

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA

**Emanuel Ricardo Monteiro Martinez**

**ESTUDO DA EVOLUÇÃO DO GÊNERO *Hypostomus* (TELEOSTEI,  
SILURIFORMES, LORICARIIDAE) COM BASE EM  
CARACTERES CROMOSSÔMICOS E SEQÜÊNCIAS DE DNA**



**ORIENTADOR: Prof. Dr. Claudio de Oliveira**

**Botucatu - SP**

**2009**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA

**Emanuel Ricardo Monteiro Martinez**

**ESTUDO DA EVOLUÇÃO DO GÊNERO *Hypostomus* (TELEOSTEI,  
SILURIFORMES, LORICARIIDAE) COM BASE EM CARACTERES  
CROMOSSÔMICOS E SEQÜÊNCIAS DE DNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas - Zoologia, para obtenção do título  
de Doutor.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Claudio de Oliveira**

**Botucatu - SP**

**2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Martinez, Emanuel Ricardo Monteiro.

Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e seqüências de DNA / Emanuel Ricardo Monteiro Martinez. – Botucatu: [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2009

Orientador: Claudio de Oliveira

Assunto CAPES: 20204000

1. Peixe - Genética 2. Zoologia

CDD 597.55

Palavras-chave: Citogenética; DNA; *Hypostomus*; Peixes; Sistemática Molecular

*“A palavra puxa palavra uma idéia traz outra e assim se faz um livro, um governo ou uma revolução.”*

*Machado de Assis*



**Dedico este trabalho...**

*“...aos meus pais Manuel Martinez Soria e  
Marilsa Monteiro Cabrera Martinez,  
presentes em todos os momentos,  
sempre oferecendo palavras  
de otimismo e de fé.*

*Obrigado.”*

## **Agradecimentos**

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para tornar possível a realização deste trabalho, em especial:

A Deus, que sempre esteve ao meu lado iluminando meu caminho, me protegendo e me conduzindo para a luz.

A minha família, especialmente aos meus pais, Manuel Martinez Soria e Marilsa Monteiro Cabrera Martinez, irmãos, Cristiano Monteiro Martinez e Krivia Emanuela Monteiro Martinez e meus avós Ana, José, Dionísio e Rosa que sempre me encorajaram e me ajudaram em todos os momentos, alegres ou infelizes.

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira pela orientação, e por acreditar no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pelas importantes sugestões e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Cláudio Henrique Zawadzki pela colaboração na identificação das espécies, pelas contribuições nas discussões, dedicação e palavras de incentivo para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Doutores Cláudio Henrique Zawadzki, Cristiane kioko Shimabukuro-Dias, Fausto Foresti e Osvaldo Takeshi Oyakawa, por fazerem parte da banca examinadora desta Tese e pelas suas contribuições.

Aos Drs. Cláudio Henrique Zawadzki, Dr. Erasmo Renesto, Dr. José Augusto Senhorini, Me. José Carlos Pansonato Alves, Ma. Suzana de Paiva e aos amigos e funcionários do CEPTA, “Ricardo” e “Gordo”, pelas doações de exemplares e tecidos para o desenvolvimento do trabalho e ajuda técnica nas coletas.

Ao Renato Devidé, pela ajuda técnica e amizade.

Ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, ao Departamento de Morfologia, à Pós Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Zoologia, ao Instituto de Biociências e à Universidade Estadual Paulista (UNESP) e a Botucatu que tornaram possível o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa e reserva técnica. FAPESP e CAPES pelo apoio ao desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas de trabalho e amigos, pelo incentivo e momentos de descontração, Adriana (Adrianinha), Alex (Alf), Ana Paula, Andréia Alves, Bruno (Guiodai), Celso (Celsão), César Martins, Claudia (Claudinha), Clivia (Thuthuka), Cristiane (Cris), Daniela (Dani), Danilo, Débora, Elisa (Meketrefe), Ernesto, Fábio (Fio), Fernando (Konrado), Gláucia (Anfetamina), Gleisy, Guilherme (Varvito), Guilherme (Karunxo), Gustavo, Heleno, Heraldo, Igor (Brecha), José Carlos (Zéca), José Eduardo (Zé), José Luís (Zé), Jefferson (Menudo), Juliana (Julianinha), Júlio, Kelly, Lessandra, Luis Henrique (Japonês), Luiz Ricardo, Luiz (Ziriguidum), Márcio, Mahmoud, Marlon, Maressa, Marina, Mauro, Natália, Patrícia, Paulo Vênere, Ricardo (Japa), Ricardo Benine, Rosangela, Tatiane (Tati), Waldo, Welley e Vanessa.

Aos colegas e amigos de trabalho de Bauru, pela amizade e incentivo, Diogo, Fábio P. Foresti, Mateus, Sabrina e Tatiana.

Aos amigos de Marialva, Paraná que sempre acreditaram nas minhas idéias e me incentivaram, Adriano, Alber, Gilmar, Marcelo, Márcio, Michel, Paulo, Roberson e Rosana.

Aos amigos que tenho espalhado pelo Brasil, que sempre torceram pela minha felicidade, Adriano Silvério, Alexandre Azevedo, Alexandre (Paranaguá), Anderson L. Alves, Bruno Belini, Claudia Evangelista, Cleverson, Fernanda (Xambinho), Gisele, Júlio (Grilo), Kátia, Marisa Azevedo, Patrícia Parise, Renata Salvador, Tatiane.

Aos amigos que em coração são Botucatuenses que sempre estiveram ao meu lado e que me ajudaram nos momentos mais difíceis com conselhos e palavras de

incentivo, Alex (Alf), Fábio (Escova), Letícia (Trikoma) e Ricardo T. Fujihara (Japonês). E em especial ao Fábio (Fio), Guilherme (Varvito) e Kelly que me ajudaram muito com discussões, correções e dicas no desenvolvimento desta tese.

Aos amigos do Departamento de Citologia e Genética e ao Laboratório de Citogenética de Peixes da UEM e ao Nupélia, Maringá, Paraná, onde tudo começou, onde acreditaram em mim e me incentivaram a trabalhar no mundo maravilhoso da Genética, agradeço aos Profs. Hélio Conte, Horácio F. Júlio-Junior, Márcia Kamei, Isabel C. Martins dos Santos, Patrícia Belini, Sônia Mizoguchi e a técnica Soninha.

À família Gushi, Sr. Sérgio, Sra. Célia, Marcel, Lívia, Juliano e Avós que me receberam de braços abertos.

À minha namorada Letícia Tsieme Gushi pelo seu amor, dedicação e antes de tudo amizade que me ajudaram nos momentos mais duros e complicados e pelos momentos felizes, que me ajudaram a desenvolver o meu trabalho.

E por fim, espero estar assim ajudando a proteger a natureza e somar conhecimentos, através desta contribuição científica.



## RESUMO

A família Loricariidae, uma das maiores famílias de peixes do mundo com cerca de 690 espécies, tem sido objeto de vários estudos taxonômicos e sistemáticos, o que tem auxiliado na compreensão da diversidade e dos padrões gerais de relacionamento entre seus gêneros e espécies. Todavia, dada à ampla diversidade do grupo, muitos dos problemas da família ainda não foram resolvidos. Os estudos genéticos ainda podem ser considerados incipientes para o grupo, apesar de que vários dados importantes já tenham sido descritos. Dentro de Loricariidae o gênero *Hypostomus* é o mais numeroso (121 espécies descritas), com ampla distribuição, com grande incidência na maior parte das bacias hidrográficas brasileiras e um dos que se apresenta, também, menos resolvidos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma análise ampla de cunho citogenético e de sistemática molecular de *Hypostomus*, procurando levantar novos dados para o estabelecimento dos padrões de relacionamento entre as espécies deste gênero. As análises citogenéticas mostraram que sete populações de *Hypostomus ancistroides* das bacias dos rios Paraná, Paranapanema e Tietê, apresentaram número diplóide  $2n=68$ , mas com uma variação morfológica dos cromossomos e com NORs variando entre dois e três pares nos cromossomos. *H. regani* da bacia do rio Mogi-Guaçu, apresentou  $2n=72$  cromossomos, com NOR em dois pares de cromossomos. *Hypostomus* sp. da bacia do rio Mogi-Guaçu, apresentou  $2n=68$  cromossomos, com NOR em dois pares de cromossomos. *H. aff. agna* da bacia Costeira Oriental, apresentou  $2n=74$  cromossomos, com NOR em dois pares de cromossomos. *H. cf. heraldoi* da bacia do rio Mogi-Guaçu, apresentou  $2n=72$  cromossomos, com NOR em um par de cromossomos. *H. cf. strigaticeps* da bacia do rio Mogi-Guaçu, apresentou  $2n=74$  cromossomos, com NOR em dois pares de cromossomos. *H. cf. topavae* da bacia do rio Paraná, apresentou  $2n=80$  cromossomos, com NOR em dois pares de cromossomos. Exemplares de quatro populações de *H. strigaticeps* das bacias dos rios Mogi-Guaçu, Paraná e Tietê apresentaram  $2n=72$  cromossomos, com NORs variando entre um par e quatro pares de cromossomos. Do ponto de vista da sistemática molecular, foram analisadas seqüências de DNA mitocondrial dos genes Citocromo *b* (seqüências completas) e 16S rRNA (seqüências parciais) e de DNA nuclear do gene F-Reticulon 4 (seqüências parciais) para 61 representantes do gênero *Hypostomus*, quatro

representantes da tribo Ancistrini, seis representantes da tribo Pterygoplichthini e um exemplar de *Aphanotorulus unicolor*. A árvore foi enraizada em dois representantes da subfamília Neoplecostominae. Embora o gênero *Hypostomus* tenha se mostrado monofilético, as espécies do gênero apresentaram uma grande diversidade em número e morfologia dos cromossomos, sugerindo que ocorreram rearranjos cromossômicos do tipo fissão cêntrica e inversões pericêntricas, pelo grande aumento de cromossomos dos tipos subtelo-cêntricos e acrocêntricos. As NORs múltiplas em posição terminal encontradas na maioria das espécies, podem ser uma condição derivada para Loricariidae. O gênero *Hypostomus* se mostrou monofilético com várias sub-unidades bem caracterizadas. A presente hipótese, baseada em caracteres citogenéticos e moleculares, vêm contribuir na diferenciação de espécies deste grupo.

**Palavras-chave:** Citogenética, DNA, *Hypostomus*, Peixes e Sistemática Molecular.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	09
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 Aspectos Sistemáticos e Taxonômicos	14
1.2 Dados Citogenéticos e Moleculares	23
<b>2 OBJETIVOS</b>	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	34
<b>3.1 MATERIAIS</b>	35
3.1.1 Citogenética	36
3.1.2 Molecular	36
<b>3.2 MÉTODOS</b>	37
<b>3.2.1 Métodos citogenéticos</b>	38
3.2.2.1 Estimulação de mitoses	38
3.2.2.2 Obtenção de Cromossomos Mitóticos	38
3.2.2.3 Coloração com Giemsa	39
3.2.2.4 Localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (Ag-NORs)	39
3.2.2 Estudos Cariotípicos	40
3.2.3 Medidas Cromossômicas	40
3.2.4 Montagem dos Cariótipos	40
<b>3.2.5 Métodos Moleculares</b>	41
3.2.5.1 Isolamento de DNA Genômico	41
3.2.5.1.1 Extração de DNA com Kit	41
3.2.5.2 Amplificação Gênica	42
3.2.5.3 Purificação do DNA amplificado	44
3.2.5.4 Quantificação de DNA para Reação de Seqüenciamento	45
3.2.5.5 Reação de PCR de Seqüenciamento de DNA	45
3.2.5.6 Reação de Limpeza do PCR de Seqüenciamento	45
3.2.16 Seqüenciamento	46

3.2.5.8 Alinhamento e Análise Filogenética	46
<b>4 Resultados e Discussão</b>	<b>48</b>
Capítulo I - Análise citogenética de espécies do gênero <i>Hypostomus</i> (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae).	51
Resumo	52
Introdução	53
Material e Métodos	54
Resultados e Discussão	59
Agradecimentos	65
Capítulo II - Estudo da evolução do gênero <i>Hypostomus</i> (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em seqüências de DNA.	78
Resumo	79
Introdução	80
Material e Métodos	83
Resultados e Discussão	86
Conclusão	98
Agradecimentos	99
<b>5 Conclusões</b>	<b>104</b>
<b>6 Referências</b>	<b>107</b>





## ***INTRODUÇÃO***

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos Sistemáticos e Taxonômicos

A Sistemática, estudo das relações evolutivas entre os organismos, é a área da Biologia para a qual convergem todas as demais áreas. Considerando que a história evolutiva dos organismos está associada às mudanças climáticas e geográficas ocorridas durante a história do planeta, a elucidação das relações filogenéticas entre os seres vivos permite não só o estudo da sua evolução, como também é base para estudos biogeográficos e ecológicos (Futuyma, 1992). O conhecimento acerca da diversidade biológica é o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida e o reconhecimento de espécies, bem como a habilidade de nomeá-las, sendo fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e todas as outras disciplinas relacionadas aos organismos (Savage, 1995).

Segundo Reis *et al.* (2003), estima-se que existam 6.000 espécies, sendo que para o mundo possam existir 13.000 espécies. Na região Neotropical, são encontradas 71 famílias, num total de 4.475 espécies válidas e cerca de 1.550 espécies não descritas (Reis *et al.*, 2003). Em um levantamento das tendências históricas de descrição de espécies em Characidae e Loricariidae feito por Schaefer (1998), o autor estima que possam existir cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais, o que corresponderia a 25% de todas as espécies de peixes do mundo. Esse número é discutido e aceito por Vari e Malabarba (1998) que acrescentam que toda essa diversidade de peixes de água doce neotropical ocorre em menos de 0,003% da água do planeta.

Os estudos sistemáticos dos peixes neotropicais têm-se expandido consideravelmente nos últimos anos (ver referências em Malabarba *et al.*, 1998), principalmente após a incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados, entre as quais está o uso da metodologia de análise filogenética proposta inicialmente por Hennig (1966) e implementada por diversos autores. Apesar dos notáveis progressos, muito ainda resta a ser conhecido sobre a filogenia dos diversos grupos, devido à imensa magnitude da biodiversidade neotropical.

A ordem Siluriformes compreende um grupo de peixes extremamente grande, diverso e amplamente distribuído nas regiões tropicais de todo o mundo (Burgess, 1989,

Teugels, 1996 e Ferraris, 2007). Tal ordem está incluída na Superordem Ostariophysi, um grupo de peixes ósseos que somam algo em torno de três quartos dos peixes de água doce do mundo. Sua enorme diversidade ecológica e evolucionária os faz foco de muitos estudos (Fink e Fink, 1981, de Pinna, 1998, Hardman, 2005 e Sullivan *et al.*, 2006). Espécies desse grupo estão distribuídas atualmente em cinco ordens, com um total de 63 famílias, cerca de 1.000 gêneros e 6.500 espécies (Nelson, 2006).

Os Otophysi compreendem um grupo de peixes ósseos diagnosticado pela presença do aparelho de Weber, um complexo formado por um conjunto de ossículos fundidos (*tripus*, *intercalarium*, *claustrum* e *scaphium*) que permitem a conexão da bexiga natatória com o ouvido interno (Burgess, 1989 e Fink e Fink, 1996). Fink e Fink (1996) propõem a seguinte classificação para os Otophysi: Cypriniphysi, que inclui a ordem Cypriniformes, Charaphysi, incluindo os Characiformes, e Siluriphysi, que inclui duas ordens, Gymonotiformes e Siluriformes. O número de espécies de Siluriformes conhecidas é de cerca de 3.088, porém esse número pode ser bem maior (Burgess, 1989, Teugels, 1996, Reis *et al.*, 2003, Nelson, 2006 e Ferraris, 2007).

Os Siluriformes, com muitas exceções, são peixes que habitam o fundo dos rios, permanecendo entre as rochas e a vegetação (Ferraris, 2007). Possuem formas e tamanhos extremamente variados, com hábitos predominantemente crepusculares e noturnos (Ferraris, 2007). São caracterizados principalmente pela total ausência de escamas sobre o corpo, presença de barbilhões e freqüentemente um acúleo forte e pungente a frente do primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitorais, capazes de infringir graves ferimentos e em algumas espécies, injetar um veneno produzido por células glandulares localizadas no tecido epidérmico que cobre estes acúleos (Alexander, 1965 e Paxton e Eschmeyer, 1998).

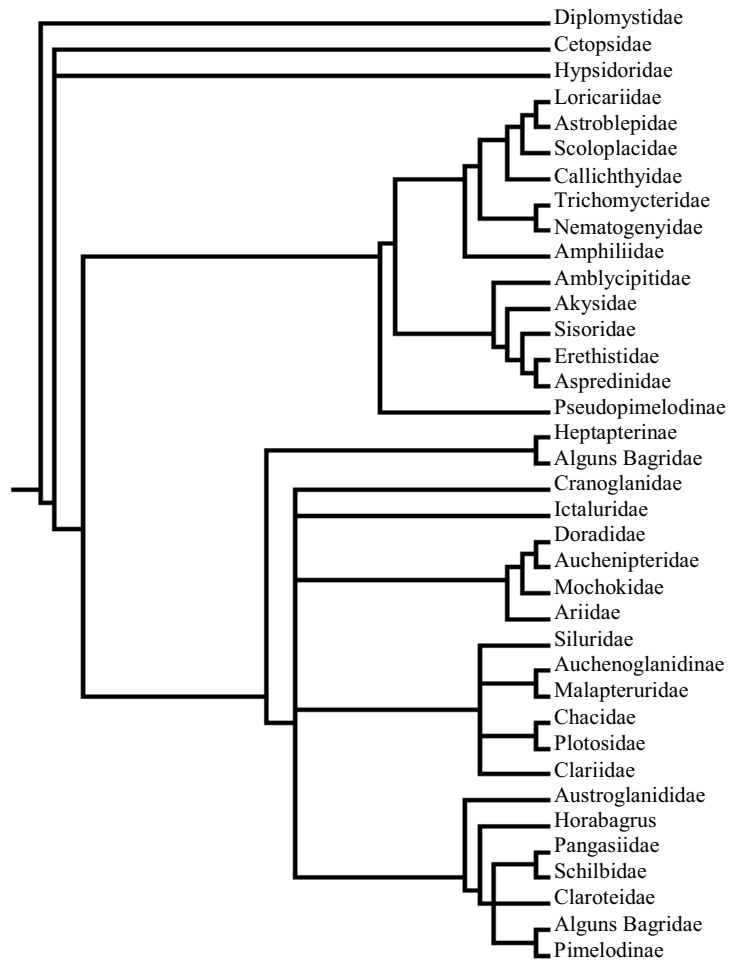
A grande maioria dos peixes da ordem Siluriformes habita ambientes de água doce, sendo que apenas duas famílias, Ariidae e Plotosidae apresentam uma representação significativa de espécies marinhas. Sua distribuição parece ser limitada pela temperatura, uma vez que a maioria habita as regiões Tropical e Neotropical e poucas são aquelas que alcançam o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (Nelson, 2006).

Apesar da importância científica e econômica dos Siluriformes, o grupo apresenta ainda inúmeros problemas sistemáticos e taxonômicos. A própria classificação das famílias de Siluriformes ainda não é consensual. Assim, por exemplo, o número de famílias citadas para a ordem é de 29 segundo Ferraris (1998), 33 segundo

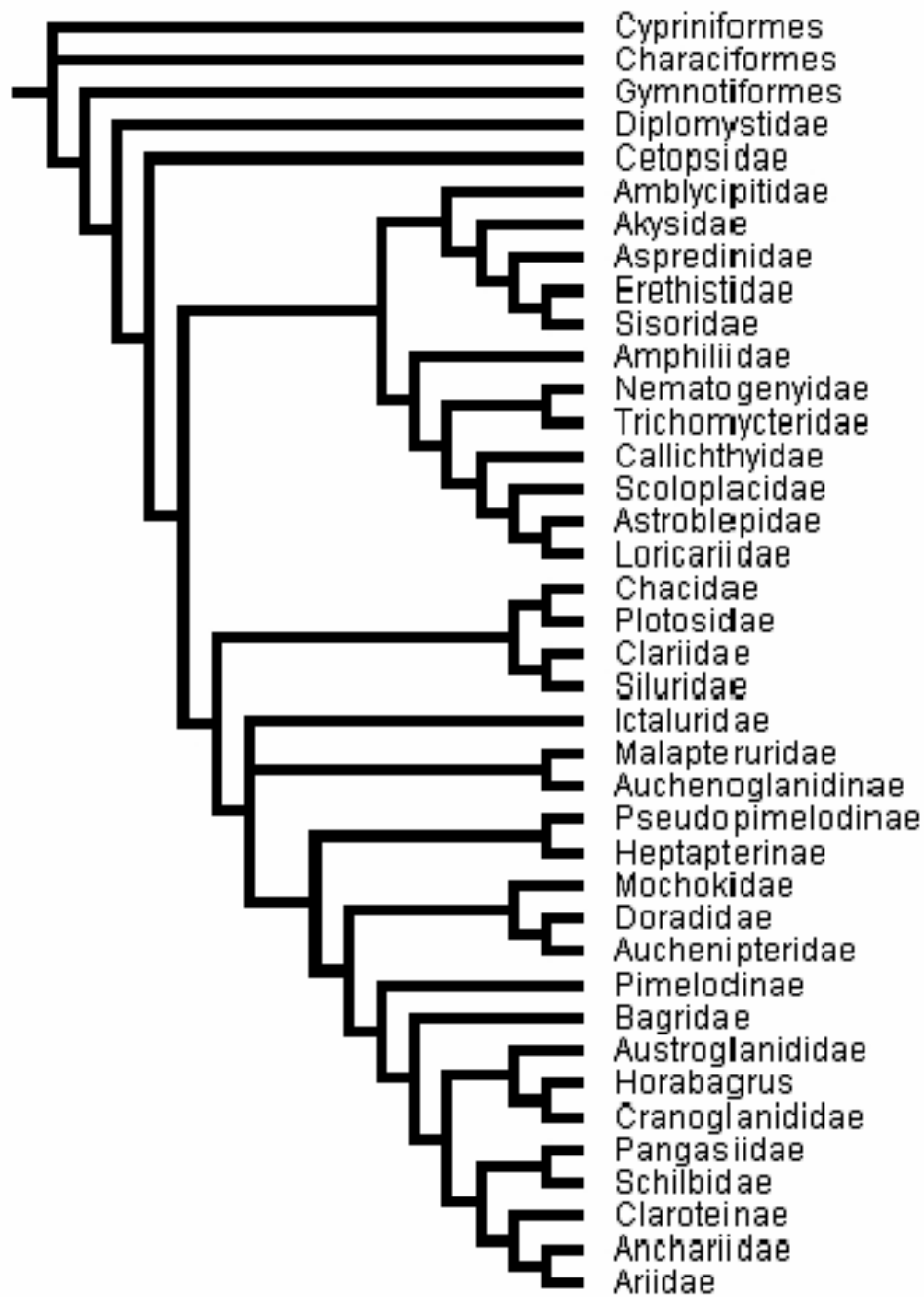


Teugels (1996) e Eschmeyer (1998), 37 segundo Teugels (1996), de Pinna (1998), Diogo (2003) e Reis *et al.* (2003), 35 segundo Nelson (2006) e, mais recentemente, 36 segundo Ferraris (2007).

