta espécie e mais amostragens ao longo da bacia para caracterizar esta espécie como pertencente a um grupo distinto dos demais.

Apesar da formação de grupos, as árvores ainda apresentam muitas relações não resolvidas dentro destes grupos. As árvores obtidas por Cyt b, RAG 1 e RAG 2

evidenciaram ainda mais estas relações não resolvidas, portanto foram consideradas não informativas para o gênero. Isto pode ter ocorrido pelas taxas de mutação dos genes utilizados. As árvores de RAG 1 e RAG 2 apresentaram o maior número de politomias, devido ao fato que genes nucleares apresentam baixa taxa de evolução quando comparados com genes mitocondriais (Avice et al., 1987). Apesar de ser mitocondrial, Cyt b é mais conservado, sendo utilizado na maioria das vezes em estudos de táxons acima do nível de espécies (Pereira, 2000). Sendo assim, COI foi o melhor gene utilizado para resgatar as relações filogenéticas existentes entre as espécies.

Em Loricariidae, 54 cromossomos são considerados condição basal (Artoni e Bertollo, 2001), relatados também em espécies de Hypoptopomatinae (Andreatta et al., 1993, 1994), Loricariinae (Scavone e Julio Jr., 1995), e no grupo externo Trichomycteridae (Lima e Galetti Jr., 1990). Em Hypostominae, Rhinelepini (Artoni e Bertollo 2001) e Corymbophanini (Alves et al., 2005) apresentam espécies com 54 cromossomos; Pterygoplichthyini e Ancistrini, consideradas irmãs (Armbruster, 2004), apresentam $2n = 52$ cromossomos (Artoni e Bertollo, 1996; 2001). A redução do número diploide pode ter ocorrido por fusões cêntricas, pois a maioria dos cromossomos das espécies destas tribos são do tipo metacêntricos/submetacêntricos (Alves et al., 2006).

Montoya-Burgos (2003) identificou com dados moleculares uma relação mais próxima de *H. emarginatus* com outros Hypostominae do que com *Hypostomus*, e por possuir baixo número diploide (comumente encontrado em outras tribos de Hypostominae), é provável que esta espécie não pertença a Hypostomini (Alves et al., 2006). Caso *H. emarginatus* não pertença de fato à tribo Hypostomini, *H. plecostomus* apresentaria o menor diploide, com $2n = 54$ cromossomos (Muramoto et al., 1968).

Artoni e Bertollo (1996) sugerem que rearranjos Robertsonianos, como fissões cêntricas e inversões pericêntricas desempenham papel importante na evolução dos Hypostominae. Ainda segundo estes autores, há uma relação inversa entre o aumento do número diploide e a proporção de cromossomos com dois braços. Essa tendência é confirmada nas espécies presentes neste trabalho, onde ocorreu aumento de cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos com o aumento do número diploide (Apêndice B).

Quanto ao fenótipo de Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs), sítios simples e em posição terminal são plesiomórficas em Loricariidae (Artoni e Bertollo, 1996; Oliveira e Gosztonyi, 2000). Quanto à posição, RONs terminais são consideradas

conservadas no gênero *Hypostomus*, contando com diversas descrições (Artoni e Bertollo 1996; Artoni e Bertollo 2001; Kavalco et al., 2005; Alves et al., 2006; Cereali et al., 2008; Martinez et al., 2011; Rubert et al., 2011, Endo et al., 2012; Traldi et al., 2013). Em relação ao número de sítios, são observados em *Hypostomus* RONS simples (Endo et al., 2012; Pansonato-Alves et al., 2013) e múltiplas, embora este último fenótipo seja mais observado no gênero (Artoni e Bertollo 2001; Kavalco et al., 2005; Alves et al., 2006; Martinez et al., 2011; Rubert et al., 2011; Alves et al., 2012; Bueno et al., 2013; entre outros).

A presença de altos números diploides, grande número de cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos em relação ao complemento e RONS múltiplas sugerem então que *Hypostomus* seja um gênero derivado em Loricariidae. Os dados apresentados reforçam a existência de pelo menos dois grupos dentro do gênero *Hypostomus*, formados através de dados morfológicos, cariotípicos e moleculares.