O número de espécies de Siluriformes neotropicais conhecidas é de 1.648 espécies, compreendidas em 15 famílias (Reis *et al.*, 2003). Estes números ainda devem ser significativamente incrementados devido à contínua descoberta de novos táxons e a um melhor conhecimento das relações filogenéticas entre os grupos. Estudos recentes da sistemática de representantes de todos os principais grupos dessa ordem indicaram que algumas famílias formam agrupamentos polifiléticos, enquanto vários grupos tradicionais tiveram seu monofiletismo confirmado (de Pinna, 1998 e Britto, 2002) (Figuras 1 e 2).



**Figura 1.** Filogenia proposta por de Pinna (1998) para a ordem Siluriformes.



**Figura 2.** Filogenia proposta por Britto (2002) para a ordem Siluriformes.

Dentro da ordem Siluriformes a superfamília Loricarioidea é considerada um grupo monofilético, cujo relacionamento é considerado bem determinado (de Pinna, 1998 e Britto, 2003). Fazem parte da superfamília Loricarioidea as famílias Loricariidae, Astroblepidae, Scoloplacidae, Callichthyidae, Trichomycteridae e Nematogenyidae. Enquanto as famílias Astroblepidae, Scoloplacidae e Nematogenyidae são monotípicas ou formadas por um pequeno número de espécies, as famílias Loricariidae, Callichthyidae e Trichomycteridae apresentam um grande número de espécies e estão divididas em várias subfamílias (Nelson, 2006).

As espécies da superfamília Loricarioidea estão distribuídas na América do Sul e na América Central, ocorrendo numa grande variedade de habitats, incluindo corredeiras em riachos a 3.000 metros de altitude até ambientes lênticos como lagos. A grande maioria das espécies corresponde a peixes primários de água doce, ou seja, não toleram ambientes salobros e marinhos (Nelson, 2006). Apesar dos membros da superfamília Loricarioidea terem ampla distribuição, muitas espécies são caracterizadas por formarem populações restritas a pequenas áreas. Isto provavelmente faz com que esta família apresente uma das maiores diversidade de formas de todos os peixes do mundo.

A família Loricariidae, até recentemente com cerca de 690 espécies, está dividida em oito subfamílias, de acordo com Reis *et al.* (2003), Reis *et al.* (2006) e Chiachio *et al.* (2008): Delturinae, Hypoptomatinae (79 espécies), Loricariinae (209 espécies), Hypostominae (386 espécies), Neoplecostominae (sete espécies), Lithogeneinae (uma espécie) e Otothyriinae.

Armbruster (2004), em um trabalho realizado com base em caracteres de morfologia externa, osteologia e anatomia do trato digestivo da família Loricariidae, com ênfase nas subfamílias Hypostominae e Ancistrinae, apresentou uma nova hipótese de relacionamento para Loricariidae (Figura 4A). Nessa hipótese foi reconhecida a validade da tribo Hypostomini, a subfamília Ancistrinae se tornou uma tribo da subfamília Hypostominae (Ancistrini) e três novas tribos foram criadas: Corymbophanini, Rhineleporini, Pterygoplichthini (Figura 4A). Outras modificações foram sugeridas em Armbruster (2004), como a remoção dos gêneros *Delturus*, *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Pareiorhina* e *Upsilonodus* da subfamília Hypostominae. Os gêneros *Delturus* e *Upsilonodus* formaram uma nova subfamília, não nomeada naquele trabalho, e os gêneros *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys* e *Pareiorhina* foram transferidos para a subfamília

Neoplecostominae. Essas mudanças foram necessárias para o reconhecimento da subfamília Hypostominae como monofilética (Figura 4A). Porém, dentro da tribo Hypostomini alguns problemas ainda persistiram. Assim, para que o gênero *Hypostomus* seja monofilético é necessário reconhecer os gêneros *Aphanotorulus*, *Isorineloricaria* e *Cochliodon* como sinônimos de *Hypostomus* (Figura 4B). Por outro lado, existiram também evidências, sugeridas pelo autor, de que *Aphanotorulus*, *Isorineloricaria*, *H. emarginatus* e *H. squalinus* formem um grupo monofilético (Figura 4B). A correta distribuição de espécies na tribo Hypostomini só seria possível depois de uma análise mais ampla do grupo.

Segundo Armbruster (2004), a subfamília Hypostominae é diagnosticada por uma única característica: o lobo inferior da placa hipural mais longo do que o lobo superior. Outras características consideradas sinapomórficas para Hypostominae são: um longo processo acessório no primeiro ceratobranquial (revertido em alguns grupos), um pequeno canal em uma placa óssea localizada ventralmente ao pré-opérculo, o primeiro espinho dorsal com formato de V e uma ponte posteroventral no basipterígio (Armbruster, 2004).

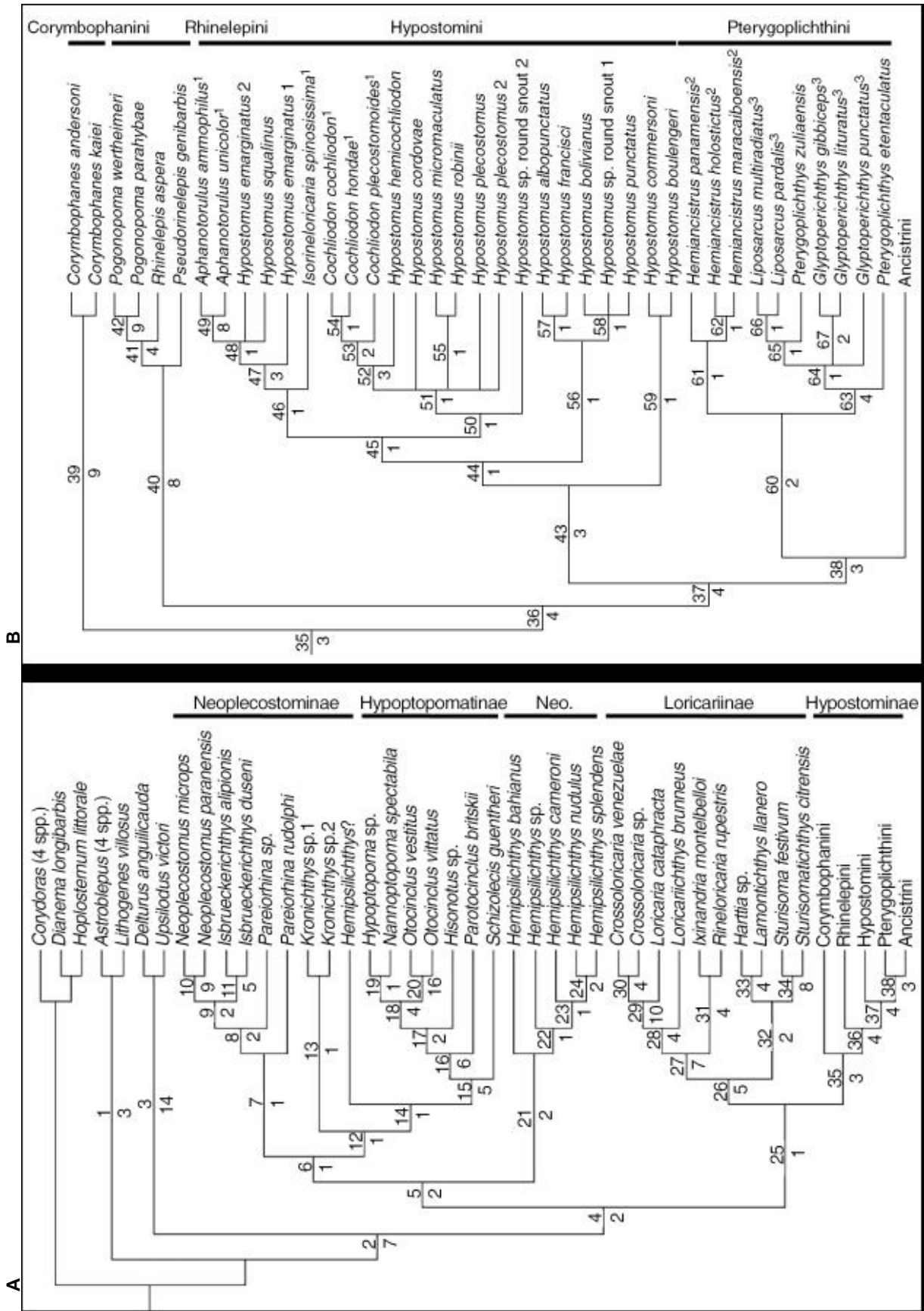
Reis *et al.* (2006) descreveram uma nova subfamília, basal para Loricariidae, nomeada Delturinae, incluindo o gênero *Delturus* como gênero tipo da subfamília. Também foram incluídas *Hemipsilichthys gobio*, *Hemipsilichthys papilatus* e *Hemipsilichthys nimus*, relocando as demais espécies do gênero *Hemipsilichthys* como pertencentes à *Pareiorhaphis*.

Em geral, os Hypostominae são restritos à água doce, exceto *Hypostomus watwata* que vive em estuários e em águas salobras das Guianas. Muitas espécies vivem nos fundos arenosos e rochosos dos rios e, durante o dia, permanecem escondidos em baixo de rochas, folhas ou ramos mortos ou vivos de árvores (Armbruster, 2004). Poucas espécies apresentam algum grau de dimorfismo sexual, como as do gênero *Aphanotorulus* e outros gêneros, onde os machos maduros apresentam mais espinhos pelo corpo e com algumas modificações nos dentes (Armbruster, 2004). Muitas espécies são de tamanho pequeno a médio e os maiores tamanhos são encontrados para *Glyptoperichthys* (50 a 70 cm), *Hypostomus* (4,2 a 70 cm), *Liposarcus* (45 a 50 cm), *Megalancistrus* (38,5 a 60 cm), *Pterygoplichthys* (50 a 70 cm) e *Squaliforma* (10 cm a 46 cm) (Armbruster, 2004). O gênero mais diversificado é *Hypostomus* com 121 espécies válidas (Ferraris, 2007).

O gênero *Hypostomus* é representado por peixes de varias tonalidades de cores que variam desde cores claras ao escuro, podendo ter manchas espalhadas pelo corpo com vários formatos e tonalidades diversas (Armbruster, 2004). O corpo é relativamente pequeno e robusto e a região caudal apresenta pedúnculo caudal não deprimido (Nelson, 2006). Este gênero apresenta distribuição desde a América Central até o sul da América do Sul (Weber, 2003) (Figura 3).



**Figura 3.** Distribuição da família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus* (cor cinza), de acordo com Weber (2003).



**Figura 4.** Filogenias morfológicas para a família Loricariidae (A) e subfamília Hypostominae (B), baseadas em caracteres morfológicos externos, osteológicos e de anatomia de trato digestivo, segundo Armbruster (2004).

## 1.2 Dados Citogenéticos e Moleculares

Os estudos citogenéticos em peixes têm levado à caracterização do número cromossômico e do cariótipo de muitas espécies e levantado uma considerável soma de informações relativas à presença e distribuição da heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos (NORs). Além das técnicas citadas serem fundamentais para a caracterização citogenética básica de qualquer organismo, uma grande parte das informações obtidas através de seu emprego tem sido analisada sob uma abordagem evolutiva. Além disso, nos últimos anos, a citogenética de peixes tem se expandido significativamente, principalmente a partir da aplicação de técnicas de bandeamento que, embora utilizadas como rotina nas pesquisas de citogenética humana e de mamíferos, apresentam dificuldades de adaptação aos cromossomos de peixes. A introdução dessas técnicas, como os bandeamentos C e G, o uso de fluorocromos e a incorporação de análogos de bases do DNA no ciclo celular, ao estudo dos cromossomos dos peixes têm fornecido importantes resultados na comparação entre espécies próximas (Sola *et al.*, 1981 e Almeida-Toledo *et al.*, 1988), na visualização de estados iniciais de diferenciação de cromossomos sexuais (Phillips e Ihssen, 1985) e na identificação do padrão de replicação dos cromossomos (Delany e Bloom, 1984).

Dados sobre o emprego de técnicas de bandeamento cromossômico como a banda G e a banda R, o uso de fluorocromos base-específicos e o uso de endonucleases de restrição são ainda restritos, porém promissores. Aparentemente, os fatores limitantes para o sucesso dessas técnicas são as dificuldades na obtenção de boas preparações cromossômicas, a presença de grande número de cromossomos relativamente pequenos na maioria desses organismos (Gold *et al.*, 1990), e uma reduzida quantidade de DNA nuclear. Além disso, a composição dos cromossomos dos peixes difere, em alguns aspectos, da verificada nos mamíferos, impedindo o sucesso da aplicação dessas técnicas em todas as espécies desse grupo (Oliveira *et al.*, 1999).

Dos primeiros estudos citogenéticos até o presente, foram analisados os cromossomos de cerca de 2.800 espécies de peixes em todo o mundo (Klinkhardt *et al.*, 1995), o que representa algo em torno de 10% das espécies que se supõe existir. Os resultados mostram que o número diplóide varia de  $2n=12$  cromossomos em um Gonostomatidae, *Gonostoma bathyphylum* (Post, 1974 citado em Klinkhardt *et al.*, 1995) a  $2n=446$  cromossomos em um Cyprinidae, *Diptychus dipogon* (Jianxun *et al.*, 1991). Os cromossomos dos peixes apresentam em geral entre 1 e 6  $\mu\text{m}$  de



comprimento total, o que é um tamanho bastante reduzido se comparado aos cromossomos de outros grupos de vertebrados.

O estudo citogenético de peixes neotropicais tem apresentado também uma considerável expansão nos últimos anos. Na primeira revisão sobre os dados citogenéticos de peixes neotropicais feita por Almeida-Toledo (1978), estão incluídos os números haplóides e/ou diplóides de 252 formas de água doce das divisões primárias e secundárias da América do Sul e Central. Em uma revisão feita em 1988 por Oliveira e colaboradores, foram listados os números haplóides e/ou diplóides de 421 espécies, distribuídas em 141 gêneros e 32 famílias. Até o presente, são conhecidos os números diplóides de 921 espécies (113% a mais que em 1988), 252 gêneros (74% a mais que em 1988) e 44 famílias (33% a mais que em 1988) (Oliveira *et al.*, 2006). Os números diplóides variam de  $2n=20$  para *Pterolebias longipinnis* a  $2n=134$  para *Corydoras aeneus*. Há, no entanto, uma grande discrepância quanto à natureza dos dados disponíveis para cada grupo; assim, por exemplo, para o gênero *Hyphessobrycon* são conhecidos os números haplóides e/ou diplóides de 34 espécies, porém apenas quatro tiveram seu cariótipo descrito, enquanto para o gênero *Leporinus* são conhecidos os números haplóides e/ou diplóides de 25 espécies, sendo que apenas para quatro não há dados a respeito da estrutura cariotípica. Cromossomos sexuais são conhecidos para 40 espécies e/ou populações locais, englobando 23 relatos de heterogametia feminina (57,5%) e 17 relatos de heterogametia masculina (42,5%). Cromossomos supranumerários foram encontrados em 29 espécies. É conhecido o conteúdo de DNA nuclear para 106 espécies, sendo que o mesmo varia de  $1,04 \pm 0,09$  pg em *Corydoras cf. simulatus* ( $2n=62$ ) a 248.0 pg/núcleo em *Lepidosiren paradoxa* ( $2n=38$ ) (Carvalho *et al.*, 1998).

Do ponto de vista taxonômico, o estudo citogenético tem-se revelado de grande valia, uma vez que diversos grupos, identificados apenas com base em estudos morfológicos mostram-se formados por diversas unidades, possivelmente isoladas geneticamente. Como exemplo, pode-se citar as espécies identificadas como *Gymnotus carapo*, onde em cinco amostras estudadas encontrou-se uma variação no número diplóide de  $2n=42$  e  $2n=48$  na bacia Amazônica,  $2n=52$  e  $2n=54$  na bacia do Alto rio Paraná e  $2n=54$  na bacia do Leste (Foresti *et al.*, 1984). O outro estudo desenvolvido em 11 populações nos Estados de São Paulo e Paraná mostrou a presença de cinco citótipos com uma variação no número diplóide de  $2n=40$  a  $2n=54$  (Fernandes-Matioli, 1996). Uma grande variação cariotípica foi encontrada também em *Hoplerythrinus*

*unitaeniatus* (Giuliano-Caetano, 1986), onde exemplares coletados no rio Negro (Manaus, AM) apresentavam  $2n=48$  e exemplares do vale do rio Doce (MG) e lagoa Juturnaíba (RJ) apresentavam  $2n=52$  (NF=96) e  $2n=52$  (NF=95), respectivamente. Esses resultados sugerem que em *H. unitaeniatus*, uma espécie que apresenta ampla distribuição geográfica, um grau de diferenciação subespecífica ou mesmo específica já teria ocorrido, o que estaria refletido nas variações cromossômicas observadas, de tal forma que o gênero *Hoplerythrinus* não seria monotípico como correntemente se admite do ponto de vista morfológico (Giuliano-Caetano, 1986).

Análises citogenéticas de espécies que se encontram isoladas em pequenas populações, como *Astyanax scabripinnis*, tem demonstrado que quase todas poderiam ser identificadas pelas suas características cariotípicas, mas não diferenciadas por caracteres morfológicos (Moreira-Filho e Bertollo, 1991, Maistro *et al.*, 1998 e Vicari *et al.*, 2008). Em outro exemplo é com a espécie *Hoplias malabaricus* que se constitui também num complexo de espécies, que podem ser diferenciadas através dos estudos citogenéticos (Bertollo *et al.*, 2000 e Vicari *et al.*, 2006).

Embora a família Loricariidae seja considerada uma das maiores famílias de peixes do mundo, o número de espécies cariotipadas é muito reduzido. Dentre as espécies desta família, existe uma grande diversificação do número diplóide, de  $2n=36$  em *Rineloricaria latirostris* (Giuliano-Caetano 1998) a  $2n=84$  em *Hypostomus* sp. (Cereali *et al.*, 2008).

Citogeneticamente, a subfamília Hypostominae é a mais bem estudada da família Loricariidae, mas é a mais complexa, apresentando variação do número diplóide de  $2n=38$  em *Ancistrus* sp. (Alves *et al.*, 2003) a  $2n=84$  em *Hypostomus* sp. (Cereali *et al.*, 2008). Uma característica muito interessante em Hypostominae (particularmente entre os Hypostomini) é a relação inversa entre o número diplóide e o número de cromossomos com dois braços, sugerindo a ocorrência de muitos eventos de fusão/fissão cêntrica na evolução do grupo (Artoni e Bertollo, 2001).

Com relação à análise molecular, recentemente vários grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para o uso de seqüências de DNA para elucidação das relações filogenéticas entre grupos de organismos. Ainda que, até o momento o número de estudos de seqüências de DNA realizados em peixes seja bastante pequeno em relação à extensão do grupo, os resultados já obtidos são bastante promissores (Kocher *et al.*, 1989, Stock *et al.*, 1991, Kocher e Stepien, 1997, Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004, Calcagnotto *et al.*, 2005, Mendel *et al.*, 2008 e Rastorguev *et al.*, 2008). Assim, no

conjunto de trabalhos publicados por Kocher e Stepien (1997) pode-se observar o amplo e versátil emprego das análises moleculares na elaboração de hipóteses de relacionamento em diversos níveis taxonômicos, variando de populações locais até o grupo dos peixes como um todo.

O genoma animal está distribuído em dois compartimentos celulares: o núcleo e as mitocôndrias. O genoma nuclear apresenta uma extrema complexidade organizacional e um tamanho da ordem de bilhões de pares de bases nitrogenadas, enquanto o genoma mitocondrial apresenta alguns poucos genes codificados por algumas dezenas de pares de bases.

Em linhas gerais, o genoma nuclear dos vertebrados pode ser dividido em cinco classes (Wagner *et al.*, 1993). Na classe I está a porção única do genoma que representa os genes do tipo “estrutural”, ou seja, aqueles que codificam os polipeptídeos. Nos organismos diplóides há, portanto duas cópias para cada um desses genes. Na classe II, estão os segmentos que são transcritos para RNA, como a parte dos genes correspondente aos íntrons e as outras formas de RNA (excluindo os RNAs mensageiros) que funcionam na síntese de proteínas (tRNA e rRNA) e em certos aspectos da regulação celular. Na classe III estão os segmentos que não são transcritos, mas são identificados como correspondendo à parte adjacente dos genes da classe I, responsáveis pela regulação de sua transcrição. Os elementos da classe IV correspondem às seqüências de cópia simples dispersas no genoma sem função conhecida. Na classe V, estão os DNAs repetitivos arranjados em cadeia, compostos pelo DNA satélite (altamente repetitivo), minissatélites e microsatélites (moderadamente repetitivo) e as seqüências repetitivas dispersas compostas por transposons e retrotransposons (moderadamente repetitivos). O uso de genes nucleares na elaboração de filogenias é bastante útil quando o tempo de divergência dos grupos é elevado, uma vez que esses genes evoluem muito mais lentamente do que os genes mitocondriais (Stepien *et al.*, 1997, Kocher e Stepien, 1997 e Ortí, 1997).