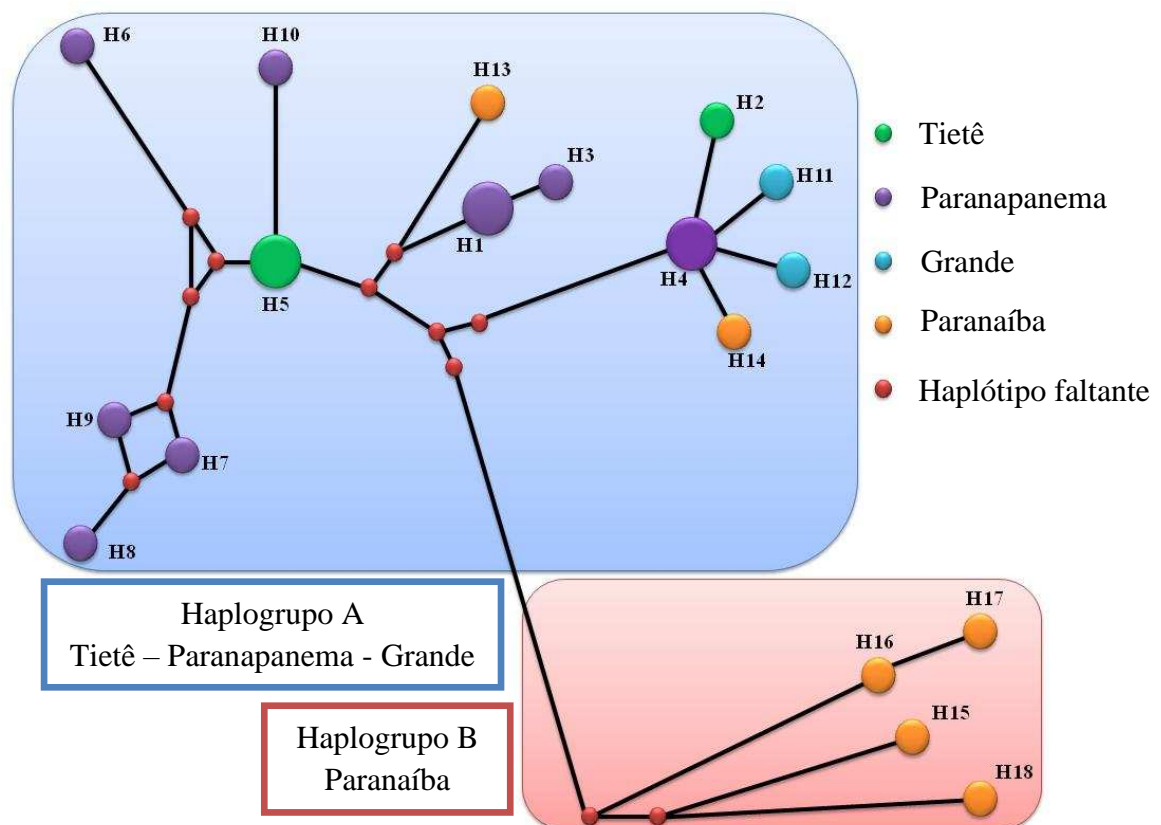
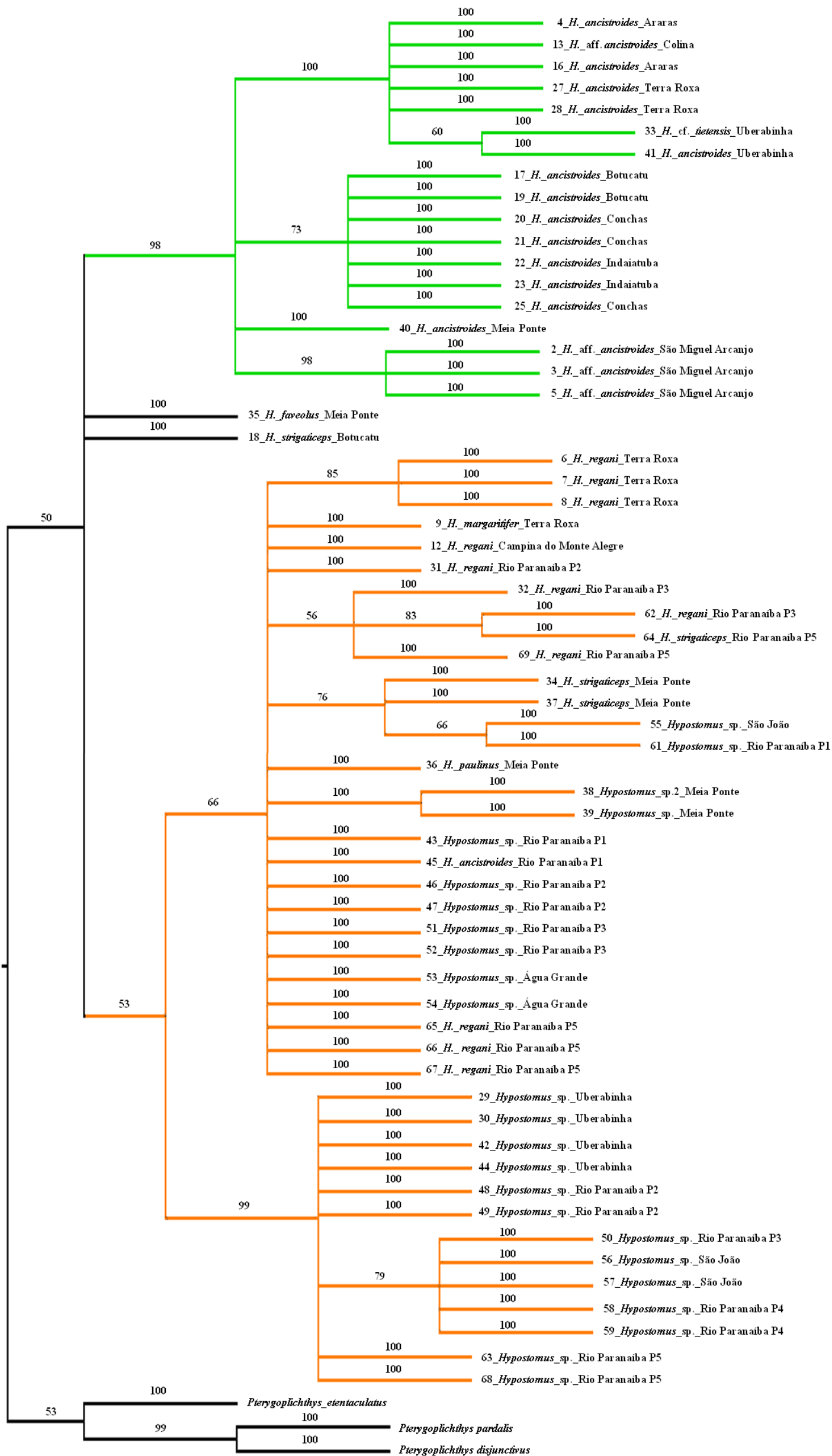


Figura 15: Rede de haplótipos encontrada para *H. ancistroides*, com formação de dois haplogrupos.



Haplogrupo 1
H. ancistroides,
H. tietensis
66 – 68
cromossomos

Haplogrupo 2
H. regani,
H. strigaticeps,
H. margaritifer,
H. paulinus,
Hypostomus sp.
72 – 74 – 76
cromossomos

Figura 16: Árvore de Máxima Verossimilhança obtida para espécies de *Hypostomus* analisadas. Os números representam os valores de bootstrap.