O número de estudos publicados que usam genes nucleares em estudos filogenéticos é maior em relação ao número daqueles que utilizam genes mitocondriais. Diversos trabalhos foram publicados mostrando a utilidade desses genes nucleares em estudos de diversos grupos de vertebrados, como em peixes (Ortí e Meyer, 1996, Ortí, e Meyer, 1997, Lovejoy e Collete, 2001, Lavoué *et al.*, 2003, Calcagnotto *et al.*, 2005 e Mendel *et al.*, 2008), répteis (Slowinski e Lawson, 2002), aves (Chubb, 2004) e mamíferos (Misawa e Janke, 2003, Teeling *et al.*, 2003 e Delsuc *et al.*, 2003). No

estudo de Lavoué *et al.* (2003), uma filogenia para os peixes elétricos da superfamília Mormyroidea foi construída com base em dados dos genes nucleares Rag2 e S7 e dos genes mitocondriais Citocromo *b*, 12S e 16S rRNA. Os resultados obtidos foram bastante resolutivos na determinação dos padrões de relacionamento dentro da superfamília e foram bastante úteis na interpretação da evolução do sistema de eletrócitos nesses animais. Os autores concluem que os genes utilizados por eles podem ser bastante úteis em estudos sistemáticos no nível de subfamília em peixes teleosteos.

Entre os genes mais comumente utilizados em estudos sistemáticos estão os genes mitocondriais. O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados até 570 kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). Estudos extensivos realizados com o genoma mitocondrial humano mostraram que o mesmo é constituído por 16.569 pares de base, sendo que nesse genoma encontram-se os genes 12S e 16S do rRNA, 22 genes de tRNA, as subunidades I, II e III do Citocromo *c*, a subunidade seis da ATPase, o Citocromo *b* e genes para seis subunidades da NADH. Essa mesma constituição foi também encontrada em outros mamíferos, em *Xenopus laevis* (Lewin, 1994) e em várias espécies de peixes (Zardoya e Meyer, 1997 e Inoue *et al.*, 2001).

O interesse no estudo do mtDNA está baseado no fato de que esse genoma apresenta uma série de particularidades importantes como sua herança exclusivamente materna e sua presença nos organismos em número haplóide, o que impede (ou torna muito raros) os eventos de recombinação. Além disso, considerando que as condições nas organelas são diferentes daquelas encontradas no núcleo das células, as taxas de evolução dos genes em cada compartimento celular são independentes. Por exemplo, a taxa em que o mtDNA humano acumula mutações foi estimada em 2-4% por milhão de anos, o que representa uma taxa mais que dez vezes superior àquela observada para a globina, um gene nuclear (Lewin, 1994).

A possibilidade de utilização de seqüências de mtDNA para construção de filogenias torna possível não só uma melhor interpretação da história evolutiva das espécies em si, como também permite a análise simultânea dos padrões evolutivos seguidos por outros caracteres. Um exemplo desse tipo de utilização de dados de mtDNA está no trabalho de Alves-Gomes *et al.* (1995), onde a filogenia dos peixes da ordem Gymnotiformes foi reconstruída, tendo como base dados de mtDNA (parte das subunidades 12S e 16S do rRNA), assim como dados de morfologia e eletrofisiologia.

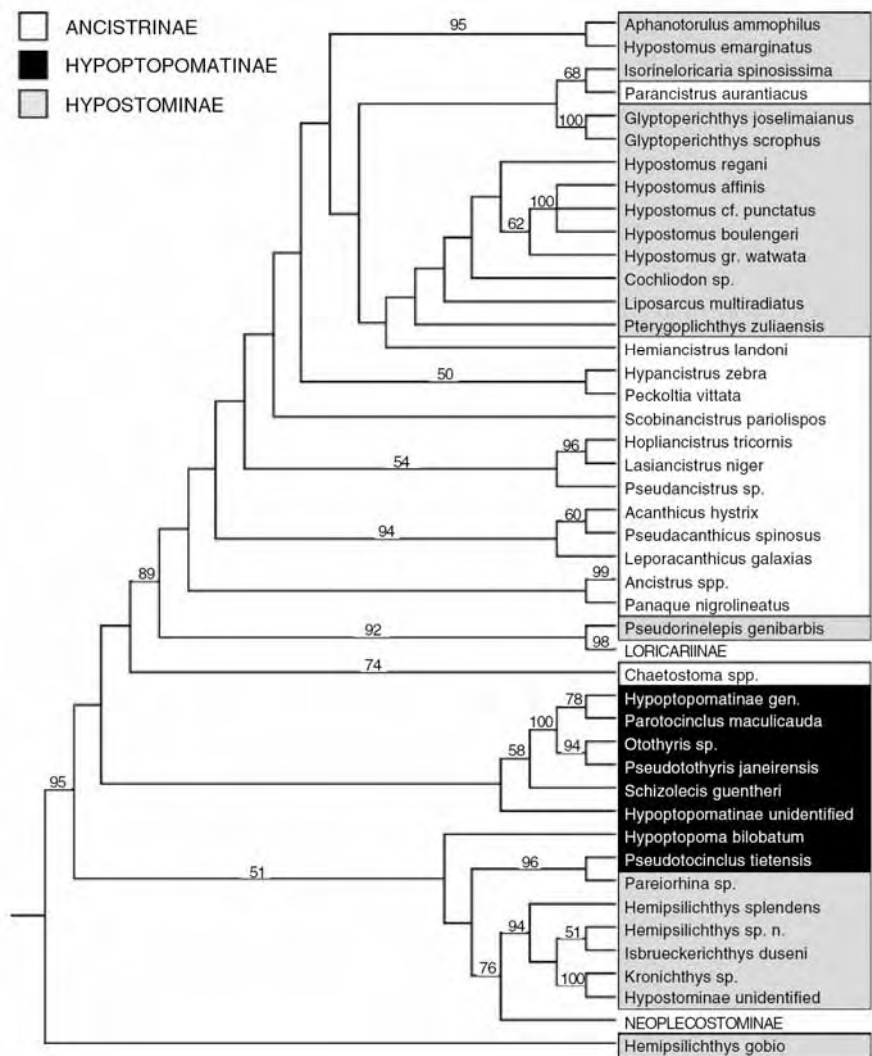
No trabalho citado, os dados moleculares serviram para elaboração de uma nova hipótese filogenética, que se mostrou mais congruente com a possível evolução morfológica e fisiológica dos peixes desse grupo, permitindo inclusive aos autores a proposição da criação de uma nova família para essa ordem. Também Murphy e Collier (1997) apresentaram uma filogenia, com base em fragmentos do gene Citocromo *b*, e dos genes para 12S rRNA e 16S rRNA, para as famílias Aplocheilidae (África) e Rivulidae (América do Sul), que compreende várias espécies conhecidas como “peixes anuais”. A distribuição de espécies anuais nessa filogenia sugere que o anualismo surgiu no início da diferenciação desse grupo e parece ter sido perdido várias vezes nos gêneros que atualmente habitam ambientes aquáticos permanentes (Murphy e Collier, 1997).

Uma possibilidade bastante interessante de utilização dos dados moleculares está na determinação da data de ocorrência de eventos de cladogênese. O conceito de "relógio molecular" estabelece que a taxa de substituição de aminoácidos ou nucleotídeos é suficientemente constante (dentro dos limites de cada gene e taxa) para ser utilizada na predição do tempo de divergência dos taxa (Hillis *et al.*, 1996). Ainda que haja muita controvérsia na literatura sobre o uso da hipótese do relógio molecular, seu uso tem sido feito para muitos grupos com relativo sucesso (ver referências em Hillis *et al.*, 1996 e Nei e Kumar, 2000). Várias opções de testes estatísticos estão disponíveis para se proceder a análise sobre as hipóteses de relógio molecular tornando seu uso bastante factível (Nei e Kumar, 2000). Entre esses, uma opção interessante é o uso de "árvores linearizadas", que são aquelas nas quais os elementos com taxas de evolução muito divergentes (altas ou baixas) são eliminados no cálculo do tempo de divergência (Nei e Kumar, 2000).

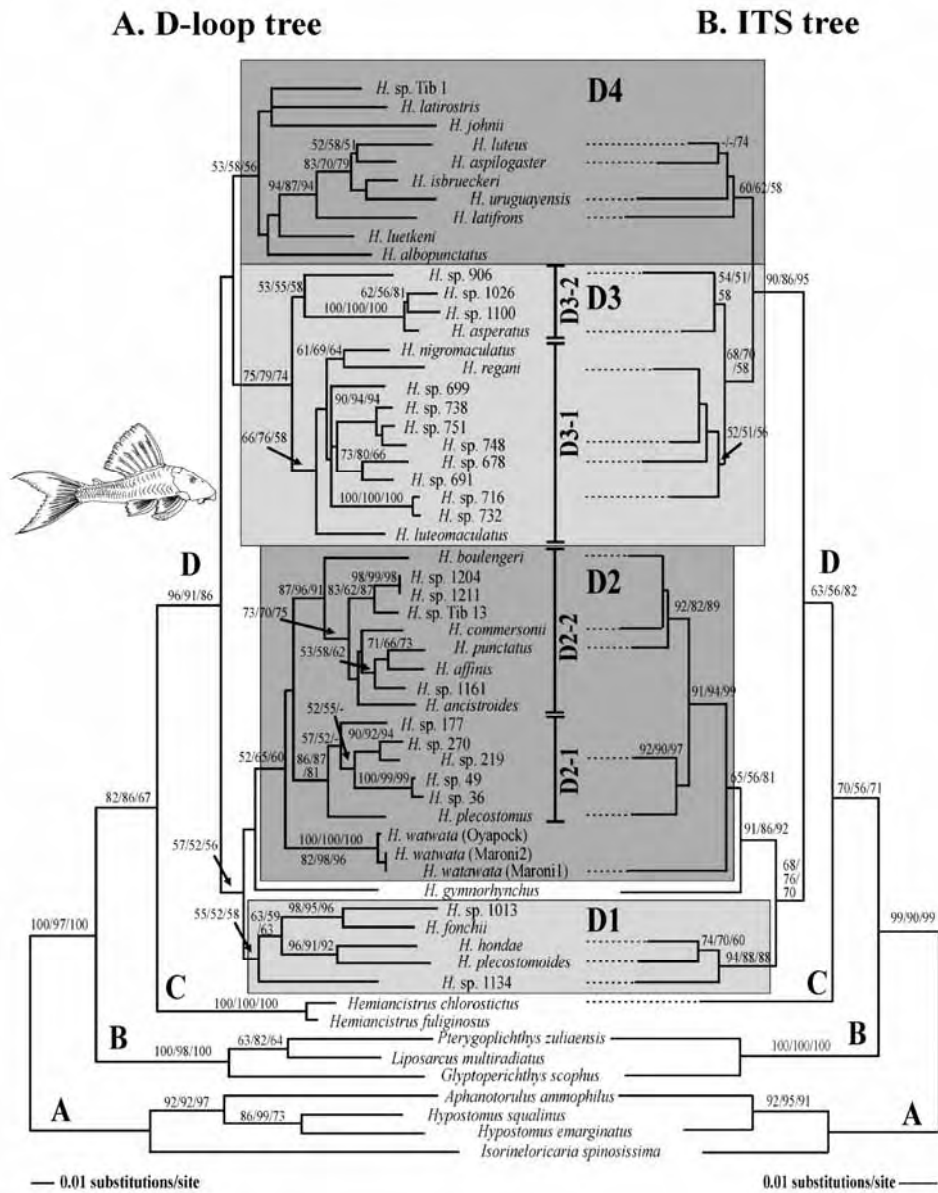
Um estudo realizado com peixes da subordem Blennioidei, empregando os métodos de análise de relógio molecular, usando uma calibração de 1% de divergência por milhão de anos, mostrou que a diferenciação de muitas famílias ocorreu de forma relativamente rápida, possivelmente durante o início do Mioceno (22 a 27 milhões de anos atrás) e a radiação ao nível de subfamília ocorreu durante o meio do Mioceno (13,5 a 21 milhões de anos atrás) (Stephien *et al.*, 1997). Esses dados são consistentes com os fósseis disponíveis do Mioceno e, segundo os autores, essa rápida evolução poderia estar relacionada com um aquecimento dos trópicos ocorrido no Mioceno, que poderia ter levado aos eventos vicariantes, separando formas com distribuição ampla e promovendo especiação.

Montoya-Burgos *et al.* (1998) elaboraram uma filogenia molecular para cerca de 50 espécies da família Loricariidae, utilizando segmentos de genes 12S e 16S do rRNA mitocondrial. Os resultados mostraram que a família Loricariidae é monofilética, porém a subfamília Hypostominae e o gênero *Hypostomus* formaram grupos polifiléticos (Figura 5). Num trabalho mais recente, Montoya-Burgos (2003) elaborou uma filogenia molecular para o gênero *Hypostomus* baseada em seqüências do gene D-loop do DNA mitocondrial e de regiões espaçadoras transcritas internas dos genes ribossomais principais (ITS), corroborando a hipótese de que *Hypostomus* não forma uma unidade monofilética, uma vez que as espécies *H. emarginatus* e *H. squalinus* teriam maior relação com espécies de outros gêneros de Hypostominae. As demais espécies de *Hypostomus* analisadas por Montoya-Burgos (2003), formam um clado monofilético, dividido em dois grandes grupos monofiléticos bem suportados (D1/D2 e D3/D4) (Figura 6).

Os trabalhos de sistemática morfológica (Muller e Weber, 1992 e Armbruster, 2004); de sistemática molecular (Montoya-Burgos *et al.*, 1997, 1998, 2002 e Montoya-Burgos, 2003); de citogenética (Michele *et al.*, 1977, Artoni e Bertollo, 1996, 1999, 2001, Artoni *et al.*, 1998, Kavalco *et al.*, 2004, 2005, Alves *et al.*, 2006, Cereali *et al.*, 2008 e Rubert *et al.*, 2008); e de análise de aloenzimas (Zawadzki *et al.*, 1999, 2001, 2002, 2004, 2005, 2008b, 2008c, Paiva *et al.*, 2005 e Renesto *et al.*, 2007,) realizados com representantes do gênero *Hypostomus* mostram que há uma urgente necessidade de realização de um trabalho extensivo, envolvendo um número significativo de espécies e um conjunto amplo de dados para se chegar a uma melhor caracterização do gênero *Hypostomus*. Assim, o presente trabalho se justifica pela proposição da realização de um trabalho extensivo e intensivo com espécies de *Hypostomus*, com a realização de análises Citogenéticas e de Genética Molecular. A elucidação das relações entre as espécies de *Hypostomus* representará uma contribuição fundamental para o conhecimento do grupo, sua caracterização e o entendimento de sua história evolutiva.



**Figura 5.** Filogenia molecular baseada em seqüências de DNA mitocondrial dos genes 12S e 16S rRNA, proposta por Montoya-Burgos (1998) para a família Loricariidae.



**Figura 6.** Filogenia molecular baseada em seqüências de DNA mitocondrial dos genes D-loop e ITS, proposta por Montoya-Burgos (2003) para o gênero *Hypostomus*.





## ***OBJETIVOS***

## 2 OBJETIVOS

A presente proposta de trabalho teve por objetivos principais testar o monofiletismo do gênero *Hypostomus* dentro da subfamília Hypostominae e procurar ampliar o conhecimento sobre a diversidade e os padrões de relacionamento das espécies do gênero *Hypostomus*. Como objetivos específicos foram propostos:

1- Realizar a análise cariotípica do maior número possível de espécies do gênero *Hypostomus* para as bacias dos rios da Costa Oriental, Mogi-Guaçu, Paraná, Paranapanema e Tietê com a finalidade de caracterizar as espécies e elaborar um modelo para explicar a evolução cariotípica do grupo e as relações entre seus componentes.

2- Sequenciar segmentos do genoma mitocondrial e nuclear do maior número possível de espécies do gênero *Hypostomus* e de gêneros relacionados de Hypostominae, com o propósito de construir uma árvore filogenética robusta para as espécies analisadas.



## ***MATERIAL E MÉTODOS***



***MATERIAIS***

## **3.1 MATERIAIS**

### **3.1.1 Citogenética**

Oito espécies do gênero *Hypostomus* foram coletadas das bacias dos rios da Costa Oriental, Mogi-Guaçu, Paraná, Paranapanema e Tietê (Ver Tabela 1, Capítulo 1) e mantidos vivos até a realização das análises citogenéticas. Posteriormente foram processados e analisados com as técnicas de citogenética. Os exemplares coletados foram inicialmente fixados em formol 10% e estão conservados em álcool 70% para realização de estudos taxonômicos futuros. Os exemplares preservados foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu.

### **3.1.2 Molecular**

Para as análises moleculares referentes ao capítulo 1, foram obtidas amostras de tecido do fígado, músculo e sangue de 14 representantes com um total de quatro espécies do gênero *Hypostomus*, para as espécies de *H. ancistroides* com sete populações, *H. strigaticeps* com três populações e *H. cf. strigaticeps* com uma população e enraizadas as hipóteses com as espécies de *H. affinis* e *H. regani* (Ver Tabela 3, Capítulo 1). Para o capítulo 2, foram obtidas amostras de tecido do fígado, músculo e sangue de 61 representantes do gênero *Hypostomus* num total de 36 espécies e representantes da subfamília Hypostominae, Ancistrini com quatro espécies, *Aphanotorulus unicolor*, Pterygoplichtini com três espécies e Neoplecostominae com duas espécies (Ver Tabela 3, Capítulo 2). Os tecidos foram preservados em etanol 95% com 0,5 µM de EDTA. Os exemplares coletados foram fixados em formol 10% e estão conservados em álcool 70% para realização de estudos taxonômicos futuros. Os exemplares preservados foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu e na coleção de peixes do Nupélia da Universidade Estadual de Maringá, Paraná.



***MÉTODOS***

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Métodos Citogenéticos**

#### **3.2.1.1 Estimulação de Mitoses**

Para obtenção de um maior número de mitoses, foi utilizada uma técnica de estimulação celular através da injeção de uma solução de fermento biológico, descrita inicialmente por Cole e Levans (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por Lee e Elder (1980) para pequenos mamíferos e por Oliveira *et al.* (1988) com modificações para peixes e consiste em:

1. Preparar uma solução de fermento biológico (*Fleischmann*) a 0,0714 M na seguinte proporção: 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada.
2. Incubar a solução em banho-maria (37°C) por cerca de 10 minutos.
3. Injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal.
4. Deixar o animal em aquário bem aerado por 24 a 48 horas.

#### **3.2.1.2 Obtenção de Cromossomos Mitóticos**

A técnica utilizada para a obtenção de metáfases mitóticas foi a descrita por Foresti *et al.* (1981) adaptada que consiste em:

1. Injetar, intraperitonealmente, uma solução de colchicina 0,05% na proporção de 1ml para cada 100 g de peso do animal. Deixá-lo nadando livremente por 50 minutos.
2. Sacrificar o animal, retirando rins e brânquias.
3. Colocar os tecidos retirados em placa de Petri contendo cerca de 6 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M).
4. Dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células. Para tal, primeiro deve-se dissociar o material com pinças de ponta fina e, depois, homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur.
5. Retirar a suspensão celular da placa de Petri e colocá-la em um tubo de

- centrífuga. Deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por 20 minutos.
6. Retirar a suspensão celular da estufa, colocar 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Agitar levemente a mistura com pipeta Pasteur. Deixar em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente.
  7. Adicionar cerca de 7 ml de fixador novamente agitar a mistura com pipeta Pasteur. Levar à centrífuga (1000 ± 100 rpm) por 10 minutos.
  8. Retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador e agitar a mistura com pipeta Pasteur. Centrifugar por 7 minutos a 1000 ± 100 rpm.
  9. Repetir o item 8 por duas ou três vezes.
  10. Pingar duas ou três gotas de material em lâminas limpas e secas.

### **3.2.1.3 Coloração com Giemsa**

No procedimento de coloração com o corante Giemsa, foram observados os seguintes passos:

1. Hidrolizar o material em HCl 1 N a 60°C por cerca de 3 minutos, quando necessário.
2. Corar a lâmina com material em uma solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH=6,8) por cerca de 10 minutos.

### **3.2.1.4 Localização das Regiões Organizadoras do Nucléolo (Ag-NORs)**

O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howel e Black (1981).

São utilizadas duas soluções:

- Solução A: solução coloidal reveladora (2%): 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água deionizada. Acrescenta-se 0,5 ml de ácido fórmico.
- Solução B: solução de Nitrato de Prata (50%): 1 g de AgNO<sub>3</sub> dissolvida em 2 ml de água deionizada.

Essas soluções, depois de preparadas, devem ser mantidas em frascos escuros, a



4°C.

O procedimento para a coloração das NORs foi o seguinte:

1. Hidrolizar o material por 3 minutos em HCl 1 N a 60°C.
2. Secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina; cobrir com lamínula.
3. Deixar as lâminas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos (aproximadamente 3 minutos) a mistura das soluções se torna marrom dourada. Lava-se a lâmina em água deionizada e deixa-se secar.
4. Corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,8) por 30 segundos.

### **3.2.2 Estudos Cariotípicos**

Após a análise e contagem dos cromossomos em cerca de 30 metáfases mitóticas, foi estabelecido o número modal para os exemplares desta população.

As melhores metáfases, ou seja, as que apresentaram maior dispersão e cromossomos com morfologia mais nítida, foram fotografadas em Fotomicroscópio Digital *Olympus BX61*, acoplado ao programa Image-Pro MC 6.0 (Windows) com objetiva de imersão. As imagens eram salvas no formato *TIF* e trabalhadas no programa Adobe Photoshop (Windows).

### **3.2.3 Medidas Cromossômicas**

Os cromossomos tiveram sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB), segundo as proporções propostas por Levan *et al.* (1964), e foram classificados em: metacêntricos (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntricos (RB de 1,71 a 3,00), subtelocêntricos (RB de 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB maior que 7,00).

### **3.2.4 Montagem dos Cariótipos**

Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), os cromossomos foram arranjados segundo o tipo (M, SM, ST e A) e em ordem

decrecente de tamanho, todo o processo realizado no programa Adobe Photoshop (Windows).