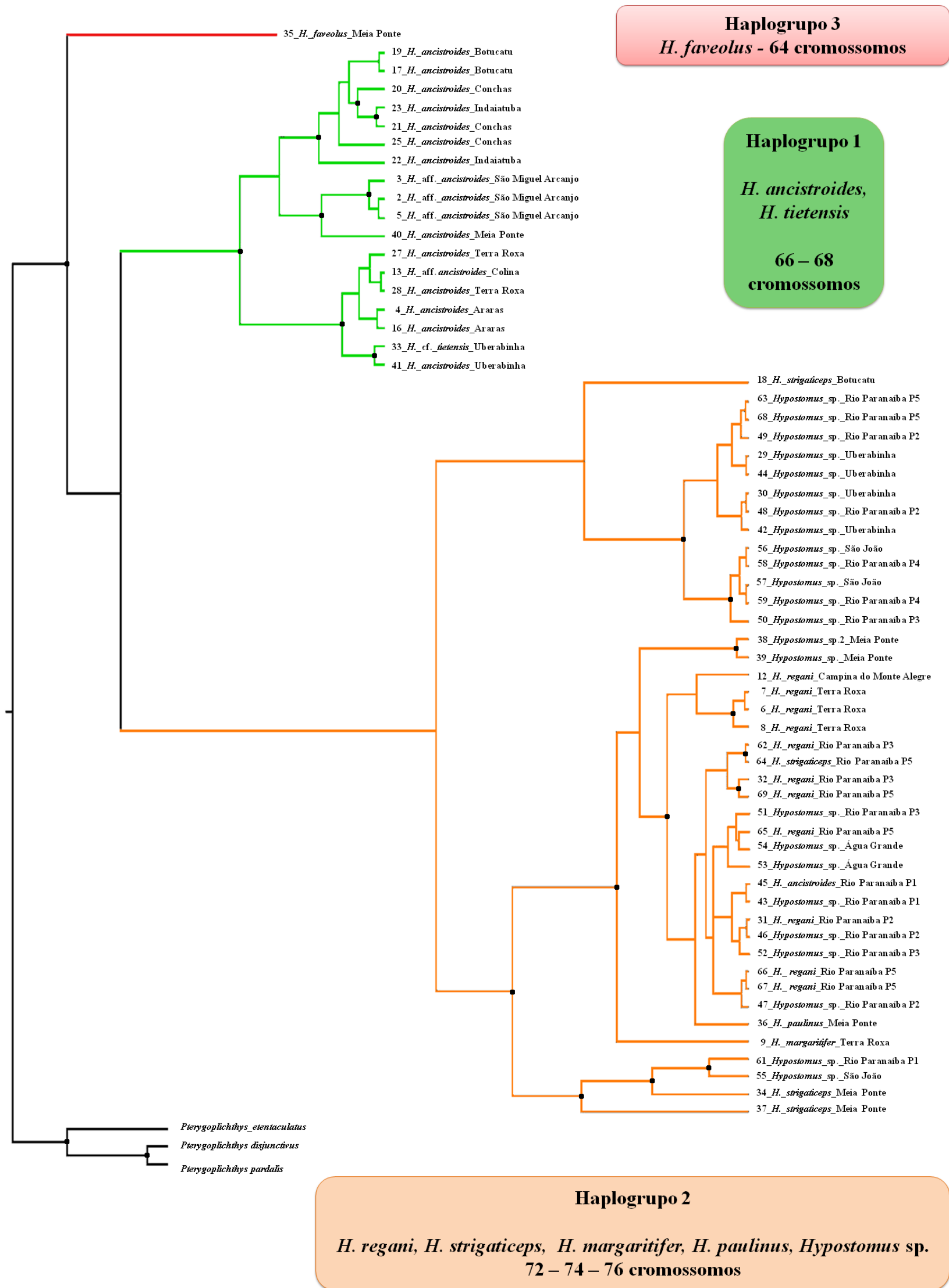


Figura 17: Árvore Bayesiana obtida para espécies de *Hypostomus* analisadas. Os valores de probabilidade posterior superiores a 70% são demonstrados por círculos pretos nos nós.

Apêndice A

Tabela 3. Detalhes dos exemplares coletados e utilizados no estudo.

Número da amostra	Registro de laboratório	Espécie	Ponto de Coleta	Coordenadas		Bacia hidrográfica
2	1702	H. aff. ancistroides	São Miguel Arcanjo	23°54'14.30"S	47°55'46.75"O	Rio Paranapanema
3	1705	H. aff. ancistroides	São Miguel Arcanjo	23°54'14.30"S	47°55'46.75"O	Rio Paranapanema
4	1726	H. ancistroides	Araras	22°22'59.64"S	47°25'49.50"O	Rio Tietê
5	1744	H. aff. ancistroides	São Miguel Arcanjo	23°54'44.58"S	47°57'40.50"O	Rio Paranapanema
6	1748	H. regani	Terra Roxa	20°43'34.00"S	48°19'15.80"O	Rio Grande
7	1749	H. regani	Terra Roxa	20°43'34.00"S	48°19'15.80"O	Rio Grande
8	1750	H. regani	Terra Roxa	20°43'34.00"S	48°19'15.80"O	Rio Grande
9	1751	H. margaritifer	Terra Roxa	20°43'34.00"S	48°19'15.80"O	Rio Grande
12	1762	H. regani	Campina do Monte Alegre	23°32'59.04"S	48°30'44.58"O	Rio Paranapanema
13	1801	H. aff. ancistroides	Colina	20°68'48.20"S	48°53'14.20"O	Rio Grande
16	1901	H. ancistroides	Araras	22°22'59.64"S	47°55'46.75"O	Rio Tietê
17	1903	H. ancistroides	Botucatu	22°52'29.15"S	48°22'27.50"O	Rio Tietê
18	1907	H. strigaticeps	Botucatu	22°52'29.15"S	48°22'27.50"O	Rio Tietê

Apêndice A – Tabela 3. Continuação.

19	1908	<i>H. ancistroides</i>	Botucatu	22°52'29.15"S	48°22'27.50"O	Rio Tietê
20	1912	<i>H. ancistroides</i>	Conchas	23°00'03.00"S	48°00'00.00"O	Rio Tietê
21	1914	<i>H. ancistroides</i>	Conchas	23°00'03.00"S	48°00'00.00"O	Rio Tietê
22	1918	<i>H. ancistroides</i>	Indaiatuba	23°05'39.12"S	47°15'38.16"O	Rio Tietê
23	1922	<i>H. ancistroides</i>	Indaiatuba	23°05'39.12"S	47°15'38.16"O	Rio Tietê
25	1926	<i>H. ancistroides</i>	Conchas	23°00'03.00"S	48°00'00.00"O	Rio Tietê
27	1930	<i>H. ancistroides</i>	Terra Roxa	20°43'34.00"S	48°19'15.80"O	Rio Grande
28	1932	<i>H. ancistroides</i>	Terra Roxa	20°43'34.00"S	48°19'15.80"O	Rio Grande
29	2440	<i>Hypostomus</i> sp.	Rio Uberabinha	18°40'40.37"S	48°30'23.44"O	Rio Paranaíba
30	2441	<i>Hypostomus</i> sp.	Rio Uberabinha	18°40'40.37"S	48°30'23.44"O	Rio Paranaíba
31	2449	<i>H. regani</i>	Rio Paranaíba P2	19°04'32.08"S	46°24'33.07"O	Rio Paranaíba
32	2471	<i>H. regani</i>	Rio Paranaíba P3	18°40'00.51"S	46°31'13.12"O	Rio Paranaíba
33	2548	<i>H. cf. tietensis</i>	Rio Uberabinha	18°40'40.37"S	48°30'23.44"O	Rio Paranaíba
34	2585	<i>H. strigaticeps</i>	Rio Meia Ponte	17°44'13.15"S	49°25'52.24"O	Rio Paranaíba
35	2587	<i>H. faveolus</i>	Rio Meia Ponte	17°44'13.15"S	49°25'52.24"O	Rio Paranaíba
36	2588	<i>H. paulinus</i>	Rio Meia Ponte	17°44'13.15"S	49°25'52.24"O	Rio Paranaíba
37	2589	<i>H. strigaticeps</i>	Rio Meia Ponte	17°44'13.15"S	49°25'52.24"O	Rio Paranaíba
38	2590	<i>Hypostomus</i> sp. 2	Rio Meia Ponte	17°44'13.15"S	49°25'52.24"O	Rio Paranaíba
39	2592	<i>Hypostomus</i> sp.	Rio Meia Ponte	17°44'13.15"S	49°25'52.24"O	Rio Paranaíba

Apêndice A – Tabela 3. Continuação.