### **3.2.5 Métodos Moleculares**

#### **3.2.5.1 Isolamento de DNA Genômico**

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de tecido como brânquias, fígado, músculo e sangue preservados em etanol, utilizando-se a metodologia descrita abaixo.

##### **3.2.5.1.1 Extração com Kit da Wizard Genomic DNA Purification (Promega)**

1. Utilizar entre 10-20 mg (0,01 a 0,02 g) de tecido e macerar em um tubo com 600 µl de “Nuclei Lysis Solution” com o auxílio de um pequeno homogeneizador.
2. Incubar a 65°C durante 30 minutos agitando o tubo por inversão, periodicamente.
3. Adicionar 3 µl de “Rnase Solution” ao material lisado e agitar o tubo várias vezes.
4. Incubar a mistura durante 30 minutos a 37°C.
5. Adicionar 200 µl de “Protein Precipitation Solution” e misturar vigorosamente utilizando um vórtex em alta velocidade.
6. Centrifugar por 3 minutos a 16.000 rpm.
7. Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo de 1,5 ml contendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
8. Inverter o tubo cuidadosamente algumas vezes até visualizar o DNA como uma “nuvem”.
9. Centrifugar por 1 minuto a 16.000 rpm a temperatura ambiente.
10. Descartar o sobrenadante.
11. Adicionar 600 µl de etanol a 70% a temperatura ambiente e agitar o tubo para lavar o DNA.
12. Centrifugar por 1 minuto a 16.000 rpm a temperatura ambiente.
13. Remover o etanol e deixar o DNA secar.

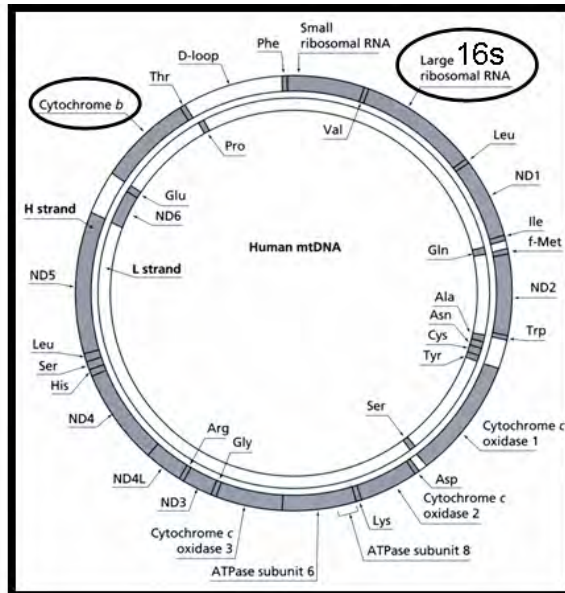
14. Adicionar de 100 a 150 µl de “DNA Rehydration Solution” para hidratar o *pellet*.

### 3.2.5.2 Amplificação Gênica

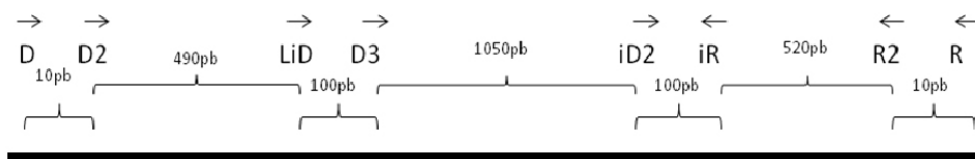
Para amplificar as regiões do DNA mitocondrial e nuclear estudadas, foram realizadas reações de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) com um volume final de 25,0 µl, contendo: 16,5 µl de água destilada estéril, 2,5 µl de dNTP (8 mM), 2,5 µl de 10X “PCR Buffer” (Biotools), 1,2 µl de cada *primer* (10 µM), 0,1 µl de DNA Polimerase (1 unidade) (Biotools DNA Polymerase) e 1,0 µl de DNA molde (cerca de 200 ng), que posteriormente foram homogeneizadas numa solução com volume final de 25,0 µl após a reação de PCR.

Os *primers* utilizados para o gene mitocondrial 16S rRNA (Figura 7) foram 16S F: 5' - ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT - 3', 16S R: 5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T -3' (Dr. Claudio de Oliveira comunicação pessoal e Shimabukuro-Dias, 2004) e para a o gene mitocondrial Citocromo *b* (Figura 7) foram L14841: 5'- CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3' e H15915 B: 5'- AAC CTC CGA TCT TCG GAT TAC AAG AC -3' (Dr. Claudio de Oliveira comunicação pessoal e Calcagnotto *et al.*, 2005).

Os *primers* utilizados para o gene nuclear F-Reticulon 4 (Figura 8) foram: F-reticul4-D: 5' – AGG CTA ACT CGC TYT SGG CT – 3', F-reticul4-R: 5' – GGC AVA GRG GRG GCR AAR TCC ATC – 5', F-Reticulon4-D3: 5' – ACA KTG GCA AGG AAA ACT CC – 3' e F-reticul4-iR: 5' – AGG CTC TGC AGT TTC TCT AG – 3' (Dr. Juan Montoya-Burgos comunicação pessoal e Chiachio *et al.*, 2008).



**Figura 7.** Representação do DNA mitocondrial, mostrando principalmente os genes Citocromo *b* e 16S rRNA com a região de anelamento dos *primers* que foram utilizados para amplificação e posterior seqüenciamento desse gene.



**Figura 8.** Representação do gene F-Reticulon 4, com a região de anelamento dos *primers* que foram utilizados para amplificação e posterior seqüenciamento desse gene. (*Primers* Diretos: D e D3 e *Primers* Reversos: R e iR).

Os genes 16S rRNA e Citocromo *b* foram amplificados de acordo com as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos com os seguintes passos: a 96°C por 45 segundos, 50°C por 1 minuto para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos, estendendo a cadeia e para finalizar um

ciclo a 72°C por 5 minutos. Para a reação de amplificação do gene nuclear F-Reticulon 4, são necessárias duas etapas de amplificação, pois o fragmento do gene que interessava era a região entre os *primers* F-Reticulon4-D3 e F-Reticulon4-iR (Dr. Juan Montoya-Burgos comunicação pessoal e Chiachio *et al.*, 2008) (Figura 8), usou-se numa primeira etapa de amplificação os *primers* F-reticul4-D e F-reticul4-R (Figura 8), que corresponderiam ao gene F-Reticulon 4 completo (aproximadamente 2.000 pb): um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos com os seguintes passos: a 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos e 15 segundos, estendendo a cadeia e para finalizar um ciclo a 72°C por 5 minutos. Numa segunda etapa utilizou-se um 1,0 µl do produto de PCR da primeira etapa em uma nova reação para amplificar um segmento de cerca de 700 pares de base (pb) do gene F-Reticulon 4 utilizando os *primers* F-Reticulon4-D3 e F-Reticulon4-iR: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos com os seguintes passos: a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos e 15 segundos, estendo a cadeia e para finalizar um ciclo a 72°C por 5 minutos. Essas reações de PCR foram realizadas em um termociclador MJ Research, INC, modelo PTC-100™ Programmable Thermal Controller.

Os produtos foram aplicados em um gel de agarose 1,0%, corados com brometo de etídio e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta, verificando a qualidade e tamanho dos fragmentos amplificados.

### 3.2.5.3 Purificação do DNA amplificado

Após checagem da amplificação, o produto de PCR (Mitocondrial e Nuclear) passou por reação de limpeza com o uso da enzima ExoSap-IT® (Exonuclease I: Recombinant SAP: *Pandalus borealis* - USB Corporation) seguindo o seguinte procedimento:

Em um tubo de 1,5 µl (*ependorf*) prepara-se uma reação contendo 5,0 µl do DNA amplificado juntamente com 2,0 µl da enzima ExoSap-IT® e leva-se para o termociclador para a realização do seguinte programa: um ciclo inicial de 37°C por 1 hora e um final de 80°C por 15 minutos.

#### 3.2.5.4 Quantificação de DNA para Reação de Seqüenciamento

A quantificação das bandas de DNA foi realizada através de fotografias do gel de agarose em sistema da empresa KODAK Digital Science DS, acoplada a um transiluminador de luz U.V. As bandas de DNA referentes à amplificação do segmento do gene de interesse foram identificadas e quantificadas pelo programa da Kodak “Electrophoresis Documentation and Analysis System 120”. Com base nestes dados foi possível determinar a quantidade de DNA para a reação de seqüenciamento.

#### 3.2.5.5 Reação de PCR de Seqüenciamento de DNA

Para a reação de PCR foi utilizado o Kit “Big Dye<sup>TM</sup> Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). O procedimento utilizado foi o seguinte:

Para amplificar e marcar com fluorocromos os genes mitocondriais e nucleares estudados foram realizadas reações de PCR com um volume final de 7,0 µl, contendo: 3,75 a 1,75 µl de água destilada estéril, 1,05 µl de 5X “PCR Buffer” (Biotools), 0,7 µl de cada *primer* (5 mM) e 1,40 a 2,80 µl de DNA molde (cerca de 200 ng), que posteriormente foram homogeneizadas duas soluções (uma para cada *primer*) com volume final de 7,0 µl após a reação de PCR.

A reação seguiu as seguintes condições gerais: um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos com os seguintes passos: a 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos para anelamento dos *primers* e 60°C por 4 minutos, estendendo a cadeia. A reação de PCR foi realizada em um termociclador MJ Research, INC, modelo PTC-100<sup>TM</sup> Programmable Thermal Controller.

#### 3.2.5.6 Reação de Limpeza do PCR de Seqüenciamento

Após o final da incorporação dos dideoxinucleotídeos, procedeu-se à reação de retirada do resto dos reagentes da reação de PCR, incluindo os dideoxinucleotídeos não incorporados no DNA das amostras de interesse, seguindo o procedimento abaixo:

1. Foram adicionados 0,7 µl de acetato de sódio (3 M) e 0,7 µl de EDTA (125 mM)

nos tubos contendo o produto do PCR.

2. Logo depois foi adicionado 17,5 µl de etanol 100%.
3. Misturando no vórtex brevemente com cuidado.
4. Incubando a temperatura ambiente no escuro por 15 minutos.
5. Centrifugando por 15 minutos a 13.000 rpm (10°C).
6. Descartando o sobrenadante invertendo o tubo em papel toalha.
7. Adicionando 24,5 µl de etanol de 70%.
8. Centrifugando por 10 minutos a 13.000 rpm (10°C).
9. Descartando o sobrenadante e invertendo o tubo em papel toalha.
10. Repetindo os passos 6 a 9.
11. Secando logo depois num termociclador por 2 minutos a 96°C sem tampa.
12. Guardando o material abaixo de 0°C e protegido da luz.

Observação: Antes da aplicação das amostras para corrida o DNA foi dissolvido em uma solução contendo formamida (Colocando 15 µl em cada tubo).

### **3.2.5.7 Seqüenciamento**

As seqüências dos genes mitocondriais e nucleares foram obtidas através da técnica de seqüenciamento por capilaridade, em aparelho modelo *Applied Biosystem* 3130, com 4 capilares de 80 cm, realizadas no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes – UNESP – IB/Botucatu – SP. Todas as seqüências foram lidas pelo menos uma vez (*forward e reverse*) para cada gene.

### **3.2.5.8 Alinhamento e análise filogenética**

Após o seqüenciamento das amostras e suas réplicas, as seqüências obtidas foram abertas nos programas dos softwares ATGC (Genetix Inc.) e BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999) e por comparação foi estabelecida uma seqüência consenso do gene para cada indivíduo. Tais seqüências foram então passadas para um editor de texto, nomeadas separadamente e salvas em um único arquivo em formato de texto (extensão .txt).

Com base nestas seqüências foram retirados os *stop codons* para o gene Citocromo *b* e F-Reticulon 4, através dos programas dos softwares Sequin application Version 9.00 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999).

As seqüência parcial do gene mitocondrial 16S rRNA e a seqüência completa do gene Citocromo *b* e a seqüência parcial nuclear do gene F-Reticulon-4 foram alinhadas com o software Muscle (Multiple Sequence Comparison By Log-Expectation) (Edgar, 2004) encontrado no endereço eletrônico <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>, que gerou uma única matriz consensual para os genes estudados. A variação e o padrão de substituição nucleotídica e a distância genética foram examinadas utilizando-se o programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). A saturação de nucleotídeos foi analisada plotando-se o número absoluto de transições (Ti) e transversões (Tv) contra os valores de distância genética (calculada segundo o modelo Kimura-2-parâmetros) com o uso do programa DAMBE versão 4.0.65 (Xia e Xie, 2001). O programa Modeltest (Posada e Crandall, 1998) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição nucleotídica que melhor se ajustava ao conjunto de dados da matrix para se estimar as árvores filogenéticas segundo os modelos de Neighbour-Joining (NJ), Bayesiano e de Máxima Parcimônia (MP).

As análises filogenéticas foram baseadas numa única matriz contendo as seqüências de todos os genes estudados. Os modelos de Máxima Parcimônia (MP) e Neighbour-Joining (NJ) foram estimados no programa PAUP\* versão beta 4.0b10 (Swofford, 2002) e MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) com buscas heurísticas usando-se a adição aleatória de seqüências. As relações filogenéticas baseadas no método Bayesiano (Huelsenbeck *et al.*, 2001) foram estimadas pelo programa MrBayes.

O grau de confiabilidade das árvores filogenéticas obtidas nas diferentes análises foi testado através da reamostragem por *bootstrap* (Felsenstein, 1985).





## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

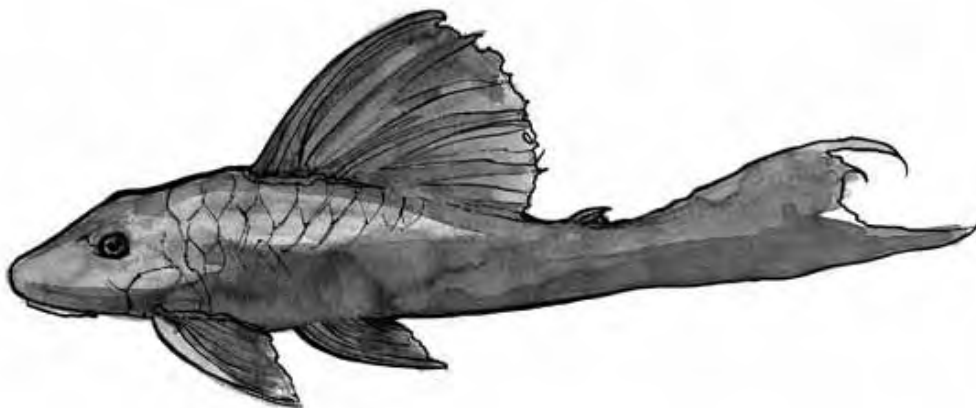
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos nas análises citogenéticas e moleculares resultaram em dois artigos científicos que estão apresentados na forma dos seguintes capítulos:

- Capítulo I - Análise citogenética de oito espécies do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) das bacias do Alto rio Paraná e dos rios Costeiros Orientais.
  
- Capítulo II - Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em seqüências de DNA.

# Capítulo I

**Análise citogenética de oito espécies do gênero  
*Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes,  
Loricariidae) das bacias do Alto rio Paraná e  
dos rios Costeiros Orientais**



## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma análise de cunho citogenético para *Hypostomus*, procurando levantar novos dados para o estabelecimento dos padrões de relacionamento entre as espécies deste gênero. As análises citogenéticas mostraram que exemplares de sete populações de *H. ancistroides* das bacias dos rios Paraná, Paranapanema e Tietê apresentaram número diplóide  $2n=68$ , mas com uma variação morfológica dos cromossomos e com NORs variando entre dois e três pares de cromossomos. *H. regani* da bacia do rio Mogi-Guaçu, apresentou  $2n=72$  cromossomos, com NOR em dois pares de cromossomos. *Hypostomus* sp. da bacia do rio Mogi-Guaçu, apresentou  $2n=68$  cromossomos, com NOR em dois pares de cromossomos. *H. aff. agna* da bacia Costeira Oriental apresentou  $2n=74$  cromossomos, com NOR em dois pares de cromossomos. *H. cf. heraldoi* da bacia do rio Mogi-Guaçu, apresentou  $2n=72$  cromossomos, com NOR em um par de cromossomos. *H. cf. strigaticeps* da bacia do rio Mogi-Guaçu, apresentou  $2n=74$  cromossomos, com NOR em dois pares de cromossomos. *H. cf. topavae* da bacia do rio Paraná, apresentou  $2n=80$  cromossomos, com NOR em dois pares de cromossomos. Em quatro populações de *H. strigaticeps* das bacias dos rios Mogi-Guaçu, Paraná e Tietê apresentaram  $2n=72$  cromossomos, com NORs variando entre um par e quatro pares de cromossomos. O gênero *Hypostomus* apresenta uma grande diversidade de formulas cariotípicas, sugerindo que ocorreram rearranjos cromossômicos do tipo fissão cêntrica e inversão pericêntrica, no decorrer do processo, caracterizados pelo grande aumento de cromossomos do tipo subtelocêntricos e acrocêntricos e as NORs múltiplas em posição terminal encontrada na maioria das espécies, podendo ser esta uma condição derivada para Loricariidae.

**Palavras-chave:** Citogenética, evolução, *Hypostomus*, NOR e Peixes

## Introdução

A ictiofauna Neotropical de água-doce é bastante rica, incluindo 71 famílias e 4.475 espécies reconhecidamente válidas (Reis *et al.*, 2003). A ordem Siluriformes compreende um grupo de peixes extremamente grande, diverso e amplamente distribuído nas regiões tropicais de todo o mundo (Burgess, 1989, Teugels, 1996 e Ferraris, 2007). Sendo o número de espécies de conhecidas de cerca de 3.100; porém, esse número pode ser bem maior (Burgess, 1989, Teugels, 1996, Reis *et al.*, 2003, Nelson, 2006 e Ferraris, 2007).

Estudos recentes da sistemática de representantes da ordem Siluriformes indicaram que algumas famílias formam agrupamentos polifiléticos, enquanto vários grupos tradicionais tiveram seu monofiletismo confirmado, como a superfamília Loricarioidea (de Pinna, 1998 e Britto, 2002). A família Loricariidae, com cerca de 700 espécies, está dividida em oito subfamílias (Reis *et al.*, 2003, Reis *et al.*, 2006 e Chiachio *et al.*, 2008), sendo Hypostominae, a mais complexa, dividida em cinco tribos (Armbruster, 2004).

Embora a família Loricariidae seja considerada uma das maiores famílias de peixes do mundo, o número de espécies cariotipadas é muito reduzido. Dentre as espécies desta família, existe uma grande diversificação do número diplóide, de  $2n=36$  em *Rineloricaria latirostris* (Giuliano-Caetano 1998) a  $2n=84$  em *Hypostomus* sp. (Cereali *et al.*, 2008).

A tribo Hypostomini é composta por um único gênero, *Hypostomus* cujos representantes apresentam o corpo relativamente pequeno e robusto, com pedúnculo caudal não deprimido e presença de nadadeira adiposa (Armbruster, 2004). Este gênero (121 espécies descritas) apresenta distribuição desde a América Central até ao sul da América do Sul (Ferraris, 2007) a maior variedade cariotípica da família (Artoni e Bertollo, 1996, 2001 e Artoni *et al.*, 1996, 1998).

Citogeneticamente, a subfamília Hypostominae é a mais bem estudada da família Loricariidae, mas é a mais complexa, apresentando variação do número diplóide de  $2n=38$  em *Ancistrus* sp. (Alves *et al.*, 2003) a  $2n=84$  em *Hypostomus* sp. (Cereali *et al.*, 2008). Uma característica muito interessante em Hypostominae (particularmente entre os Hypostomini) é a relação inversa entre o número diplóide e o número de

cromossomos com dois braços, sugerindo a ocorrência de muitos eventos de fusão/fissão cêntrica na evolução do grupo (Artoni e Bertollo, 2001).

Com o objetivo de procurar ampliar o conhecimento sobre a diversidade e os padrões de relacionamento das espécies do gênero *Hypostomus*, foi realizada a análise cariotípica de oito espécies do gênero *Hypostomus*, que resultaram, na caracterização dessas espécies e por fim, a elaboração de um modelo para explicar a evolução cariotípica do grupo.

## Material e Métodos

Exemplares de oito espécies do gênero *Hypostomus* foram coletados nos componentes das bacias do Alto rio Paraná e dos rios Costeiros Orientais (Tabela 1) e mantidos vivos até as análises citogenéticas. Os exemplares utilizados nas análises citogenéticas e moleculares foram fixados em formol 10% e conservados em álcool 70% para realização de estudos taxonômicos futuros. E então depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu.

Preparações de cromossomos metafásicos foram realizadas com aplicação da técnica de “air drying”, adaptada por Foresti *et al.* (1981) e a detecção das regiões organizadoras de nucléolo (NOR) pela técnica de impregnação pela prata de Howell e Black (1980). A morfologia dos cromossomos foi estabelecida com bases no tamanho dos braços segundo a classificação de Levan *et al.* (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A).

Para as análises moleculares foram obtidas amostras de tecidos de 14 representantes com um total de quatro espécies do gênero *Hypostomus*, para as espécies de *H. ancistroides* com sete populações, *H. strigaticeps* com três populações e *H. cf. strigaticeps* com uma população e enraizadas as hipóteses com as espécies de *H. affinis* e *H. regani* (Tabela 3). Os tecidos foram preservados em etanol 95% com 0,5  $\mu$ M de EDTA. Os exemplares coletados foram fixados em formol 10% e conservados em álcool 70% para realização de estudos taxonômicos futuros. Estando depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de

Botucatu.