40	2593	H. ancistroides	Rio Meia Ponte	17°44'13.15"S	49°25'52.24"O	Rio Paranaíba
41	2646	H. ancistroides	Rio Uberabinha	18°40'40.37"S	48°30'23.44"O	Rio Paranaíba
42	2680	Hypostomus sp.	Rio Uberabinha	18°40'40.37"S	48°30'23.44"O	Rio Paranaíba
43	2681	Hypostomus sp.	Rio Paranaíba P1	19°10'56.23"S	46°19'58.06"O	Rio Paranaíba
44	2686	Hypostomus sp.	Rio Uberabinha	18°40'40.37"S	48°30'23.44"O	Rio Paranaíba
45	2687	H. ancistroides	Rio Paranaíba P1	19°10'56.23"S	46°19'58.06"O	Rio Paranaíba
46	2747	Hypostomus sp.	Rio Paranaíba P2	19°04'32.08"S	46°24'33.07"O	Rio Paranaíba
47	2748	Hypostomus sp.	Rio Paranaíba P2	19°04'32.08"S	46°24'33.07"O	Rio Paranaíba
48	2750	Hypostomus sp.	Rio Paranaíba P2	19°04'32.08"S	46°24'33.07"O	Rio Paranaíba
49	2751	Hypostomus sp.	Rio Paranaíba P2	19°04'32.08"S	46°24'33.07"O	Rio Paranaíba
50	2776	Hypostomus sp.	Rio Paranaíba P3	18°40'00.51"S	46°31'13.12"O	Rio Paranaíba
51	2778	Hypostomus sp.	Rio Paranaíba P3	18°40'00.51"S	46°31'13.12"O	Rio Paranaíba
52	2779	Hypostomus sp.	Rio Paranaíba P3	18°40'00.51"S	46°31'13.12"O	Rio Paranaíba
53	2800	Hypostomus sp.	Olhos d'Água	19°13'49.31"S	46°12'20.70"O	Rio Paranaíba
54	2801	Hypostomus sp.	Olhos d'Água	19°13'49.30"S	46°12'20.70"O	Rio Paranaíba
55	2880	Hypostomus sp.	Rio São João	19°18'29.72"S	46°23'49.62"O	Rio Paranaíba
56	2888	Hypostomus sp.	Rio São João	19°18'29.72"S	46°23'49.62"O	Rio Paranaíba
57	2983	Hypostomus sp.	Rio São João	19°18'29.72"S	46°23'49.62"O	Rio Paranaíba
58	3064	Hypostomus sp.	Rio Paranaíba P4	19°07'52.57"S	46°23'30.42"O	Rio Paranaíba

Apêndice A – Tabela 3. Continuação.

59	3065	<i>Hypostomus</i> sp.	Rio Paranaíba P4	19°07'52.57"S	46°23'30.42"O	Rio Paranaíba
61	3103	<i>Hypostomus</i> sp.	Rio Paranaíba P1	19°10'56.23"S	46°19'58.06"O	Rio Paranaíba
62	3112	<i>H. regani</i>	Rio Paranaíba P3	18°40'00.51"S	46°31'13.12"O	Rio Paranaíba
63	3117	<i>Hypostomus</i> sp.	Rio Paranaíba P5	18°55'04.26"S	46°30'20.68"O	Rio Paranaíba
64	3123	<i>H. strigaticeps</i>	Rio Paranaíba P5	18°55'04.26"S	46°30'20.68"O	Rio Paranaíba
65	3125	<i>H. regani</i>	Rio Paranaíba P5	18°55'04.26"S	46°30'20.68"O	Rio Paranaíba
66	3128	<i>H. regani</i>	Rio Paranaíba P5	18°55'04.26"S	46°30'20.68"O	Rio Paranaíba
67	3140	<i>H. regani</i>	Rio Paranaíba P5	18°55'04.26"S	46°30'20.68"O	Rio Paranaíba
68	3184	<i>Hypostomus</i> sp.	Rio Paranaíba P5	18°55'04.26"S	46°30'20.68"O	Rio Paranaíba
69	3205	<i>H. regani</i>	Rio Paranaíba P1	19°10'56.23"S	46°19'58.06"O	Rio Paranaíba

Apêndice B

Tabela 4. Dados citogenéticos disponíveis para espécies de *Hypostomus* utilizadas neste estudo. Adaptado de Lorscheider et al. (2015).

Espécie	Bacia Hidrográfica	2n	Fórmula	NOR	Referência
H. faveolus	Rio Araguaia	64	18M + 20SM + 48ST/A	Múltiplas	Rubert et al. (2008)
H. ancistroides	Rio Piracicaba	68	16M+ 18SM + 34ST/A	Múltiplas	Artoni e Bertollo (1996)
H. ancistroides	Rio Tietê	68	18M + 10SM + 12ST + 28A	Múltiplas	Alves et al. (2006)
H. ancistroides	Rio Piquiri	68	14M + 14SM + 8ST + 32A	Múltiplas	Bueno et al. (2011, 2013)
H. ancistroides	Rio Paranapanema	68	10M + 26SM + 32ST /A	Múltiplas	Rubert et al. (2011)
H. ancistroides	Rio Pirapó	68	14M + 12SM + 18ST + 24A	Múltiplas	Endo et al. (2012)
H. ancistroides	Rio Pirapó	68	16M + 12SM + 18ST + 22A	Múltiplas	Endo et al. (2012)
H. ancistroides	Rio Ivaí	68	8M + 10SM + 18ST + 32A	Múltiplas	Endo et al. (2012)
H. ancistroides	Rio Corumbataí	68	16M + 4SM + 16ST + 32A	Múltiplas	Alves et al. (2012)
H. ancistroides	Rio Tibagi	66	12M + 16SM + 10ST + 28A	Múltiplas	Maurutto et al. (2012)
H. ancistroides	Rio Paranapanema	68	10M + 20SM + 10ST + 28A	Múltiplas	Pansonato-Alves et al. (2013)
H. ancistroides	Rio Passa Cinco	68	14M + 16SM + 22ST + 16A	Múltiplas	Traldi et al. (2013)
H. tietensis	Rio Paranapanema	68	14M + 12SM + 42ST/A	-	Oliveira e Foresti (1993)
H. paulinus	Rio Mogi-Guaçu	72	10M + 18SM + 44 ST/A	Múltiplas	Artoni e Bertollo (1996)
H. paulinus	Rio Mogi-Guaçu	72	14M + 20SM + 38ST/A	Múltiplas	Artoni e Bertollo (1996)

Apêndice B – Tabela 4. Continuação.

H. paulinus	Rio Paranapanema	76	6M + 6SM + 54ST/A	Simples	Rubert et al. (2011)
H. aff. paulinus	Rio Piquiri	74	10M + 12SM + 32 A	Simples	Bueno et al. (2013)
H. prope paulinus	Rio Corumbataí	76	6M + 18SM + 12ST + 40A	Simples	Alves et al. (2012)
H. regani	Rio Mogi-Guaçu	72	10M + 20SM + 42ST/A	-	Artoni e Bertollo (1996)
H. regani	Rio Tietê	72	12M + 18SM + 26ST + 16A	Múltiplas	Alves et al. (2006)
H. regani	Rio Mogi-Guaçu	72	6M + 6SM + 32ST + 28A	Múltiplas	Martinez et al. (2011)
H. regani	Rio Piumhi	72	8M + 16SM + 48ST/A	Múltiplas	Mendes-Neto et al. (2011)
H. regani	Rio Paranapanema	72	10M + 18SM + 44ST/A	Múltiplas	Rubert et al. (2011)
H. regani	Rio Ivaí	72	12M + 14SM + 18ST + 30A	Múltiplas	Endo et al. (2012)
H. regani	Rio Piquiri	72	12M + 8SM + 10ST + 42A	Múltiplas	Bueno et al. (2013)
H. strigaticeps	Rio Mogi-Guaçu	72	12M + 18SM + 42ST/A	Simples	Artoni e Bertollo (1996)
H. strigaticeps	Rio Paranapanema	72	10M + 16SM + 46ST/A	Múltiplas	Rubert et al. (2011)
H. strigaticeps	Rio Ivaí	72	10M + 14SM + 18ST + 30A	Múltiplas	Endo et al. (2012)
H. strigaticeps	Rio Corumbataí	74	10M + 14SM + 14ST + 36A	Múltiplas	Alves et al. (2012)
H. strigaticeps	Rio Piquiri	72	12M + 12SM + 18ST + 30A	Múltiplas	Bueno et al. (2013)
H. strigaticeps	Rio Paranapanema	72	10M + 18SM + 18ST + 26A	Simples	Pansonato-Alves et al. (2013)
H. margaritifer	Rio Tietê	72	30M/SM + 42ST/A	Múltiplas	Rocha Reis et al. (2013)