O DNA total foi extraído de amostras de tecido de fígado, músculo e sangue preservados em etanol com o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Sequência completa do gene mitocondrial Citocromo *b*, seqüências parciais do gene 16S rRNA e seqüências parciais do gene nuclear F-Reticulon 4 que foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os seguintes *primers*:

Os *primers* utilizados para o gene Citocromo *b* foram L14841: 5'- CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3' e H15915 B: 5'- AAC CTC CGA TCT TCG GAT TAC AAG AC -3' (Dr. Claudio de Oliveira comunicação pessoal e Calcagnotto *et al.*, 2005); para 16S rRNA foram 16S F: 5' - ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT - 3', 16S R: 5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T -3' (Dr. Claudio de Oliveira comunicação pessoal e Shimabukuro-Dias, 2004). Para o gene F-Reticulon 4 foram: F-reticul4-D: 5' – AGG CTA ACT CGC TYT SGG CT – 3', F-reticul4-R: 5' – GGC AVA GRG GRG GCR AAR TCC ATC – 5', F-Reticulon4-D3: 5' – ACA KTG GCA AGG AAA ACT CC – 3' e F-reticul4-iR: 5' – AGG CTC TGC AGT TTC TCT AG – 3' (Dr. Juan Montoya-Burgos comunicação pessoal e Chiachio *et al.*, 2008).

Para amplificar as regiões do DNA mitocondrial e nuclear estudadas, foram realizadas reações de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) com um volume final de 25,0 µl, contendo: 16,5 µl de água destilada estéril, 2,5 µl de dNTP (8 mM), 2,5 µl de 10X “PCR Buffer” (Biotools), 1,2 µl de cada *primer* (10 µM), 0,1 µl de DNA Polimerase (1 unidade) (Biotools DNA Polymerase) e 1,0 µl de DNA molde (cerca de 200 ng), que posteriormente foram homogeneizadas numa solução com volume final de 25,0 µl após a reação de PCR.

A reação seguiu as seguintes condições para a amplificação dos genes 16S rRNA e Citocromo *b*: seguiu-se um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos com os seguintes passos: a 96°C por 45 segundos, 50°C por 1 minuto para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos, estendendo a cadeia e para finalizar um ciclo a 72°C por 5 minutos.

Para a reação de amplificação do gene nuclear R-Reticulon 4, são necessárias duas etapas de amplificação, pois o fragmento do gene que interessava era o fragmento entre as posições de anelamento dos *primers* F-Reticulon4-D3 e F-Reticulon4-iR (Dr. Juan Montoya-Burgos comunicação pessoal) (Figura 8). Então usou-se, numa primeira etapa de amplificação, os *primers* F-reticul4-D e F-reticul4-R (Figura 8) que

corresponderiam ao gene F-Reticulon 4 completo (aproximadamente 2.000 pb): um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos com os seguintes passos: a 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos e 15 segundos, estendendo a cadeia e para finalizar um ciclo a 72°C por 5 minutos.

Numa segunda etapa utiliza-se 1,0 µl do produto de PCR da primeira etapa em uma nova reação para amplificar um segmento de cerca de 700 pares de base (pb) do gene F-Reticulon 4 utilizando os *primer* F-Reticulon4-D3 e F-Reticulon4-iR: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos com os seguintes passos: a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos e 15 segundos, estendo a cadeia e para finalizar um ciclo a 72°C por 5 minutos. Essas reações de PCR foram realizadas em um termociclador MJ Research, INC, modelo PTC-100™ Programmable Thermal Controller.

Os produtos de PCR foram identificados em gel de agarose 1,0%. Após checagem da amplificação, o produto de PCR passou por reação de limpeza com a enzima ExoSap-IT® (Exonuclease I: Recombinant SAP: *Pandalus borealis* - USB Corporation).

As reações de seqüenciamento foram feitas com o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). Os produtos das reações de seqüenciamento foram aplicados em gel de poliacrilamida 4,5% e foi feita uma reação de seqüenciamento utilizando o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). Foram seqüenciados em um seqüenciador automático por capilaridade, modelo Applied Biosystem 3130. Todas as seqüências foram lidas ao menos duas vezes (*forward e reverse*). Dados sobre a composição do gene F-Reticulon 4 não foram obtidos para a espécie *Ancistrus* sp. (Tabela 4).

Após o seqüenciamento das amostras e suas réplicas, as seqüências obtidas foram abertas nos programas dos softwares ATGC (Genetix Inc.) e BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999) e por comparação foi estabelecida uma seqüência consenso do gene para cada indivíduo. Tais seqüências foram então passadas para um editor de texto, nomeadas separadamente e salvas em um único arquivo em formato texto (extensão .txt).

As seqüências foram alinhadas com o algoritmo Muscle (Multiple Sequence Comparison By Log-Expectation) (Edgar, 2004) encontrado no endereço eletrônico



<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>, que gerou uma única matriz consensual para os genes estudados. As saturações de nucleotídeos foram analisadas tabulando o número de transições (Ti) e transversões (Tv) observadas versus a distância genética. As análises de distância genética foram baseadas em testes de hipótese de modelos alternativos implementados no programa Modeltest 3.06 (Posada e Grandall, 1998).

Análises filogenéticas, através do método de Máxima Parcimônia (MP) foram realizadas no programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Árvores parcimoniosas foram geradas usando taxas de Ti/Tv: 1:1 e 1:2, considerando as inserções/deleções (*gaps*) como dados ausentes ou uma quinta base. A análise de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) foi aplicada para averiguar o suporte estatístico de cada nó individual usando 1000 réplicas com 100 adições aleatórias e o algoritmo TBR.

**Tabela 1.** Análises Citogenéticas do gênero *Hypostomus* com as Espécies, Localidades de coleta, número de depósito na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP – Botucatu – SP e Sexo.

Espécies	Localidade de coleta	LBP	Sexo
<i>Hypostomus ancistroides</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	4206	3 machos e 5 fêmeas
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Campo Novo, Bauru, SP. (Bacia do rio Tietê)	4205	6 machos e 4 fêmeas
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Jacutinga, Bofete, SP. (Bacia do rio Tietê - SP)	4204	4 machos e 2 fêmeas
<i>H. ancistroides</i>	Rio Novo, Avaré, SP. (Bacia do rio Paranapanema)	4201	3 machos e 2 fêmeas
<i>H. ancistroides</i>	Rio Capivara, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	3244	3 machos e 2 fêmeas
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná)	3250	1 macho e 1 fêmea
<i>H. ancistroides</i>	Rio Paraitinga, Salesópolis, SP. (Bacia do rio Tietê)	3248	3 machos e 5 fêmeas
<i>H. regani</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	3943	8 machos e 2 fêmeas
<i>H. sp.</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	3943	1 macho e 1 fêmea
<i>H. aff. agna</i>	Riacho Ribeirão Cavallo, Jaraguá do Sul, SC. (Bacia da Costa Oriental)	2360	1 macho e 1 fêmea
<i>H. cf. heraldoi</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	4208	1 macho e 1 fêmea
<i>H. cf. strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do Rio Mogi-Guaçu)	4611	1 macho e 2 fêmeas
<i>H. cf. topavae</i>	Córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná)	3249	1 macho e 1 fêmea
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	4607	2 machos e 2 fêmeas
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Alambari, Botucatu, SP. (Bacia do Tietê)	4202	7 machos e 2 fêmeas
<i>H. strigaticeps</i>	Córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Aguapeí- SP)	3253	1 macho e 1 fêmea
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	4209	2 machos e 2 fêmeas

**Tabela 2.** Relação das espécies analisadas, procedência de coleta, número do exemplar (N), número de depósito na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP – Botucatu – SP, tamanho das seqüências obtidas para os genes Citocromo b (Cit. b) (seqüências completas) e 16S rRNA (16S) (seqüências parciais) mitocondriais e F-Reticulon 4 (F-R.4) (seqüências parciais) nuclear.

<b>Espécie</b>	<b>Procedência</b>	<b>N</b>	<b>LBP</b>	<b>Cit. b</b>	<b>16S</b>	<b>F-R.4</b>
<b>Hypostominae</b>						
<b>Hypostomini</b>						
<i>Hypostomus affinis</i>	Lagoa Feia, Campo dos Goytacazes, RJ. (Bacia do rio Paraíba do Sul)	16087	2371	921	622	705
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Novo, Bauru, SP. (Bacia do rio Tietê)	17921	4205	921	591	706
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Jacutinga, Bofete, SP. (Bacia do rio Tietê)	18366	4204	921	608	708
<i>H. ancistroides</i>	Rio Capivara, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	18051	3244	921	580	695
<i>H. ancistroides</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	17881	4206	921	618	706
<i>H. ancistroides</i>	Rio Paraitinga, Salesópolis, SP. (Bacia do rio Tietê)	17493	3248	921	617	706
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná)	18244	3250	921	617	680
<i>H. ancistroides</i>	Rio Novo, Avaré, SP. (Bacia do rio Paranapanema)	20800	4201	921	605	688
<i>H. cf. strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	20870	4209	921	605	705
<i>H. regani</i>	Rio Paranapanema, Andirá, PR. (Bacia do rio Paraná)	11261	1672	921	618	687
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	10666	2148	921	618	708
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	23320	4209	921	611	684
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	20855	3945	921	609	688
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Alambari, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	18410	4202	921	604	686

## Resultados e Discussão

O número diplóide em *Hypostomus* varia de  $2n=52$  (Artoni e Bertollo, 2001) a  $2n=84$  (Cereali *et al.*, 2008) cromossomos com distintas fórmulas cariotípicas, indicando a ocorrência de muitos rearranjos cromossômicos na evolução do cariótipo deste grupo de peixes (Artoni e Bertollo, 1996). As oito espécies analisadas neste trabalho (Tabela 3) mostraram números diplóides variando entre  $2n=68$  em *H. ancistroides* e  $2n=80$  em *H. cf. topavae*.

Para as espécies analisadas não foram encontrados heteromorfismos cromossômicos ligados ao sexo. Na literatura, casos de cromossomos sexuais foram encontrados para alguns Hypostominae como em *Hypostomus* sp., tipo ZZ/ZW (Artoni e Bertollo, 1998) e *Ancistrus* n. sp. 1 do tipo XX/X0 (Alves *et al.*, 2006).

As espécies de *H. ancistroides* analisadas apresentaram  $2n=68$  cromossomos em amostras das bacias dos rios Paraná, Paranapanema e Tietê. Entretanto, foi notada variações na fórmula cariotípica. *H. ancistroides* (Rio Araquá), apresentou cariótipo com 10M, 4SM, 28ST e 26A (Figura 9, Tabela 3), *H. ancistroides* (Córrego Campo Novo), apresentou 4M, 16SM, 22ST e 26A (Figura 10, Tabela 3), *H. ancistroides* (Córrego Jacutinga), apresentou 8M, 10SM, 26ST e 24A (Figura 11, Tabela 3), *H. ancistroides* (Rio Novo), apresentou 10M, 10SM, 24ST e 24A (Figura 12, Tabela 3), *H. ancistroides* (Rio Capivara), apresentou 8M, 10SM, 26ST e 24A (Figura 13, Tabela 3), *H. ancistroides* (Córrego Carrapato) apresentou 8M, 6SM, 26ST e 28A (Figura 14, Tabela 3), *H. ancistroides* (Rio Paraitinga), apresentou 8M, 10SM, 18ST e 32A (Figura 15, Tabela 3). Essa variação também foi descrita para outras amostras de *H. Ancistroides* por Michele *et al.* (1977) e Artoni e Bertollo (1996) (Tabela 3).

Em *H. regani* (Rio Mogi-Guaçu) apresentou um número diplóide de 72 cromossomos, com cariótipo formado por 6M, 6SM, 32ST e 28A (Figura 16, Tabela 3), confirmando parcialmente os resultados encontrados por Artoni e Bertollo (1996) e Michele *et al.* (1977) (Tabela 3), com variação na fórmula cariotípica.

Em *Hypostomus* sp. (Rio Mogi-Guaçu) apresentou um número diplóide de 68 cromossomos, com 6M, 6SM, 32ST e 24A (Figura 17, Tabela 3). Esse número diplóide foi também encontrado para *H. ancistroides*, da qual se diferencia pela estrutura cariotípica (Michele *et al.*, 1977 e Artoni e Bertollo, 1996) (Tabela 3).

Em *H. aff. agana* (Riacho Ribeirão Cavalão) apresentou um número diplóide de 74 cromossomos, com 8M, 10SM, 32ST e 24A (Figura 18, Tabela 3). Este número diplóide foi também observado nas espécies *H. sp. E* (Artoni e Bertollo, 1996) e *H. cf. topavae* (Presente estudo, Tabela 3), mas essas espécies podem também ser diferenciadas pelas estruturas cariotípicas.

Em *H. cf. heraldoi* (Rio Mogi-Guaçu) apresentou um número diplóide de 72 cromossomos, apresentando 6M, 6SM, 26ST e 34A (Figura 19, Tabela 3). Este mesmo número cromossômico é encontrado para as espécies *H. goyazensis* (Alves *et al.*, 2006), *H. regani* (Artoni e Bertollo, 1996) e *H. strigiceps* (Presente estudo, Tabela 3).

Em *H. sp. cf. topavae* (Córrego Carrapato) apresentou um número diplóide de 80 cromossomos, apresentando 6M, 8SM, 42ST e 24A (Figura 21, Tabela 3). Este número diplóide também foi encontrado nas espécies *Hypostomus sp. E* (Artoni e Bertollo, 1996) e *H. aff. agna* (Presente estudo, Tabela 3), mas essas espécies podem também ser diferenciadas pelas estruturas cariotípicas.

As amostras de *H. strigiceps* analisadas apresentaram  $2n=72$  e  $2n=74$  cromossomos também apresentem uma variação na morfologia dos cromossomos. *H. strigiceps* (Rio Araquá), apresentou 8M, 14SM, 28ST e 22A (Figura 22, Tabela 3), *H. strigiceps* (Rio Alambari), apresentou 6M, 6SM, 38ST e 22A (Figura 23, Tabela 3), *H. strigiceps* (Córrego Carrapato), apresentou 8M, 6SM, 30ST e 28A (Figura 24, Tabela 3) e *H. strigiceps* (Rio Mogi-Guaçu), apresentou 6M, 8SM, 32ST e 26A (Figura 25, Tabela 3). Este número diplóide também foi encontrado na espécie *H. regani* (Artoni e Bertollo, 1996) (Tabela 3), mas essas espécies podem também ser diferenciadas pelas estruturas cariotípicas. Em *H. cf. strigiceps* (Rio Mogi-Guaçu) apresentou um número diplóide de 74 cromossomos, apresentando 6M, 4SM, 30ST e 34A (Figura 20, Tabela 3). Este número diplóide também foi encontrado nas espécies *H. albopunctatus* (Artoni e Bertollo, 1996), *H. paulinus* e *H. strigiceps* (Michele *et al.*, 1977) (Tabela 3), mas essas espécies podem também ser diferenciadas pelas estruturas cariotípicas.

A localidade tipo para *H. strigiceps* é a bacia do rio Piracicaba (Weber, 2003).

No nosso trabalho foram encontrados números diplóides de  $2n=72$  e  $2n=74$  para *H. strigiceps* das localidades das Bacias do Mogi-Guaçu, Paraná e Tietê. A bacia do Tietê é a mais próxima da localidade tipo com  $2n=72$  (Presente trabalho), portanto suportando a hipótese de que números diferentes encontrados para outras localidades, podem ser um indicativo de que sejam outras espécies, como encontrado no nosso

trabalho citogenético e em nossos dados moleculares não publicados (Capítulo II, Figura 33) e comunicação pessoal de Dr. Claudio H. Zawadzki que observou, através de características morfológicas, que eram um pouco diferentes. Estas evidências mostram que *H. cf. strigaticeps* não se relaciona com as demais espécies deste grupo. Hipótese corroborada com casos da literatura de citogenética encontrados para “espécies crípticas”, como em *Astyanax scabripinnis* (Mizoguchi e Matins-Santos, 1998), *Hoplias malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000 e Born e Bertollo, 2001), *Serrasalmus rhombeus* (Nakayama *et al.*, 2001).

Artoni e Bertollo (2001) propõe com base nos estudos citogenéticos para a família Hypostominae que quanto maior o número de cromossomos, maior o número de cromossomos do tipo ST/A, sendo o inverso é verdadeiro para os cromossomos do tipo M/SM. O número diplóide em *Hypostomus* varia de  $2n=52$  a  $2n=84$  cromossomos, com distintas fórmulas cariotípicas, mostrando que existe um aumento de cromossomos do tipo ST/A com o aumento de cromossomos e indicando a ocorrência de rearranjos cromossômicos do tipo Robertsonianos, como fissões cêntricas e inversões pericêntricas na evolução do cariotípica neste grupo de peixes (Artoni e Bertollo, 1996).

Alves *et al.* (2003, 2005 e 2006) indicam que o número diplóide 54 é uma condição basal para Loricariidae. Em Neoplecostominae, como *Neoplecostomus microps*, *N. paranensis* (Alves *et al.*, 2005), e *Hemipsilichthys steindachneri* (Alves *et al.*, 2005) todas as populações estudadas apresentam  $2n=54$  cromossomos. Em Hypoptopomatinae, como *Corumbataia cuestae* e *Hisonotus depressicauda* (Ferreira *et al.*, 2005) também são encontradas espécies com este número diplóide. A morfologia cariotípica para estas espécies apresenta um maior número de cromossomos do tipo M/SM, reforçando a hipótese de Artoni e Bertollo (2001). Deste modo, o número elevado de cromossomos para as demais espécies é uma condição derivada e, deste modo, *Hypostomus* parece ser a mais derivado em termos cariotípicos na família Loricariidae.

As espécies das tribos de Hypostominae cariotipadas mostram a mesma relação proposta por Artoni e Bertollo (2001) em relação à quantidade de cromossomos e à variação da morfologia cariotípica. Em Ancistini, *Ancistrus* n. sp. 2 com número diplóide 52 têm 32M/SM e 20ST/A (Alves *et al.*, 2003), *Ancistrus multispinnis* com  $2n=52$ , tem 28M/SM e 24ST/A (Alves *et al.*, 2003). Em Corynbophanini, *Corymbophanes* n. sp. com  $2n=54$ , tem 20M, 20SM e 14ST (Alves *et al.*, 2005). Em Pterygoplichthini, *Pterygoplichthys joselimaianus*, com  $2n=52$  (Oliveira *et al.*, 2006),

*Hemiancistrus* sp. com  $2n=52$ , tem 20M, 20SM e 12ST/A. Em Rhinelepidini, *Rhinelepis aspera* com  $2n=54$ , tem 20M, 26SM e 8ST (Artoni e Bertollo, 2001). A morfologia cariotípica para estas espécies apresentam um maior número de cromossomos do tipo M/SM, reforçando a hipótese de Artoni e Bertollo (2001). Esse número cariotípico relativamente conservado entre 52 e 54 nos representantes das diferentes subfamílias de Loricariidae reforça a hipótese de que um número cariotípico próximo a esses seria o estado basal dentro de Loricariidae.

São propostas hipóteses filogenéticas com base em seqüências de DNA para os genes 16S rRNA e Citocromo *b* do DNA mitocondrial e o gene nuclear F-Reticulon 4, para as espécies de *Hypostomus ancistroides* com sete populações, *H. strigaticeps* com três populações e *H. cf. strigaticeps* com uma população e enraizadas as hipóteses com as espécies de *H. affinis* e *H. Regani* (Tabela 3, Figuras 26 e 27). As hipóteses filogenéticas apresentadas são sobrepostas com dados citogenéticos, onde são comparadas as fórmulas cariotípicas, assim indicando como ocorreu a evolução cariotípica, mostrando os possíveis rearranjos cromossômicos.

Na hipótese filogenética para *H. Ancistroides* (Figura 26), todas as populações apresentaram  $2n=68$  cromossomos, a população do rio Novo é a mais basal apresentando uma fórmula cariotípica do tipo 10M, 10SM, 24ST e 24A, sendo grupo irmão da população do córrego Carrapato com 8M, 6SM, 26ST e 28A, sendo evidenciado fissões cromossômicas pelo aumento de cromossomos do tipo ST e A, com seis transformações cromossômicas. A população do córrego Carrapato, grupo irmão da população do rio Paraitinga com 8M, 10SM, 18ST e 32A, sendo evidenciados fissões cromossômicas pelo aumento de cromossomos do tipo A e também sendo evidenciados fusões pela diminuição de cromossomos ST, com quatro transformações causadas por fissões e oito causadas por fusões. A população do rio Paraitinga, grupo irmão da população do rio Capivara com 8M, 10SM, 26ST e 24A, sendo evidenciadas fusões pela diminuição de cromossomos do tipo A e fissões pelo aumento de cromossomos do tipo ST, com sete transformações por fusão e oito por fissões. A população do rio Capivara, grupo irmão do clado formado pelas populações do rio Araquá com 10M, 4SM, 28ST e 26A, grupo irmão das populações dos córregos Jacutinga com 8M, 10SM, 26ST e 24A e Campo Novo com 4M, 16SM, 22ST e 26A. Neste clado, a população do Rio Araquá, foi evidenciada fissões pelo aumento de cromossomos do tipo ST e A, ocorrendo quatro transformações. A população do Rio Araquá, grupo irmão da população do córrego Jacutinga, foi evidenciada fusões pelo

aumento de cromossomos do tipo ST e A, ocorrendo quatro transformações. A população do rio Araquá, grupo irmão da população do córrego Campo Novo, foi evidenciado fusões pela diminuição de cromossomos do tipo ST, ocorrendo seis transformações. Estas séries de transformações não seguem uma seqüência, são eventos independentes, não corroborando com a hipótese de Artoni e Bertollo, 2001.

Na hipótese filogenética para *Hypostomus strigaticeps* (Figura 27), todas as populações apresentaram  $2n=72$  cromossomos, com excessão para a *H. cf. strigaticeps* com  $2n=74$ . A espécie de *H. cf. strigaticeps* do rio Mogi-Guaçu é a mais basal apresentando uma fórmula cariotípica do tipo 6M, 4SM, 30ST e 34A, sendo grupo irmão do clado composto pelas espécies de *H. strigaticeps* das populações dos rios Mogi-Guaçu com 6M, 8SM, 32ST e 26A, grupo irmão da população do rio Araquá com 8M, 14SM, 28ST e 22A, irmão da população rio Alambari com 6M, 6SM, 38ST e 22A. A espécie de *H. cf. strigaticeps* comparado com as populações de *H. strigaticeps*, evidencia rearranjos do tipo fissão, pelo grande número de cromossomo do tipo ST e A. As populações de *H. strigaticeps* do rio Mogi-Guaçu, são evidenciadas fissões cromossômicas pelo aumento de cromossomos do tipo ST e A, com oito transformações cromossômicas, quando comparadas com a população do rio Araquá, mas quando comparada com a população do rio Alambari, são evidenciadas fissões pelo aumento de cromossomos do tipo ST, com seis transformações, e também evidenciado fusões pela diminuição de cromossomos do tipo A, com quatro transformações. Estas séries de transformações não seguem uma seqüência, são eventos independentes, não corroborando com a hipótese de Artoni e Bertollo, 2001.

As espécies do gênero *Hypostomus* apresentam regiões organizadoras nucleolares (NORs) simples ou múltiplas em posição terminal nas cromátides, conforme dados da literatura e no presente trabalho (Tabela 3).

Em *H. ancistroides* (Rio Araquá), são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo ST nos pares 17 e 21 nos braços curtos (Figura 9, Tabela 3). Em *H. ancistroides* (Córrego Campo Novo), são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo ST nos pares 17 e 19 nos braços curtos (Figura 10, Tabela 3). Em *H. ancistroides* (Córrego Jacutinga) são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo ST nos pares 11 e 18 nos braços curtos (Figura 11, Tabela 3). Em *H. ancistroides* (Rio Novo) são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo ST nos pares 12 e 13 nos braços curtos (Figura 12, Tabela 3). Em *H. ancistroides* (Rio Capivara) são encontradas em três pares de cromossomos do tipo ST nos pares 12, 15 e 19 nos braços

curtos (Figura 13, Tabela 3). Em *H. ancistroides* (Córrego Carrapato) são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo ST nos pares 10 e 11 nos braços curtos (Figura 14, Tabela 3). Em *H. ancistroides* (Rio Paraitinga) são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo ST nos pares 13 e 14 nos braços curtos (Figura 15, Tabela 3).

Em *H. regani* (Rio Mogi-Guaçu) são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo ST nos pares 15 e 16 nos braços curtos (Figura 16, Tabela 3). Em *Hypostomus* sp. (Rio Mogi-Guaçu) são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo ST nos pares 7 e 14 nos braços curtos (Figura 17, Tabela 3). Em *H. aff. agna* (Riacho Ribeirão Cavalão) são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo SM no par 5 e ST no par 13 ambos braços curtos (Figura 18, Tabela 3). Em *H. cf. heraldoi* (Rio Mogi-Guaçu) são encontrados em um par de cromossomos do tipo A no par 20 (Figura 19, Tabela 3). Em *H. cf. strigiceps* (Rio Mogi-Guaçu) são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo ST no par 17, braço curto e A no par 13 (Figura 20, Tabela 3). Em *H. cf. topavae* (Córrego Carrapato) são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo ST no par 11, braço curto e A no par 30 (Figura 21, Tabela 3). Em *H. strigiceps* (Rio Araquá) são encontradas em dois pares de cromossomos do tipo A nos pares 27 e 28 (Figura 22, Tabela 3). Em *H. strigiceps* (Rio Alambari) são encontradas em quatro pares de cromossomos do tipo A nos pares 27, 28, 29 e 30 (Figura 23, Tabela 3). Em *H. strigiceps* (Córrego Carrapato) são encontradas em três pares de cromossomos do tipo A nos pares 26, 27 e 28 (Figura 24, Tabela 3). Em *H. strigiceps* (Rio Mogi-Guaçu) são encontradas em um par de cromossomos do tipo A no par 27 (Figura 25, Tabela 3).

As NORs em Loricariidae mostram uma grande diversidade fenotípica. Oliveira e Gosztanyi (2000) discutem que a NOR basal provavelmente para Siluriformes seja simples em posição terminal no cromossomo. Artoni (1996) propõe que a NOR basal para Loricariidae seja simples em posição terminal em um braço longo de um par de cromossomos metacêntricos, muito encontrado em Hypostominae e Hypoptopomatinae. Mas existem muitas espécies em Hypostominae (Artoni e Bertollo, 2001) que apresentam NOR múltipla. Se for considerada a NOR simples como condição basal para Loricariidae, aqueles que apresentarem NOR múltipla serão espécies derivadas na escala evolutiva. Nesse sentido a maioria das espécies do gênero *Hypostomus* aqui apresentadas apresentam esta condição de NOR múltipla, podendo ser um indício de que sejam mais derivadas na família Loricariidae (Tabela 3).



As espécies do gênero *Hypostomus* apresentam uma grande variedade de número de cromossomos e diversidade morfológica, sugerindo que ocorreram rearranjos cromossômicos do tipo fissão cêntrica e inversão pericêntrica, pelo grande aumento de cromossomos do tipo subtelocêntricos e acrocêntricos e a NOR múltipla em posição terminal encontrada na maioria das espécies, podendo ser uma condição derivada para Loricariidae.

As espécies do gênero *Hypostomus* são muito parecidas morfológicamente, apresentam uma alta variabilidade intra-específica e um grande número de espécies, segundo Schubart (1964), Schaefer (1987), Reis *et al.* (1990), Muller e Weber (1992), Mazzoni *et al.*, (1994), Weber e Montoya-Burgos (2002), Oyakawa *et al.* (2005) e Zawadzki *et al.* (2008a e 2008d), o que torna muito difícil sua identificação. Do ponto de vista taxonômico, os estudos citogenéticos têm-se revelado de grande valia, uma vez que diversos grupos identificados apenas com base em estudos morfológicos mostram-se formadas por diversas unidades, possivelmente isoladas geneticamente.

Análises citogenéticas de espécies que se encontram isoladas em pequenas populações, como *Astyanax scabripinnis*, tem demonstrado que quase todas poderiam ser identificadas com suas características cariotípicas, mas não diferenciadas por caracteres morfológicos (Moreira-Filho e Bertollo, 1991, Maistro *et al.*, 1998 e Vicari *et al.*, 2008). Outro exemplo semelhante ocorre com a espécie *Hoplias malabaricus* que se constitui também num complexo de espécies, e que podem ser diferenciadas através dos estudos citogenéticos (Bertollo *et al.*, 2000 e Vicari *et al.*, 2006). Para o gênero *Hypostomus* acreditamos serem necessários mais estudos citogenéticos, moleculares e ainda uma revisão taxonômica, devido ao grande número de espécies deste grupo, para que nossa compreensão sobre a diversidade do grupo seja melhorada.

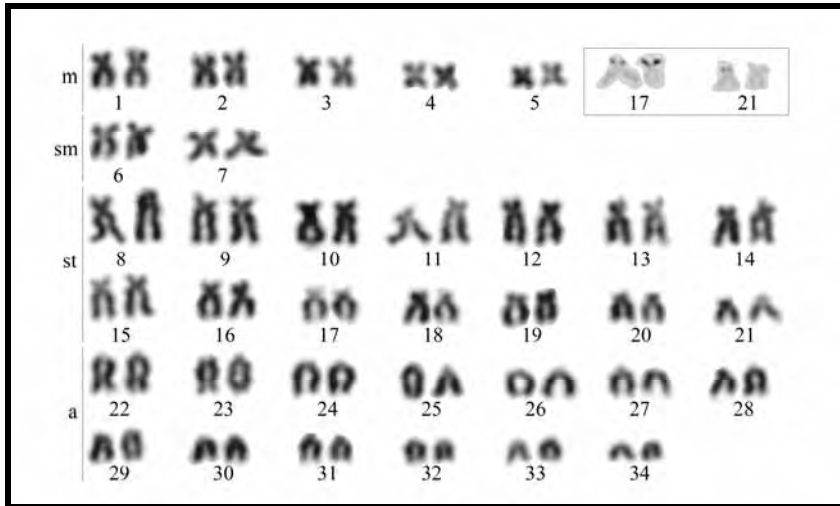
## **Agradecimentos**

Agradecemos a Claudio Henrique Zawadzki pela identificação dos exemplares, a José A. Senhorini e José Carlos Pansonato Alves pela doação de exemplares e a Renato Devidé pela assistência técnica. Ao CEPTA (Centro de Pesquisa em Treinamento em Aqüicultura da Fundação Padre Anchieta). À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Investigação Científica (CNPq) e Coordenadoria de Apoio à Pós-Graduação e Pesquisa (CAPES).

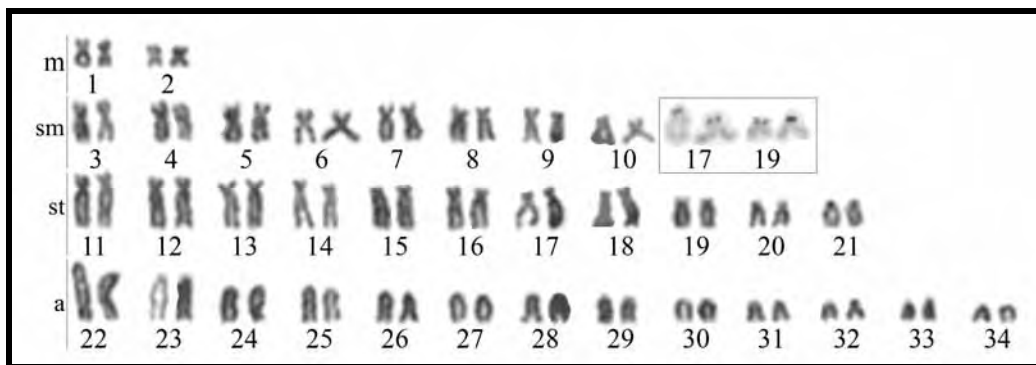
**Tabela 3.** Sumário dos dados citogenéticos do gênero *Hypostomus*. Obs.: 2n=número diplóide; M=Metacêntrico; SM=Submetacêntrico; ST=Subtelocêntrico; A=Acrocêntrico; NOR=número de pares de cromossomos com as regiões organizadoras nucleolares.

Espécies	Localidade de coleta	2n	Cariótipo	Pares com NOR	Referências
<i>Hypostomus affinis</i>	Riacho Jacuí, SP. (Bacia do rio Paraíba do Sul)	66	14M+14SM+12ST+12A	3	Kavalco <i>et al.</i> (2004)
<i>H. aff. auroguttatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do Rio Mogi-Guaçu)	76	8M+30SM+38ST/A	1	Artoni e Bertollo (1996)
<i>H. albopunctatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	74	10M+20SM+44ST/A	3	Artoni e Bertollo (1996)
<i>H. ancistroides</i>	Riacho Monjolinho, São Carlos, SP. (Bacia do rio Piracicaba)	68	16M+18SM+34ST/A	3	Artoni e Bertollo (1996)
<i>H. ancistroides</i>	-	68	10M+28SM+30ST/A	-	Michele <i>et al.</i> (1977)
<i>H. ancistroides</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	68	18M+10SM+12ST+28A	3	Alves <i>et al.</i> (2006)
<i>H. ancistroides</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	68	10M+4SM+28ST+26A	2	Presente estudo
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Campo Novo, Bauru, SP. (Bacia do rio Tietê)	68	4M+16SM+22ST+26A	2	Presente estudo
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Jacutinga, Bofete, SP. (Bacia do rio Tietê)	68	8M+10SM+26ST+24A	2	Presente estudo
<i>H. ancistroides</i>	Rio Novo, Avaré, SP. (Bacia do rio Paranapanema)	68	10M+10SM+24ST+24A	2	Presente estudo
<i>H. ancistroides</i>	Rio Capivara, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	68	8M+10SM+26ST+24A	3	Presente estudo
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná)	68	8M+6SM+26ST+28A	2	Presente estudo
<i>H. ancistroides</i>	Rio Paraitinga, Salesópolis, SP. (Bacia do Tietê)	68	8M+10SM+18ST+32A	2	Presente estudo
<i>H. emarginatus</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças, MT. (Bacia do rio Araguaia)	52	16M+30SM+6ST	1	Artoni e Bertollo (2001)
<i>H. goyazensis</i>	Rio Vermelho, Goiás Velho, GO. (Bacia do rio Araguaia)	72	10M+16SM+10ST+36A	1	Alves <i>et al.</i> (2006)
<i>H. nigromaculatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	76	8M+20SM+48ST/A	1	Rubert <i>et al.</i> (2008)
<i>H. nigromaculatus</i>	Ribeirão Três Bocas, Londrina, PR. (Bacia do rio Tibagi)	76	6M+20SM+50ST/A	2	Rubert <i>et al.</i> (2008)
<i>H. nigromaculatus</i>	Ribeirão dos Apertados, Londrina, PR. (Bacia do rio Tibagi)	76	8M+20SM+48ST/A	2	Rubert <i>et al.</i> (2008)
<i>H. paulinus</i>	-	74	10M+ 20SM+44ST/A	-	Michele <i>et al.</i> (1977)
<i>H. macrops</i>	-	68	10M+14SM+44ST/A	-	Michele <i>et al.</i> (1977)
<i>H. regani</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	72	6M+6SM+32ST+28A	2	Presente estudo
<i>H. regani</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	72	10M+20SM+42ST/A	-	Artoni e Bertollo (1996)
<i>H. regani</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	72	12M+18SM+26ST+16A	1	Alves <i>et al.</i> (2006)
<i>H. sp.</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	68	6M+6SM+32ST+24A	2	Presente estudo
<i>H. sp. 2</i>	Rio Perdido, Planalto da Bodoquenam MS. (Bacia do rio Paraguai)	84	6M+16SM+62ST/A	1	Cereali <i>et al.</i> (2008)
<i>H. sp. 3</i>	Córrego Salobrinha, Planalto da Bodoquenam MS.(Bacia do rio Paraguai)	82	6M+12SM+64ST/A	1	Cereali <i>et al.</i> (2008)
<i>H. sp. 3</i>	Córrego Salobrinha, Planalto da Bodoquenam MS.(Bacia do rio Paraguai)	84	6M+12SM+66ST/A	1	Cereali <i>et al.</i> (2008)
<i>H. sp. A</i>	Rio Rincão, Rincão, SP. (Bacia do rio Piracicaba)	70	18M+14SM+38ST/A	2	Artoni e Bertollo (1996)
<i>H. sp. B</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	72	12M+18SM+42ST/A	1	Artoni e Bertollo (1996)
<i>H. sp. C</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga,	72	10M+18SM+44ST/A	2	Artoni e

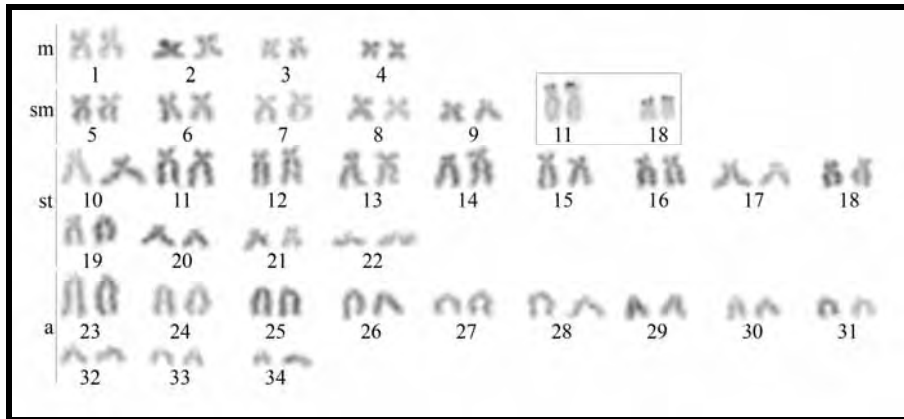
<i>H. sp. D1</i>	SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu) Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	72	10M+26SM+36ST/A	2	Bertollo (1996) Artoni e Bertollo (1996)
<i>H. sp. D2</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	72	14M+20SM+38ST/A	2	Artoni e Bertollo (1996)
<i>H. sp. E</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do Rio Mogi-Guaçu)	80	8M+16SM+56ST/A	2	Artoni e Bertollo (1996)
<i>H. aff. agna</i>	Riacho Ribeirão Cavallo, Jaraguá do Sul, SC. (Bacia da Costa Oriental)	74	8M+10SM+32ST+24A	2	<i>Presente estudo</i>
<i>H. cf. heraldoi</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	72	6M+6SM+26ST+34A	1	<i>Presente estudo</i>
<i>H. cf. strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	74	6M+4SM+30ST+34A	2	<i>Presente estudo</i>
<i>H. cf. topavae</i>	Córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná)	80	6M+8SM+42ST+24A	2	<i>Presente estudo</i>
<i>H. strigaticeps</i>	-	74	8M+4SM+ST/A62	-	Michele <i>et al.</i> (1977)
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	72	8SM+14SM+28ST+22A	2	<i>Presente estudo</i>
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Alambari, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	72	6M+6SM+38ST+22A	4	<i>Presente estudo</i>
<i>H. strigaticeps</i>	Córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná)	72	8M+6SM+30ST+28A	3	<i>Presente estudo</i>
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	72	6M+8SM+32ST+26A	1	<i>Presente estudo</i>



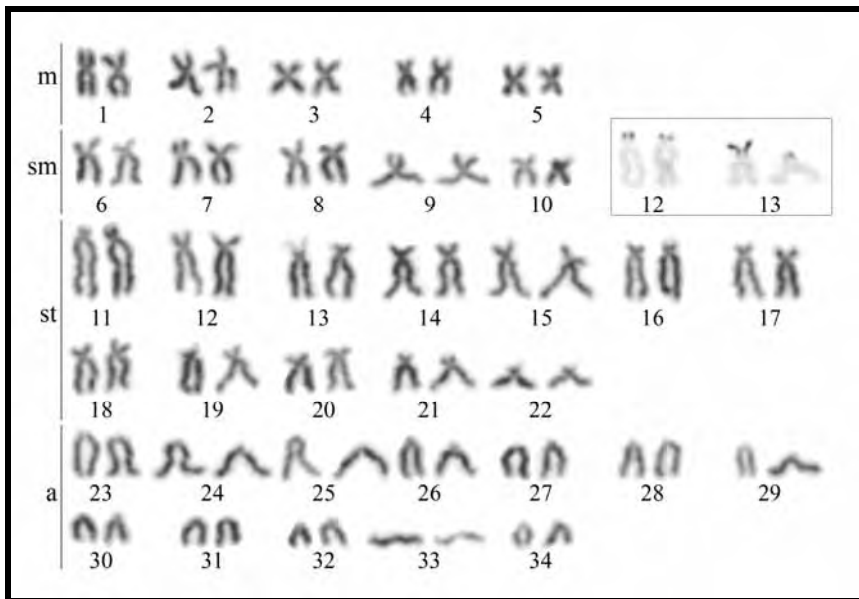
**Figura 9.** Cariótipo de *H. ancistroides* do rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.



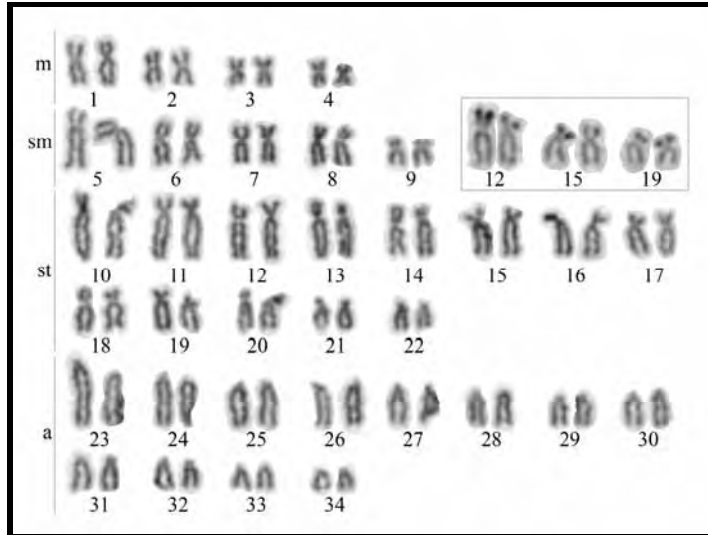
**Figura 10.** Cariótipo de *H. ancistroides* do córrego Campo Novo, Bauru, SP. (Bacia do rio Tietê), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.



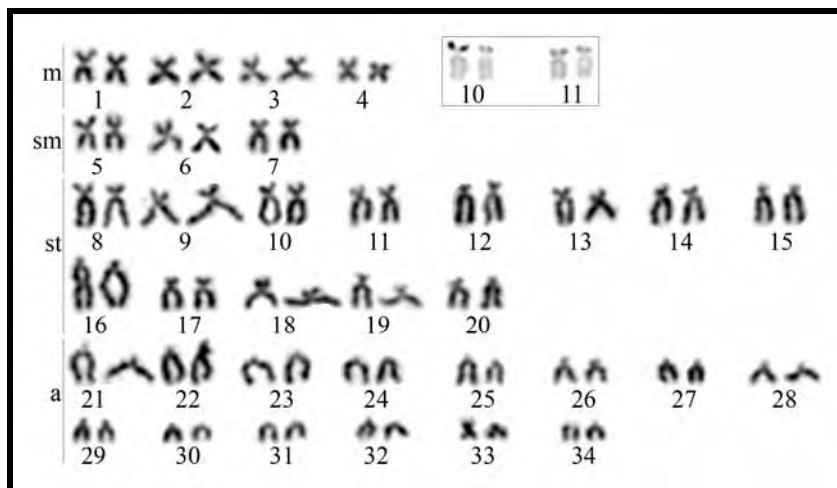
**Figura 11.** Cariótipo de *H. ancistroides* do córrego Jacutinga, Bofete, SP. (Bacia do rio Tietê), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.



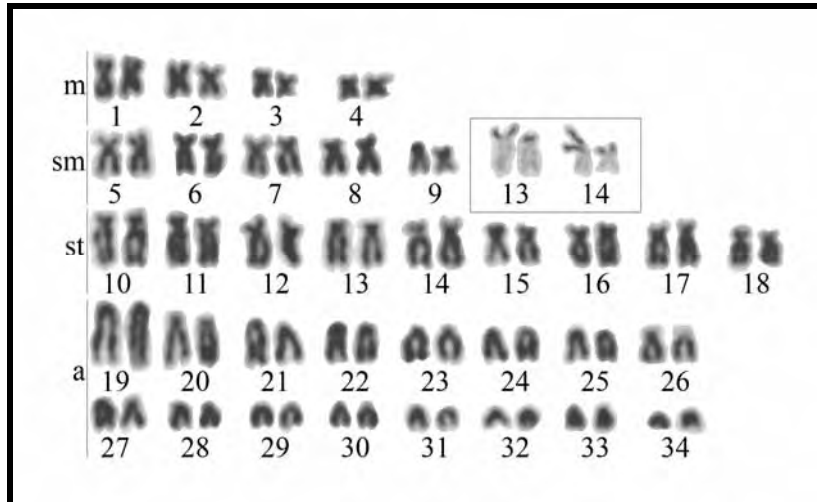
**Figura 12.** Cariótipo de *H. ancistroides* do rio Novo, Avaré, SP. (Bacia do rio Paranapanema), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.