4. CONCLUSÃO GERAL

Hypostomus aff. *ancistroides* de São Miguel Arcanjo é uma nova espécie do complexo de espécies. Esta ideia é corroborada pela redução do número diploide apresentado com consequente isolamento reprodutivo, pela existência de um sistema cromossômico sexual e pelo monofiletismo em relação às outras populações de *H. ancistroides*.

A análise de populações alopátricas de *H. ancistroides* mostrou a existência de polimorfismos na fórmula cariotípica, Ag-RONs e rDNA 5S. Além disso, foi possível identificar a dispersão como mecanismo de evolução para esta espécie com base nos resultados de rDNA 5S, evidenciando que este pode ser um potencial marcador populacional.

Os dados moleculares obtidos por COI e Cyt b, juntamente com informações da literatura, permitiram a identificação de pelo menos dois grandes grupos dentro do gênero *Hypostomus*, corroborados por dados morfológicos, cariotípicos e moleculares. Além disso, as análises filogenéticas realizadas conseguiram validar as simplesiomorfias cromossômicas encontradas entre as espécies.

O gênero *Hypostomus* é um grupo muito diverso, seja no aspecto morfológico, cariotípico ou molecular. Devido ao seu grande número de espécies e recente diversificação, são necessários mais estudos para que possa se compreender a história evolutiva deste grupo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA TOLEDO, L. D.; FORESTI, H.; TOLEDO FILHO, S. D. A. 1984. Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). *Genetica*, 64: 165-169.
- ALMEIDA TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; DANIEL, M. F. Z.; TOLEDO-FILHO, S. A. 2000. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma*, 109: 197-200.
- ALVES, A. L. & MARTINS SANTOS, I. C. 2002. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with $2n= 48$ chromosomes (Teleostei, Characidae). *Cytologia*, 67: 117-122.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2003. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). *Caryologia*, 56: 57-63.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2005. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica*, 124: 127-136.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. 2006. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica*, 128: 1-9.
- ALVES, A. L.; BORBA, R. S.; POZZOBON, A. P. B.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. 2012. Localization of 18S ribosomal genes in suckermouth armoured catfishes Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) with discussion on the Ag-NOR evolution. *Comparative Cytogenetics*, 6(3): 315-321.
- AMEMIYA, T. & GOLD, J. R. 1986. Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of Fish chromosomes. *Copeia*, 1: 226-231.
- ANDREATA, A. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, A. S. 1992. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariinae) I: XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia*, 57: 369-372.
- ANDREATA, A. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, A. S. 1993. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariinae) II: ZZ/ZW sex-chromosome system, B chromosomes, and

- constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 63: 215–220.
- ANDREATA, A. A.; ALMEIDA TOLEDO, L. F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO FILHO, S. A. 1994. Cytogenetic studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). III. Analysis of seven species. *Caryologia*, 47: 27–37.
- ARMBRUSTER, J. W. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armored catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141: 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: 81-90.
- ARTONI, R. F.; VENERE, P. C.; BERTOLLO, L. A. C. 1998. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia*, 63: 421–425.
- ARTONI, R. F. & BERTOLLO, L. A. C. 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica*, 106: 209-214.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. 2000. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. *Biological and Health Sciences*, 6: 43-60.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. 2001. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134: 201-210.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; SAUNDERS, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 489-522.
- AVISE, J. C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2 ed. Sinauer, Sunderland, USA.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. 1979. Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 2: 17-37.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S. FILHO, O. M. 1983. Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (pisces: Erythrinidae). *Cytologia*, 48: 1-12.

- BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI, P. M. 1986. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 28: 153-159.
- BERTOLLO, L. A.; FONTES, M. S.; FENOCCHIO, A. S.; CANO, J. 1997. The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C-and chromosome replication banding. *Chromosome research*, 5: 493-499.
- BERTOLLO, L. A. C. & MESTRINER, C. A. 1998. The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses. *Chromosome research*, 6: 141-147.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K.; MEIER, R.; WINKER, K.; DAS, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 148-155.
- BILLINGTON, N. & HEBERT, P. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48: 80-94.
- BITENCOURT, J. A.; AFFONSO, P. R. A. M.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. 2011. Heterochromatin heterogeneity in *Hypostomus prope unae* (Steindachner, 1878) (Siluriformes, Loricariidae) from Northeastern Brazil. *Comparative Cytogenetics*, 5: 329-344.
- BIZERRIL, C. R. S. F. 1994. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. *Acta Biologica Leopoldensia*, 16: 51-80.
- BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; TRALDI, J. B.; MOREIRA-FILHO, O. 2012. Chromosomal characterization of armored catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): first report of B chromosomes in the genus. *Zoological Sciences*, 29: 604-609.
- BOORE, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27: 1767-1780.
- BORN, G. G. & BERTOLLO, L. A. C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research*, 8: 111-118.
- BORN, G. G. & BERTOLLO, L. A. C. 2006. A new sympatric region for distinct karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Biology*, 66: 205-210.

- BRITSKI, H. A. 1972. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: *Poluição e Piscicultura*: 79-108. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – Instituto de Pesca da Coordenadoria da Pesquisa de Recursos Naturais da Secretaria da Agricultura.
- BUENO, V.; ZAWADZKI, C. H.; MARGARIDO, V. P. 2012. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22: 241-250.
- BUENO, V.; VENERE, P. C.; ZAWADZKI, C. H.; MARGARIDO, V. P. 2013. Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23: 103–112.
- BUENO, V.; VENERE, P. C.; KONERAT, J. T.; ZAWADZKI, C. H.; VICARI, M. R.; MARGARIDO, V. P. 2014. Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède (Siluriformes: Loricariidae: evolutionary tendencies in the genus. *The Scientific World Journal*, 1-8.
- BURGESS, W. E. 1989. An atlas of freshwater and marine catfishes, a preliminary survey of the Siluriformes. Neotune City - Publications, 784p.
- CAMACHO, J. P. M. 1993. Polymorphisms and geographic distribution. In: 1st B-Chromosome Conference. Madrid, Espanha. P 2-3.
- CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. 2000. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355: 163-178.
- CANAPA, A.; CERIONI, P. N.; BARUCCA, M.; OLMO, E.; CAPUTO, V. 2002. A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Research*, 10: 297-304.
- CARVALHO, R. A.; MARTINS-SANTOS, I. C.; DIAS, A. L. 2008. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater neotropical fishes (teleostei). *Journal of Fish Biology*, 72: 1907– 1932.
- CASATTI, L.; LANGEANI, F.; CASTRO, R. M. C. 2001. Peixes de riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do alto rio Paraná, SP. *Biota Neotropica*, 1(1): 1-15.