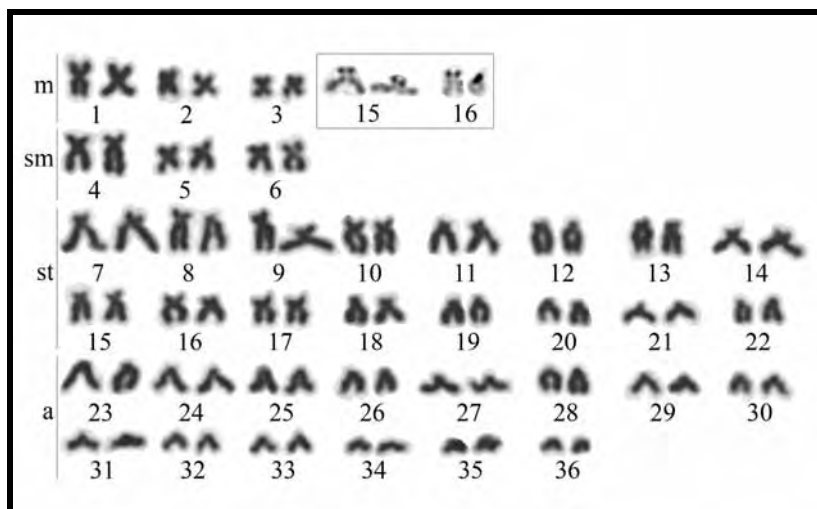
**Figura 13.** Cariótipo de *H. ancistroides* do rio Capivara, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê), mostrando marcação de NOR em três pares de cromossomos.



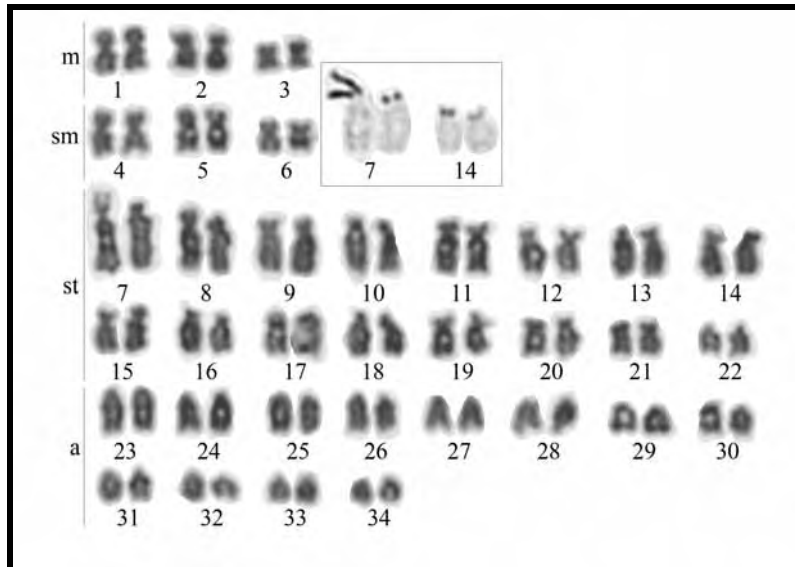
**Figura 14.** Cariótipo de *H. ancistroides* do córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.



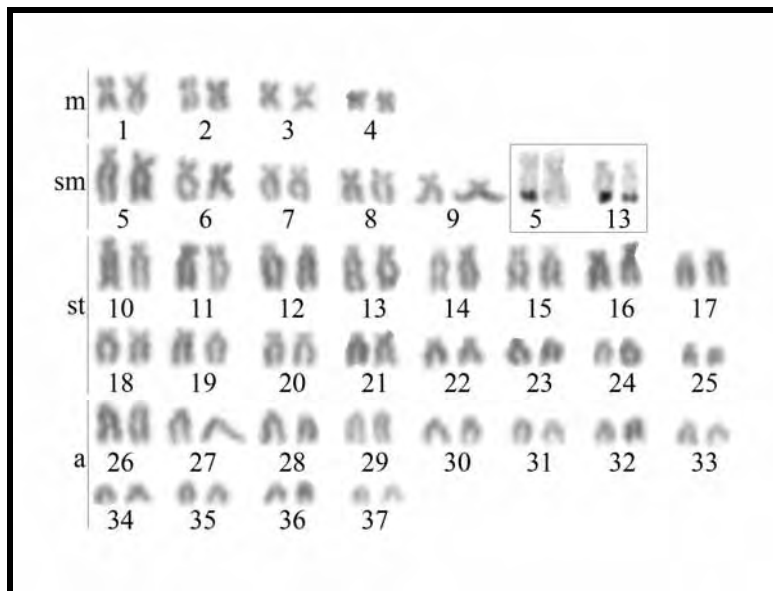
**Figura 15.** Cariótipo de *H. ancistroides* do rio Paraitinga, Salesópolis, SP. (Bacia do rio Tietê), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.



**Figura 16.** Cariótipo de *H. regani* do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.

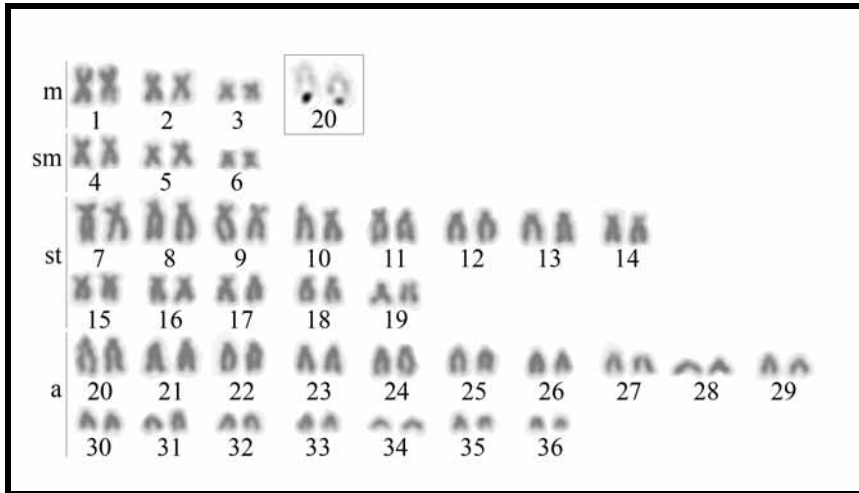


**Figura 17.** Cariótipo de *Hypostomus* sp. do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.

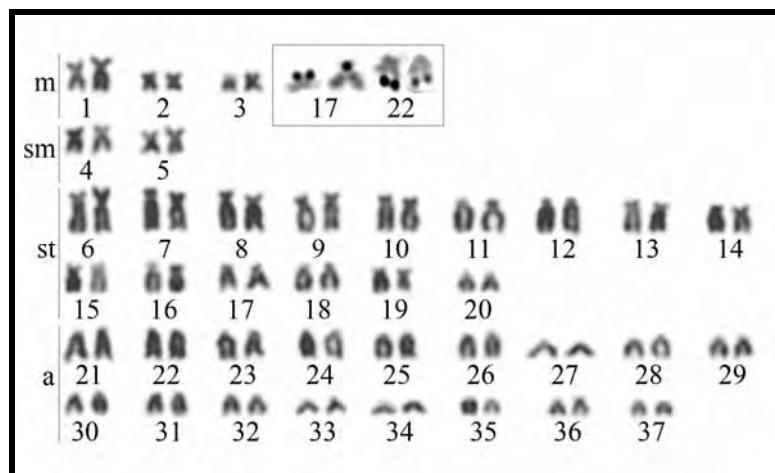


**Figura 18.** Cariótipo de *H. aff. agna* do ribeirão Cavalão, Jaraguá do Sul, SC. (Bacia da Costa Oriental), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.

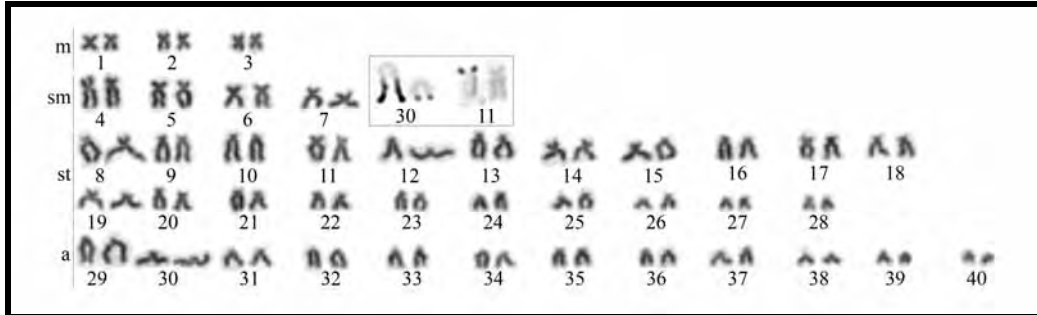




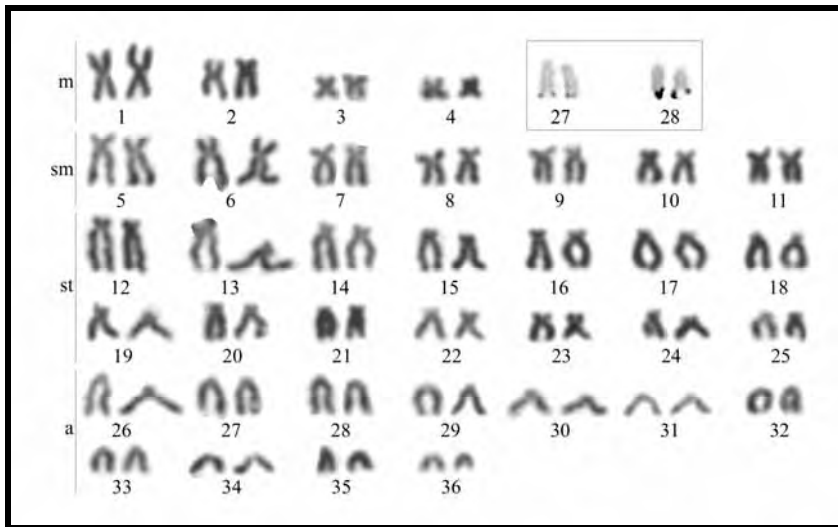
**Figura 19.** Cariótipo de *H. cf. heraldoi* do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu), mostrando marcação de NOR em um par de cromossomos.



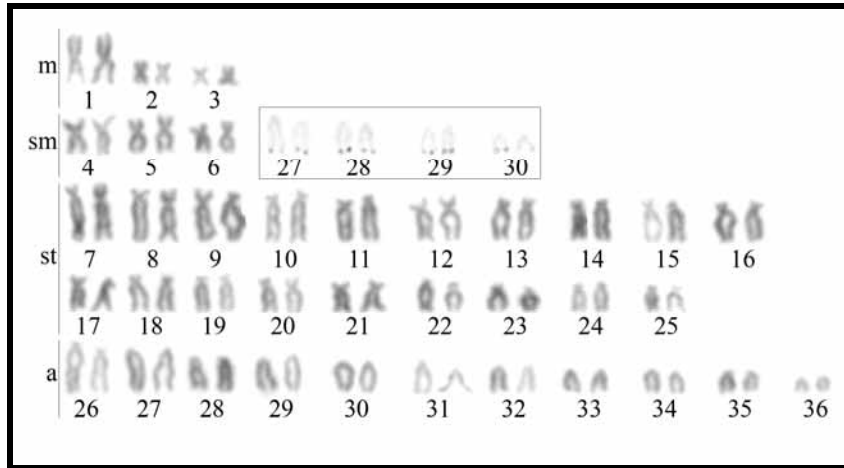
**Figura 20.** Cariótipo de *H. cf. strigaticeps* do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.



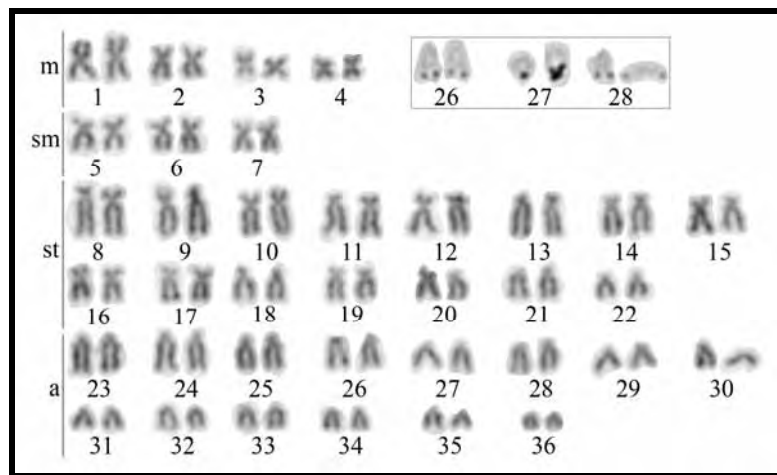
**Figura 21.** Cariótipo de *H. cf. topavae* do córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.



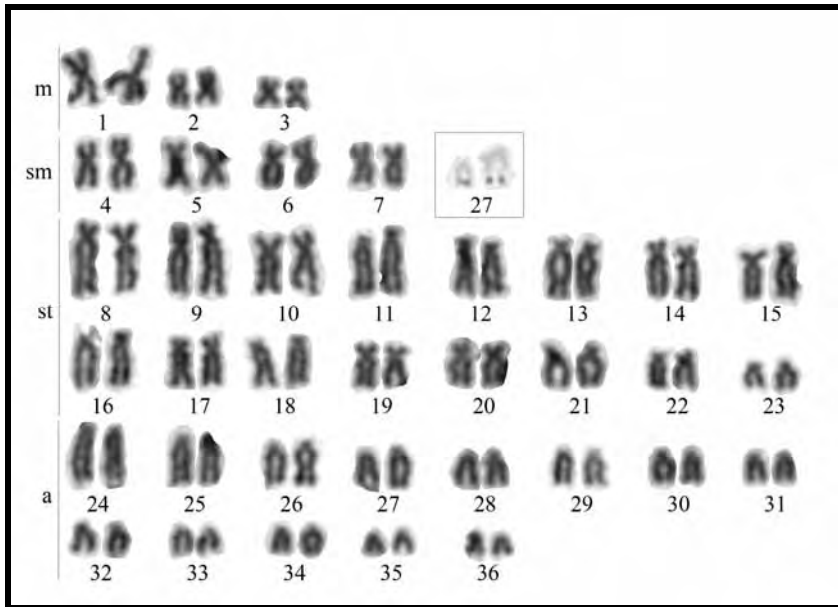
**Figura 22.** Cariótipo de *H. strigaticeps* do rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê), mostrando marcação de NOR em dois pares de cromossomos.



**Figura 23.** Cariótipo de *H. strigaticeps* do rio Alambari, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê), mostrando marcação de NOR em quatro pares de cromossomos.



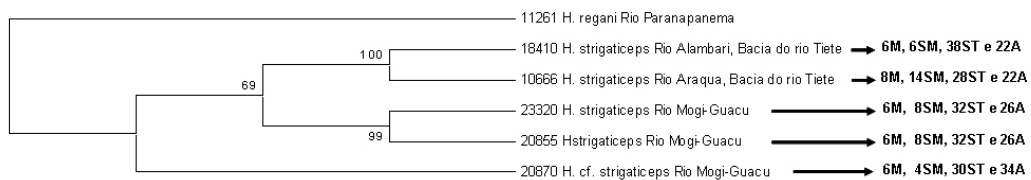
**Figura 24.** Cariótipo de *H. strigaticeps* do córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná), mostrando marcação de NOR em três pares de cromossomos.



**Figura 25.** Cariótipo de *H. strigaticeps* do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu), mostrando marcação de NOR em um par de cromossomos.



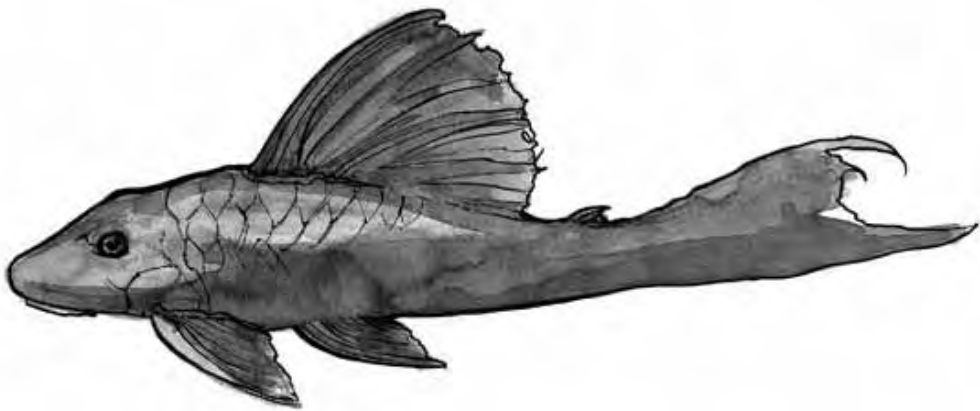
**Figura 26.** Topologia encontrada a partir da análise de Máxima Parcimônia das relações entre populações de *Hypostomus ancistroides* com base em caracteres moleculares de seqüências dos genes Citocromo *b*, 16S rRNA e F-Reticulon 4 e acrescentado as morfologias cariotípicas. Os valores acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) para a análise de MP. A árvore foi enraizada em *Hypostomus affinis*.



**Figura 27.** Topologia encontrada a partir da análise de Máxima Parcimônia das relações entre populações de *Hypostomus strigaticeps* com base em caracteres moleculares de seqüências dos genes Citocromo *b*, 16S rRNA e F-Reticulon 4 e acrescentado as morfologias cariotípicas. Os valores acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) para a análise de MP. A árvore foi enraizada em *Hypostomus regani*.

## Capítulo II

**Estudo da evolução do gênero *Hypostomus*  
(Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base  
em seqüências de DNA**



## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma análise ampla de sistemática molecular de *Hypostomus*, procurando levantar novos dados para o estabelecimento dos padrões de relacionamento entre as espécies deste gênero. Do ponto de vista da Sistemática Molecular, foram analisadas seqüências dos genes mitocondriais Citocromo *b* (seqüências completas) e 16S rRNA (seqüências parciais) e para o DNA nuclear foram obtidas seqüências do gene F-Reticulon 4 (seqüências parciais), para 61 representantes do gênero *Hypostomus*, quatro representantes da tribo Ancistrini, seis representantes da tribo Pterygoplichthini e um exemplar da espécie de *Aphanotorulus unicolor*. A árvore foi enraizada em dois representantes da subfamília Neoplecostominae. O gênero *Hypostomus* se mostrou monofilético com várias sub-unidades bem caracterizadas. A nossa hipótese vem contribuir para o entendimento do processo de diferenciação de espécies deste grupo.

**Palavras-chave:** DNA, Evolução, *Hypostomus*, Peixes e Sistemática Molecular.

## Introdução

A ictiofauna Neotropical de água-doce é bastante rica, incluindo 71 famílias e 4.475 espécies reconhecidamente válidas, segundo o mais recente levantamento (Reis *et al.*, 2003). O estudo dos peixes neotropicais tem-se expandido consideravelmente nos últimos anos (ver referências em Malabarba *et al.*, 1998), principalmente após a incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados, entre as quais está o uso da metodologia de análise filogenética proposta inicialmente por Hennig (1966). Entretanto, o relacionamento dentro e entre muitos grupos ainda não é conhecido, sendo necessários estudos adicionais.

A ordem Siluriformes compreende um grupo de peixes extremamente grande, diverso e amplamente distribuído nas regiões tropicais de todo o mundo (Burgess, 1989, Teugels, 1996 e Ferraris, 1998). O número de espécies de Siluriformes neotropicais conhecidas é de 1.648 espécies, distribuídas em 15 famílias (Reis *et al.*, 2003). Apesar da importância científica e econômica dos Siluriformes, o grupo apresenta ainda inúmeros problemas sistemáticos e taxonômicos. A própria classificação das famílias de Siluriformes ainda não é consensual. Assim, por exemplo, o número de famílias citadas para a ordem é de 29 segundo Ferraris (1998), 33 segundo Teugels (1996) e Eschmeyer (1998), 37 segundo Teugels (1996), de Pinna (1998), Diogo (2003) Reis *et al.* (2003), 35 segundo Nelson (2006) e, mais recentemente, 36 segundo Ferraris (2007).

A família Loricariidae, até recentemente com cerca de 690 espécies, está dividida em oito subfamílias, de acordo com Reis *et al.* (2003), Reis *et al.* (2006) e Chiachio *et al.* (2008): Delturinae, Hypoptomatinae (79 espécies), Loricariinae (209 espécies), Hypostominae (386 espécies), Neoplecostominae (sete espécies), Lithogeneinae (uma espécie) e Otothyriinae.

Schaefer (1987), com base num trabalho de descrição osteológica para *Hypostomus plecostomus*, propõe uma filogenia para Loricariidae, demonstrando que as subfamílias Hypostominae e Ancistrinae formam grupos muito próximos e levantando dúvidas do monofiletismo destes. Outra questão levantada pelo seu trabalho diz respeito ao monofiletismo de *Hypostomus*. Armbruster (2004), em um amplo trabalho realizado com base em caracteres de morfologia externa, osteologia e anatomia do trato digestivo da família Loricariidae, com ênfase nas subfamílias Hypostominae e Ancistrinae, apresentou uma nova hipótese de relacionamento para Loricariidae (Figura 4A). Nessa



hipótese, foi reconhecida à validade da tribo Hypostomini, a subfamília Ancistrinae se torna uma tribo da subfamília Hypostominae (Ancistrini) e três novas tribos foram criadas: Corymbophanini, Rhinelepini, Pterygoplichthini (Figura 4A).