- CASATTI, L.; ROCHA, F. C.; PEREIRA, D. C. 2005. Habitat use by two species of *Hypostomus* (Pisces, Loricariidae) in southeastern Brazilian streams. *Biota Neotropica*, 5(2): 157-165.
- CASTRO, R. M. C. & MENEZES, N. A. 1998. Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. In: *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX*, 6: vertebrados. Castro, R. M. C. (eds.). WinnerGraph, São Paulo, pp. 1-13.
- CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; FERREIRA, K. M.; RIBEIRO, A. C.; BENINE, R. C.; DARDIS, G. Z. P.; MELO, A. L. A.; STOPIGLIA, R.; ABREU, T. X.; BOCKMANN, F. A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F. Z.; LIMA, F. C. T. 2003. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, Sudeste e Sul do Brasil. *Biota Neotropica* 3(1): 1-14.
- CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; VARI, R. P.; MELO, A. L. A.; MARTINS, L. S. F.; ABREU, T. X.; BENINE, R. C.; GIBRAN, F. Z.; RIBEIRO, A. C.; BOCKMANN, F. A.; CARVALHO, M.; PELIÇÃO, G. Z. P.; FERREIRA, K. M.; STOPIGLIA, R.; AKAMA, A. 2005. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary Rivers of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 16(3): 193-214.
- CENTOFANTE, L. 2003. Citogenética comparativa entre ictiofáunulas isoladas por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na Serra da Mantiqueira. Tese de Doutorado. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade de São Carlos. São Carlos. 164p.
- CEREALI, S.S.; POMINI, E.; ROSA, R.; ZAWADZKI, C. H.; FROEHLICH, O.; GIULIANO-CAETANO, L. 2008. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 7: 583-591.
- CHIACHIO, M. C.; OLIVEIRA, C.; MONTOYA-BURGOS, J. I. 2008. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 606–617.
- CIOFFI, M. B. & BERTOLLO, L. A. C. 2010. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity*, 105: 554-561.

- CIOFFI, M. B.; MOREIRA FILHO-FILHO, O.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; BERTOLLO, L. A. C. 2012. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *Journal of Fish Biology*, 80: 2125-2139.
- COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA DO ALTO TIETÊ. 2009. Plano da Bacia Hidrográfica do Alto Tietê – Relatório final. Fundação de Amparo à Universidade de São Paulo. Pp 209.
- CRAMER, C. A.; BONATTO, S. L.; REIS, R. E. 2011. Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Locariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59: 43-52.
- DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1969-1973.
- ENDO, K. S.; MARTINEZ, E. R. M.; ZAWADZKI, C. H.; PAIVA, L. R. S.; JÚLIO JÚNIOR, H. F. 2012. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. *Acta Scientiarum – Biological Sciences*, 34(2): 181-189.
- ESCHMEYER, W. & FONG, J. D. 2016. Catalog of fishes electronic version. California Academy of Sciences. <<http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. Acesso em 09 de janeiro de 2016.
- FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. 1990. Supranumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 81: 193-198.
- FORESTI, F.; ALMEIDA TOLEDO, L. F.; TOLEDO, F. S. A. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, 31: 137-144.
- GALETTI Jr., P. M. & MARTINS, C. 2004. Contribuição da hibridização in situ para o conhecimento dos cromossomos de peixes. Capítulo 3. In: GUERRA, M. S. (Org.). *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética. p. 61-68.
- GARCIA, C. 2009. Estudos cromossômicos e moleculares em *Rhamdia* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae): análise de relações evolutivas. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

- GOLD, J. R.; LI, C.; SHIPLEY, N.; POWERS, P. K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563-575.
- GORNUNG, E.; GABRIELLI, I.; CATAUDELLA, S.; SOLA, L. 1997. CMA₃-banding pattern and fluorescence in situ hybridization with 18S rRNA genes in zebrafish chromosomes. *Chromosome Research*, 5: 40-46.
- GUERRA, M. 1988. *Introdução à Citogenética Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara. 142p.
- GUERRA, M. 2004. Hibridação in situ: princípios básicos. In: GUERRA, M. S. (Org.). *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética. 176p.
- HAMKALO, B. A. & ELGIN, S. C. R. 1991. Functional Organization of the Nucleolus: a Laboratory Guide. In: *Methods in Cell Biology*. Hamkalo, B. A. & Elgin, S. C. R. (eds.). Pp 670.
- HATANAKA, T. & GALETTI JR, P. M. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 122: 239-244.
- HICKERSON, M. J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K. A.; GRAHAM, C. H.; JOHNSON, J. B.; YODER, A. D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1): 291-301.
- HOLLANDA CARVALHO, P. H. 2011. *Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae)*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 129p.
- HOLLANDA CARVALHO, P.; QUEIROZ LIMA, S. M.; ZAWADZKI, C.; OLIVEIRA, C.; DE PINNA, M. 2015. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region. *Mitochondrial DNA*, 1-7.
- HOWELL, W. M. 1977. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosome. *Chromosoma*, 62: 361-367.
- HOWELL, W. M. & BLACK, D. A. 1979. Location of the nucleolus organizer regions on the sex chromosomes of the banded killifish, *Fundulus diaphanus*. *Copeia*, 3: 544-546.

- HUBBEL, H. R. 1985. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technology*, 60: 285–294.
- JOHN, B.; LEWIS, K. R. 1979. Hierarquia cromossômica. São Paulo, BRA: Editora da Universidade de São Paulo, 170p.
- JONES, R. N. & REES, H. 1982. B chromosomes. Academic Press, London.
- KAVALCO, K. F. & PAZZA, R. 2004. A rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, 27: 196-198.
- KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. 2004a. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas*, 141: 237-242.
- KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. 2004b. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 107-110.
- KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*, 94: 180-186.
- KEJNOVSKY, E.; HOBZA, R.; CERMÁK, T.; KUBÁT, Z.; VYSKOT, B. 2009. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity*, 102: 533-541.
- KONDO, M.; NANDA, I.; HORNUNG, U.; SCHMID, M.; SCHARTL, M. 2004. Evolutionary origin of the medaka Y chromosome. *Current Biology*, 14: 1664-1669.
- KONERAT, J. T.; BUENO, V.; MARGARIDO, V. P.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. 2015. Diversity of sex chromosome systems in Ancistrini (Loricariidae, Hypostominae): ZZ/ZW in *Ancistrus taunayi* Miranda Ribeiro, 1918. *Cytogenetic and Genome Research*, 146: 306-310.
- LANGANI, F. 1990. Revisão do gênero *Neoplecostomus*, com a descrição de quatro espécies novas do sudeste brasileiro (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae). *Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS*, 3: 3–31.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. 1964. Nomenclature of centromeric position on chromosomes. *Heredity*, 52: 201-220.
- LEWIN, B. 1994. *Genes V*. Oxford University Press Inc., New York. 1272p.

- LIMA, N. R. W. & GALETTI JR, P. M. 1990. Chromosome characterization of the fish *Trichogenes longipinnis*. A possible basic karyotype of Trichomycteridae. *Revista Brasileira de Genética*, 13: 239-245.
- LORSCHIEDER, C. A.; ZAWADZKI, C. H.; VICARI, M. R.; MARTINS-SANTOS, I. C.; ARTONI, R. F. 2015. Karyotypic diversity of the armoured catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) in the context of its occurrence and distribution. *Journal of Fish Biology*, 87(4): 1099-1110.
- LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; CARDOSO, A. J. 1998. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescent in situ hybridization. *Chromosome Research*, 6: 621-628.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. 1999. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Edusp, São Paulo. 534p.
- 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.
- MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, C. 2000. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 23: 365-369.
- MARCHAL, J. A.; ACOSTA, M. J.; NEITZEL, H.; SPERLING, K.; BULLEJOS, M.; DÍAZ de la GUARDIA, R.; SÁNCHEZ, A. 2004. X chromosome painting in *Microtus*: origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Research*, 12: 767-776.
- MARIOTTO, S.; ARTONI, R. F.; MIYAZAWA, C. S. 2004. Occurrence of sex chromosomes of the type ZZ/ZW in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia*, 57: 327-331.
- MARIOTTO, S. & MIYAZAWA, C. S. 2006. *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four population and occurrence of sexual chromosome of type XX/XY, in the Pantanal Basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia*, 59: 299-304.
- MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, C. S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. 2009. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae*

- Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotropical Ichthyology*, 7: 595-600.
- MARTINEZ, E. R. M.; ZAWADZKI, C. H.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. 2011. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). *Genetic and Molecular Biology*, 34: 562-568.
- MARTINS, C. & GALETTI Jr, P. M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.
- MARTINS, F. O.; CALEGARI, B. B.; LANGEANI, F. 2013. *Microlepidogaster arachas*, a new species of Hypoptopomatinae catfish (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Brazil. *Zootaxa*, 3608(5): 379-388.
- MAURUTTO, F. A. M. 2010. Contribuição à citogenética de peixes do gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Teleostei, Loricariidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 70p.M
- 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: 340-346.
- MAYR, E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press.
- MAYR, E. 1963. *Animal species and evolution*. Cambridge: Harvard University.
- MAYR, B.; RÀB, P.; KALAT, M. 1985. Localization of NORs and counterstain-enhanced fluorescence in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica*, 67: 51-56.
- MENDES-NETO, E. O.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. 2011. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, oricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. *Comparative cytogenetics*, 5: 133-142.
- MENEZES, N. A. 1996. Methods for assessing freshwater fish diversity. In: *Biodiversity in Brazil*. Bicudo, C. E. M. & Menezes, N. A.(eds.). CNPq, São Paulo, pp. 289-295.
- MESTRINER, C. A.; GALETTI, P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. 2000. Structural and

- functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, 85: 1-9.
- MICHELLI, J. L.; TAKAHASHI, C. S.; FERRARI, I. 1977. Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia*, 42: 539–546.
- MILHOMEM, S.; CASTRO, R.; NAGAMACHI, C.; DE SOUZA, A.; FELDBERG, E.; PIECZARKA, J. 2010. Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). *Comparative cytogenetics*, 4: 45-54.
- MILLER, O. J.; MILLER, D. A.; DEV, V. G.; TANTRAVAHU, R.; CROCE, C. M. 1976. Expression of humans and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 73: 4531-4535.
- 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.
- MORAES, A. P. 2007. Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em *Citrus* e *Poncirus*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR, P. M. 1984. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 26: 564-568.
- MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L.A.C. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Revista Brasileira de Genética*, 14: 331-357.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR, P. M. 1993. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*, 46: 115-125.
- MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269-292.
- MULLER, S. & C. WEBER. 1992. Les dents des sous-familles Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. *Revue Suisse de Zoologie*, 99: 747–754.
- MURAMOTO, J. I.; OHNO, S.; ATKIN, N. B. 1968. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. *Chromosoma*, 24: 59-66.

- NANDA, I.; VOLFF, J. N.; WEIS, S.; KORTING, C.; FROSCHAUER, A., SCHIMID M.; SCHARTL, M. 2000. Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma*, 109: 173-180.
- NELSON, S. J. 2006. *Fishes of the world*. 4th edition, John Wiley e Sons. New York – USA. 624p.
- NIRCHIO, M. & OLIVEIRA, C. 2006. *Citogenética de peces*. 1 ed. Caracas: Universidad de Oriente. 212p.
- NYLANDER, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2.
- OLIVEIRA, C. & FORESTI, F. 1993. Cariótipo, RONS e bandas C de *Hypostomus tietensis* (Pisces, Loricariidae). X Encontro Brasileiro de Ictiologia. Instituto Oceanográfico, São Paulo, p. 174.
- OLIVEIRA, C. & GOSZTONYI, A. E. 2000. A cytogenetic study of *Diplotnystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriforms. *Caryologia*, 53: 31-37.
- de OLIVEIRA, R. R.; SOUZA, I. L.; VENERE, P. C. 2006. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spolimma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotropical Ichthyology*, 4: 93-97.
- de OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; DOS ANJOS, M. B.; ZUANON, J. 2007. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 5: 301-306.
- de OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; DOS ANJOS, M. B.; ZUANON, J. 2010. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica*, 134: 243-249.
- OLIVEIRA, L. C.; RIBEIRO, M. O.; DUTRA, E. S.; ZAWADZKI, C. H.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. 2015. Karyotype structure of *Hypostomus cf. plecostomus* (Linnaeus, 1758) from Tapajós River basin, Southern Amazon: occurrence of sex chromosomes (ZZ/ZW) and their evolutionary implications. *Genetics and Molecular Research*, 14: 6625-6634.

- ORR, M. R. & SMITH, T. B. 1998. Ecology and Speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 502-506.
- OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; ZANATA, A. M. 2005. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Rio Ribeira de Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Zootaxa*, 921: 1-27.
- OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K. C.; NOLASCO, J. C. 2006. Peixes de Riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo. São Paulo, BRA: Editora Neotrópica, 201p.
- PAIVA FILHO, A. M. 1982. Estudo sobre a ictiofauna do Canal dos Barreiros, Estuário de São Vicente, SP. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo. Instituto Oceanográfico. Brasil. 189p.
- PANSONATO-ALVES, J. C.; SERRANO, E. A.; UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2013. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23: 477-489.
- PAZZA, R. 2005. Contribuição citogenética à análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. 2006. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*, 112: 313-319.
- PEICHEL, C. L.; ROSS, J. A.; MATSON, C. K.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; SCHUMUTZ, J.; MYERS, R. M.; MORI, S.; SCHLUTER, D.; KINGSLEY, D. M. 2004. The master sex-determination locus in treepine sticklebacks in on a nascente Y chromosomes. *Current Biology*, 14: 1416-1424.
- PENDÁS, A. M.; MORAN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. 1994. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 67: 31-36.
- PEREIRA, S. L. 2000. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 745-752.

- PHILLIPS, R. B. & REED, K. M. 1996. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140: 197-216.
- PHILLIPS, R. B. & REED, K. M. 2000. Localization of repetitive DNAs to zebrafish (*Danio rerio*) chromosomes by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Chromosome Research*, 8: 27-35.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938.
- POSADA, D. & CRANDALL, K. A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 37-45.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. 2008. *Vertebrate Biology*. 8th ed., Hardcover, Washington, USA. 716p.
- REED, K. M. & PHILLIPS, R. B. 1997. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Artic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. *Chromosome research*, 5: 221-227.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (orgs.). 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre. 729p.
- REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L.; ARMBRUSTER, J. W. 2006. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 147: 277–299.
- RIBEIRO, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4: 225–246.
- RITCHIE, M. G. 2007. Sexual selection and speciation. *Annual Review of Ecology System*, 38: 79-102.
- ROCHA REIS, D. A.; BRANDÃO, K. O.; ALMEIDA TOLEDO, L. F.; PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. 2013. Análise citogenética de três espécies de *Hypostomus* da bacia do rio Paraná. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, 4: 50-58.
- ROXO, F. F.; SILVA, G. S. C.; OLIVEIRA, C.; ZAWADZKI, C. H. 2013. *Hisotonus bocaiuva*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Teleostei: Loricariidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 23(4): 319-326.

- 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 Otothyriinae (Siluriformes: Loricariidae). PLOS ONE 9(8): e105564. doi: 10.1371/journal.pone.0105564
- RUBERT, M.; ZAWADZKI, C. H.; GIULIANO-CAETANO, L. 2008. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). Neotropical Ichthyology, 6: 93–100.
- RUBERT, M.; DA ROSA, R.; JEREP, F. C.; BERTOLLO, L. A.; 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: 397–410. doi: 10.3897/CompCytogen.v5i5.1589.
- SABAJ, M. H.; ARMBRUSTER, J. W.; PAGE, L. M. 1999. Spawning in *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. Ichthyological Exploration of Freshwaters, 10: 217–229.
- SAMPAIO, J. 1944. Desmídias Portuguesas. Separata do Boletim da Sociedade Broteriana. Vol. 18, série 2.
- SCAVONE, M. D. P.; JÚLIO JR, H. F. 1995. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). Brazilian Journal of Genetics, 18: 31–35.
- SCHAEFER, A. S. 1987. Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus) with a phylogenetic analysis of the loricariid subfamilies (Pisces: Siluroidei). Contributions in Science, 194: 1-31.
- SCHIMID, M. & GUTTENBACH, M. 1988. Evolutionary diversity IF reserve R fluorescent chromosome bands in vertebrates. Chromosoma, 97: 101-114.
- SCZEPANSKI, T. S. 2008. Caracterização cromossômica de espécies da família Ariidae (Teleostei, Siluriformes) pertencentes ao Litoral paranaense. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

- SENE, V. F. 2011. Citogenética molecular e caracterização cromossômica no gênero *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 70p.
- SIMONSEN, K. L.; CHURCHILL, G. A.; AQUADRO, C. F. 1995. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics*, 141: 413-429.
- SOLA, L.; ROSSI, A. R.; LASELLI, V.; RASCH, E. M.; MONACO, P. J. 1982. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A₃, and silver staining. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 60: 229-235.
- SOUZA FILHO, E. E. & STEVAUX, J. C. 1997. Geologia e geomorfologia do complexo rio Baía, Curutuba, Ivinheima. In: A Planície de inundação do Alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Vazzoler, A. E. A. M.; Agostinho, A. A.; Hahn, N. S. (Eds.). EDUEM, Maringá, p. 3-46.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A.; WINEMILLER, K. O. 2000. Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in loriciid catfishes of the Paraná River, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 57: 791-807.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- TAN, M. & ARMBRUSTER, J. W. 2012. *Cordylancistrus santarosensis* (Siluriformes: Loricariidae), a new species with unique snout deplation from the Rio Santa Rosa, Ecuador. *Zootaxa*, 3243: 52-58.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.

- TORRES-MARIANO, A. R. & MORELLI, S. 2008. B chromosome in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, 31: 246-249.
- TRALDI, J. B.; BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; MARTINEZ, J. F.; LUI, R. L.; BARROS, A. V.; MOREIRA-FILHO, O. 2013. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genetics and Molecular Research*, 12: 463-471.
- VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. 2008. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janae*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122: 67-72.
- VOLOBUJEV, V. T. 1981. B-chromosomes system of the mammals. *Caryologia*, 34: 1-23.
- WALLRATH, L. L. 1998. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8: 147-153.
- WEBER, C. 2003. Subfamily Hypostominae. In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. J. (eds.). Porto Alegre. Edipucrs. Pp 351-372.
- WHITE, M. J. D. 1954. *Animal Cytology and Evolution*. 2nd edition. Cambridge, USA: University Press, 454p.
- WHITE, M. J. D. 1973. Chromosomal rearrangements in mammalian populations: polymorphism and speciation. In: *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Chiarelli, A. B.; Capanna, E. (eds.). London Academic Press, p. 95-128.
- ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; PAIVA, S.; LARA-KAMEI, M. C. S. 2004. Allozyme differentiations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica*, 121: 251-257.
- ZAWADZKI, C. H.; BIRINDELLI, J. L. O.; LIMA, F. C. T. 2008a. A new pale-spotted species of *Hypostomus* Lacépède (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Tocantins and Xingu basins in central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6: 395-402.
- ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; PERES, M. D.; PAIVA, S. 2008b. Allozyme variation among three populations of the armored catfish *Hypostomus regani*

- (Ihering, 1905) (Siluriformes, Loricariidae) from the Paraná and Paraguay river basins, Brazil. *Genetic and Molecular Biology*, 31: 767-771.
- ZAWADZKI, C. H.; BIRINDELLI, J. L. O.; LIMA, F. C. T. 2012. A new armored catfish species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Xingu basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 10(2): 245-253.
- ZAWADZKI, C. H. & HOLLANDA CARVALHO, P. 2014. A new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Aripuanã basin in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 12: 43–51.
- ZAWADZKI, C. H.; TENCATT, L. F. C.; FROEHLICH, O. 2014. A new unicuspid-toothed species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paraguai basin. *Neotropical Ichthyology*, 12: 97–104.
- ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A. V.; ROSA, K. O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; CESTARI, M. M.; VICARI, M. R. 2012. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Italian Journal of Zoology*, 79: 492-501.
- ZIESLER, R. & ARDIZZONE, G. D. 1979. The inland waters of Latin America.