Neste trabalho, outras modificações foram sugeridas, como a remoção dos gêneros *Delturus*, *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Pareiorhina* e *Upsilonodus* da subfamília Hypostominae. Os gêneros *Delturus* e *Upsilonodus* formaram uma nova subfamília até então não nomeada e os gêneros *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys* e *Pareiorhina* foram transferidos para a subfamília Neoplecostominae. Essas mudanças foram necessárias para o reconhecimento da subfamília Hypostominae como monofilética (Figura 4A). Porém, dentro da tribo Hypostomini alguns problemas ainda persistem. Assim, para que o gênero *Hypostomus* seja monofilético é necessário reconhecer os gêneros *Aphanotorulus*, *Isorineloricaria* e *Cochliodon* como sinônimos de *Hypostomus* (Figura 4B). Por outro lado, existem também evidências sugeridas pelo autor de que *Aphanotorulus*, *Isorineloricaria*, *H. emarginatus* e *H. squalinus* formem um grupo monofilético (Figura 4B). Assim, considera-se que a correta distribuição de espécies na tribo Hypostomini só será possível depois de uma análise mais ampla do grupo.

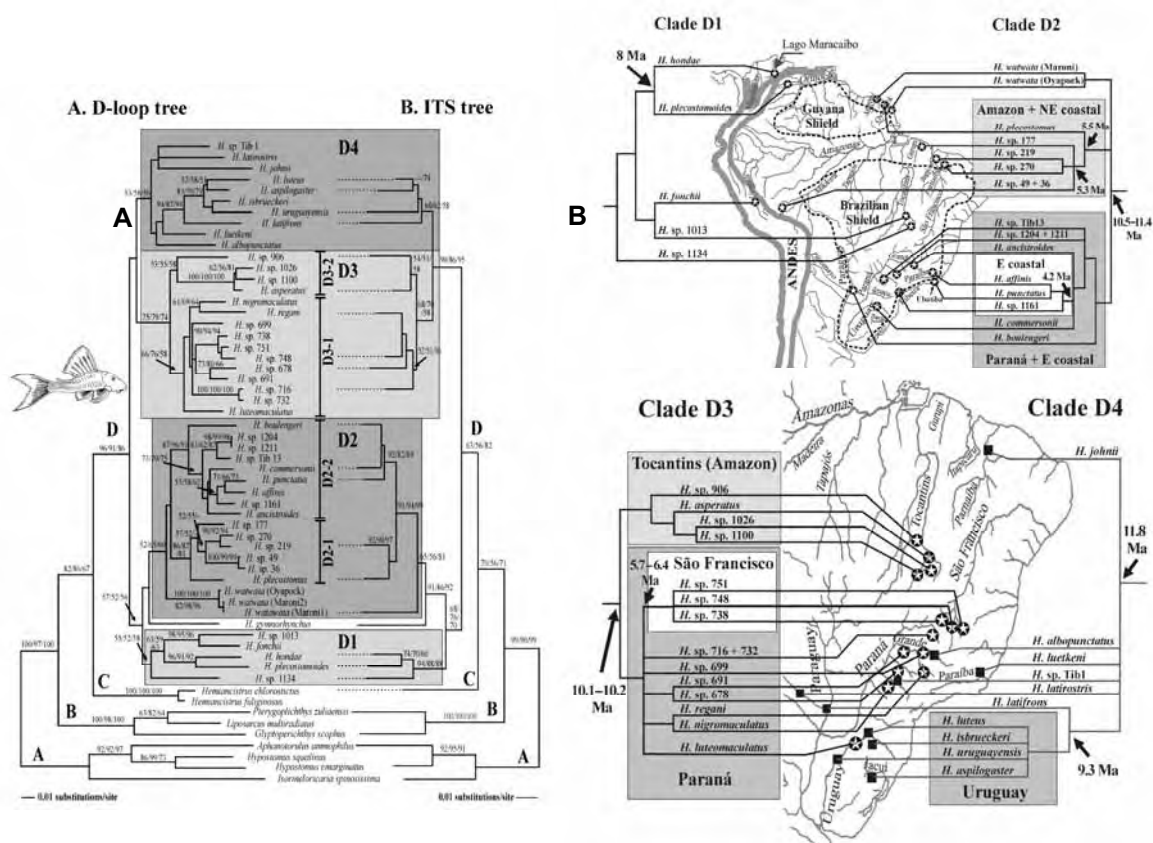
O gênero *Hypostomus*, é representado por peixes de varias tonalidades de cores que variam desde cores claras ao escuro, podendo ter manchas espalhadas pelo corpo com vários formatos e tonalidades diversas (Armbruster, 2004). O corpo é relativamente pequeno e robusto e a região caudal apresenta pedúnculo caudal não depressivo (Nelson, 2006). Este gênero (121 espécies descritas) apresenta distribuição desde a América Central até o sul da América do Sul (Weber, 2003 e Ferraris, 2007) (Figura 3).

Montoya-Burgos *et al.* (1998) elaboraram uma filogenia molecular para cerca de 50 espécies da família Loricariidae utilizando segmentos de genes 12S e 16S do rRNA mitocondrial. Os resultados mostraram que a família Loricariidae é monofilética, porém a subfamília Hypostominae e o gênero *Hypostomus* formaram grupos polifiléticos (Figura 5). Num trabalho mais recente de Montoya-Burgos (2003), uma filogenia molecular para o gênero *Hypostomus* baseada em seqüências do gene D-loop do DNA mitocondrial e de regiões espaçadoras transcritas internas dos genes ribossomais principais (ITS) foi apresentada, corroborando a hipótese de que *Hypostomus* não forma uma unidade monofilética, uma vez que as espécies *H. emarginatus* e *H. squalinus* estariam mais relacionadas a espécies de outros gêneros de Hypostominae. As demais espécies de *Hypostomus* analisadas por Montoya-Burgos (2003) formam um clado

monofilético, dividido em dois grandes grupos monofiléticos bem suportados (D1/D2 e D3/D4) (Figura 28).

As espécies do gênero *Hypostomus* são muito parecidas morfológicamente, sendo muito difícil sua identificação, este é um dos problemas, como também a alta variabilidade intra-específica e o grande número de espécies, segundo Schubart (1964), Schaefer (1987), Reis *et al.* (1990), Muller e Weber (1992), Mazzoni *et al.*, (1994), Weber e Montoya-Burgos (2002), Oyakawa *et al.* (2005) e Zawadzki *et al.* (2008a e 2008d). Do ponto de vista taxonômico, estudos citogenéticos e moleculares tem-se revelado de grande valia, uma vez que, diversos grupos identificados apenas com base em estudos morfológicos mostram-se formados por diversas unidades, possivelmente isoladas geneticamente.

O desenvolvimento de técnicas moleculares tem revigorado os estudos de sistemática de peixes. Os métodos desenvolvidos para a sistemática molecular tem freqüentemente colaborado com a adição de novos caracteres, acrescentando dados para inferir nas análises, nos relacionamentos entre espécies e têm sido explorados efetivamente nos estudos nos mais diferentes níveis taxonômicos (Kocher e Stephien, 1997). A análise molecular de representantes de espécies do gênero *Hypostomus*, através do seqüenciamento de longas cadeias de DNA, deverá ser bastante útil para testar a hipótese disponível de relacionamento dentro do gênero e para a elaboração de novas hipóteses sobre as relações entre as espécies. Neste trabalho, foram estudados os genes 16S rRNA e Citocromo *b* do DNA mitocondrial e o gene nuclear F-Reticulon 4 de 61 representantes com um total de 36 espécies do gênero de *Hypostomus* e de 10 espécies de gêneros aparentados, com o objetivo de elaborar uma hipótese sobre o relacionamento das espécies do gênero *Hypostomus*.



**Figura 28.** (A) Filogenia molecular baseada em seqüências de DNA mitocondrial dos genes D-loop e ITS, proposta por Montoya-Burgos (2003) para o gênero *Hypostomus*. (B) As divisões em clados filogenéticos de acordo com suas localidades biogeográficas das espécies.

## Material e Métodos

Foram obtidas amostras de tecidos de 61 representantes com um total de 36 espécies do gênero *Hypostomus* e representantes da subfamília Hypostominae, Ancistrini com quatro espécies, *Aphanotorulus unicolor*, Pterygoplichtini com três espécies e Neoplecostominae com duas espécies (Tabela 4). Os tecidos foram preservados em etanol 95% com 0,5  $\mu$ M de EDTA. Os exemplares coletados foram fixados em formol 10% e conservados em álcool 70% para realização de estudos taxonômicos futuros. Estando depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu e na coleção de peixes do Nupélia da Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

O DNA total foi extraído de amostras de tecido de fígado, músculo e sangue

preservados em etanol com o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Seqüência completa do gene mitocondrial Citocromo *b*, seqüências parciais do gene 16S rRNA e seqüências parciais do gene nuclear F-Reticulon 4 que foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os seguintes *primers*:

Os *primers* utilizados para o gene Citocromo *b* foram L14841: 5'- CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3' e H15915 B: 5'- AAC CTC CGA TCT TCG GAT TAC AAG AC -3' (Dr. Claudio de Oliveira comunicação pessoal e Calcagnotto *et al.*, 2005); para 16S rRNA foram 16S F: 5' - ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT - 3', 16S R: 5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T -3' (Dr. Claudio de Oliveira comunicação pessoal e Shimabukuro-Dias, 2004). Para o gene F-Reticulon 4 foram: F-reticul4-D: 5' – AGG CTA ACT CGC TYT SGG CT – 3', F-reticul4-R: 5' – GGC AVA GRG GRG GCR AAR TCC ATC – 5', F-Reticulon4-D3: 5' – ACA KTG GCA AGG AAA ACT CC – 3' e F-reticul4-iR: 5' – AGG CTC TGC AGT TTC TCT AG – 3' (Dr. Juan Montoya-Burgos comunicação pessoal e Chiachio *et al.*, 2008).

Para amplificar as regiões do DNA mitocondrial e nuclear estudadas, foram realizadas reações de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) com um volume final de 25,0 µl, contendo: 16,5 µl de água destilada estéril, 2,5 µl de dNTP (8 mM), 2,5 µl de 10X “PCR Buffer” (Biotools), 1,2 µl de cada *primer* (10 µM), 0,1 µl de DNA Polimerase (1 unidade) (Biotools DNA Polymerase) e 1,0 µl de DNA molde (cerca de 200 ng), que posteriormente foram homogeneizadas numa solução com volume final de 25,0 µl após a reação de PCR.

A reação seguiu as seguintes condições para a amplificação dos genes 16S rRNA e Citocromo *b*: seguiu-se um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos com os seguintes passos: a 96°C por 45 segundos, 50°C por 1 minuto para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos, estendendo a cadeia e para finalizar um ciclo a 72°C por 5 minutos.

Para a reação de amplificação do gene nuclear R-Reticulon 4, são necessárias duas etapas de amplificação, pois o fragmento do gene que interessava era o fragmento entre as posições de anelamento dos *primers* F-Reticulon4-D3 e F-Reticulon4-iR (Dr. Juan Montoya-Burgos comunicação pessoal) (Figura 8). Então usou-se, numa primeira etapa de amplificação, os *primers* F-reticul4-D e F-reticul4-R (Figura 8) que corresponderiam ao gene F-Reticulon 4 completo (aproximadamente 2.000 pb): um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos com os

seguintes passos: a 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos e 15 segundos, estendendo a cadeia e para finalizar um ciclo a 72°C por 5 minutos.

Numa segunda etapa utiliza-se 1,0 µl do produto de PCR da primeira etapa em uma nova reação para amplificar um segmento de cerca de 700 pares de base (pb) do gene F-Reticulon 4 utilizando os *primer* F-Reticulon4-D3 e F-Reticulon4-iR: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos com os seguintes passos: a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos e 15 segundos, estendo a cadeia e para finalizar um ciclo a 72°C por 5 minutos. Essas reações de PCR foram realizadas em um termociclador MJ Research, INC, modelo PTC-100™ Programmable Thermal Controller.

Os produtos de PCR foram identificados em gel de agarose 1,0%. Após checagem da amplificação, o produto de PCR passou por reação de limpeza com a enzima ExoSap-IT® (Exonuclease I: Recombinant SAP: *Pandalus borealis* - USB Corporation).

As reações de seqüenciamento foram feitas com o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). Os produtos das reações de seqüenciamento foram aplicados em gel de poliacrilamida 4,5% e foi feita uma reação de seqüenciamento utilizando o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). Foram seqüenciados em um seqüenciador automático por capilaridade, modelo *Applied Biosystem* 3130. Todas as seqüências foram lidas ao menos duas vezes (*forward e reverse*). Dados sobre a composição do gene F-Reticulon 4 não foram obtidos para a espécie *Ancistrus* sp. (Tabela 4).

Após o seqüenciamento das amostras e suas réplicas, as seqüências obtidas foram abertas nos programas dos softwares ATGC (Genetix Inc.) e BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999) e por comparação foi estabelecida uma seqüência consenso do gene para cada indivíduo. Tais seqüências foram então passadas para um editor de texto, nomeadas separadamente e salvas em um único arquivo em formato texto (extensão .txt).

As seqüências foram alinhadas com o algoritmo Muscle (Multiple Sequence Comparison By Log-Expectation) (Edgar, 2004) encontrado no endereço eletrônico <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>, que gerou uma única matriz consensual para os genes estudados. As saturações de nucleotídeos foram analisadas tabulando o

número de transições (Ti) e transversões (Tv) observadas versus a distância genética. As análises de distância genética foram baseadas em testes de hipótese de modelos alternativos implementados no programa Modeltest 3.06 (Posada e Grandall, 1998).

Análises filogenéticas, através do método de Máxima Parcimônia (MP) e Neighbour-Joining (NJ) foram realizadas no programa PAUP\* beta versão 4.0b10 (Swofford, 2002), com buscas heurísticas usando a adição ao acaso das seqüências e o algoritmo TBR. Em todas as análises otimizamos o método de aceleração da transformação (ACCTRAN). Árvores parcimoniosas foram geradas usando taxas de Ti/Tv: 1:1 e 1:2, considerando as inserções/deleções (*gaps*) como dados ausentes ou uma quinta base. A análise de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) foi aplicada para averiguar o suporte estatístico de cada nó individual usando 1000 réplicas com 100 adições aleatórias e o algoritmo TBR.

O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado utilizando o programa Modeltest 3.06 (Posada e Grandall, 1998) foi GTR+I+G e foi aplicado para a matriz em combinação (Citocromo *b*, 16S rRNA e F-Reticulon 4). *Gaps* foram considerados como dados ausentes. A técnica de *bootstrap* foi aplicada para averiguar o suporte estatístico para os nós individuais usando 1000 réplicas. As árvores de consenso foram produzidas com o programa TreeExplorer implementado no programa Mega 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

O método Bayesiano de análise filogenética (Huelsenbeck *et al.*, 2001) foi realizado utilizando-se o programa MrBayes v.3.0 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Quatro cadeias foram corridas simultaneamente e foram utilizadas 30.000.000 de gerações. A cada 100 gerações era coletada uma amostra. As árvores amostradas abaixo da geração 10.000.001 foram descartadas da população de árvores para construção da árvore de consensos através do software Tree-Explorer implementado no programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

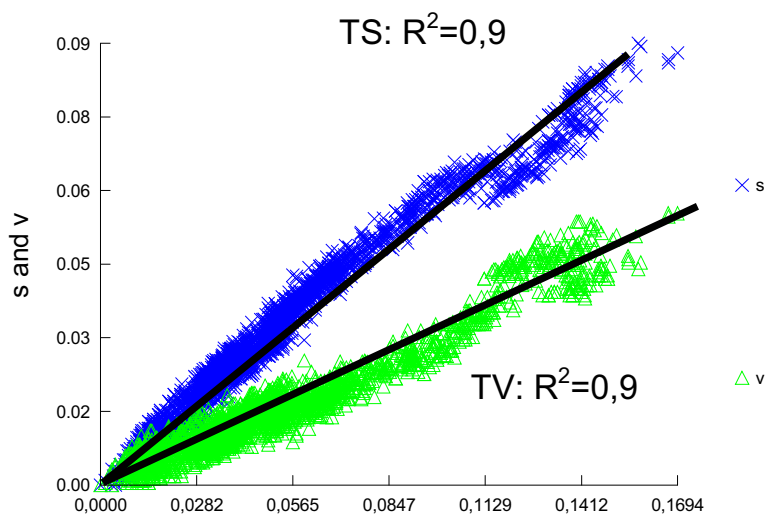
## **Resultados e Discussão**

Os experimentos de seqüenciamento resultaram em 921 pares de bases para o gene Citocromo *b* (seqüências completas), entre 579 a 631 pares de bases para o gene 16S rRNA (seqüências parciais) e entre 676 a 721 pares de bases para o gene nuclear F-Reticulon 4 (seqüências parciais), totalizando uma média de 2273 pares de bases (Tabela 4). O alinhamento de todas as seqüências resultou em uma matriz de 2102

caracteres após as correções manuais, dos quais 1303 eram constantes, 317 eram variáveis, mas não informativos nas análises de parcimônia e 482 eram variáveis e informativos na análise de parcimônia.

As transições/transversões (Ti/Tv) foram tabuladas versus a distância genética calculada segundo o modelo de Kimura-2-parâmetros para cada gene individualmente e também para os dados totais. Considerando como relações lineares aquelas que possuíam o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) maior que 0,9, pode-se observar que não houve saturação dos nucleotídeos no conjunto de dados (Figura 29).

As análises realizadas com os métodos de Máxima Parcimônia (MP), Neighbour-Joining (NJ) e análise Bayesiana resultaram em árvores que foram semelhantes, mostrando a robustez dos dados obtidos. A árvore melhor resolvida em consenso para os três modelos está apresentada na Figura 30. A árvore foi enraizada em espécies da subfamília Neoplecostominae. A hipótese apresentada mostrou o monofiletismo do gênero *Hypostomus*.



**Figura 29.** Gráfico mostrando a frequência observada de transições (Ti) e transversões (Tv) em relação à distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros. Para a combinação dos genes Citocromo *b*, 16S rRNA e F-Reticulon 4. As transições correspondem aos “x” em cor azul e as transversões aos triângulos verdes.





**Figura 30.** A topologia encontrada a partir da análise de Máxima Parcimônia das relações entre espécies do gênero *Hypostomus* e de alguns representantes da subfamília Hypostominae com base em caracteres moleculares de seqüências dos genes Citocromo *b*, 16S rRNA e F-Reticulon 4. Os valores acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) para a análise de MP e NJ respectivamente, e os números abaixo dos ramos representam os valores encontrados na análise Bayesiana. A árvore foi enraizada em *Kronichthys* sp. e *Neoplecostomus paranensis*. Observação: os traços representam onde não ocorreu consenso para as topologias obtidas para as diferentes análises.

Observando a composição de pares de bases das seqüências dos genes Citocromo *b*, 16S rRNA e F-Reticulon 4, verificou-se que estes genes são ricos em Adenina. Este dado é semelhante ao descrito para muitos genes mitocondriais de peixes (Alves-Gomes *et al.*, 1995), lagartos (Reeder, 1995) e serpentes (Parkinson, 1999). Por outro lado, a composição de pares de bases mostra uma tendência anti-Guanina dos genes mitocondriais, mas não dos genes nucleares (Zhang e Hewitt, 1996), como observado em outras espécies de peixes (Murphy *et al.*, 1999 e Hrbek *et al.*, 2002). Entretanto, para o gene F-Reticulon 4 analisado no presente trabalho, essa tendência não foi observada.

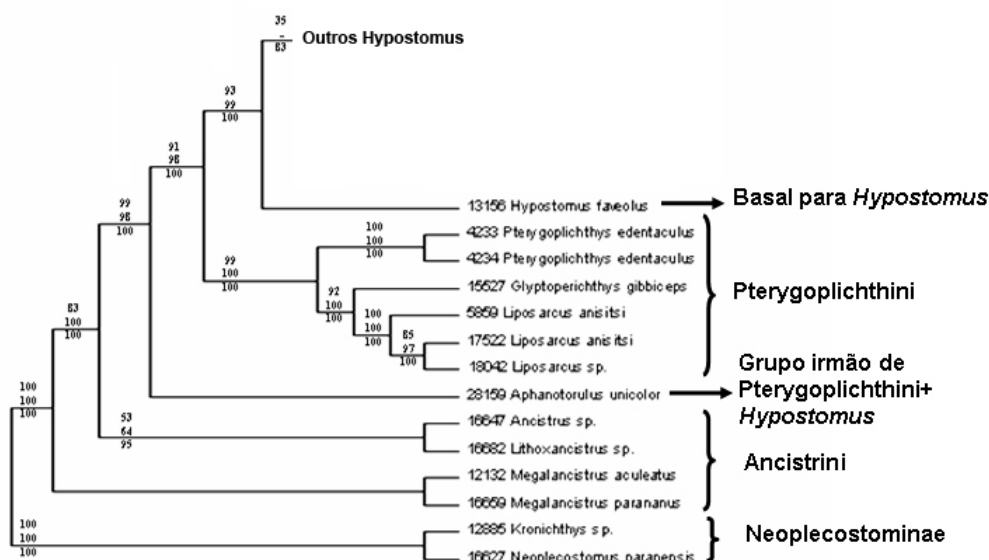
A espécie *Aphanotorulus unicolor* (Bacia do Rio Araguaia) encontra-se como grupo irmão de Pterygoplichthini mais o gênero *Hypostomus*, não corroborando a hipótese de Armbruster (2004) de que *Aphanotorulus* estaria inserida no gênero *Hypostomus* (Figuras 30 e 31).

A tribo Pterygoplichthini é apontado como um grupo monofilético, irmã dos representantes do gênero *Hypostomus* (Figuras 30 e 31), diferindo do proposto em Armbruster (2004) onde Pterygoplichthini é irmão da tribo Ancistrini. Em dados citogenéticos da literatura, todas as espécies apresentam um número cromossômico conservado de  $2n=52$ , *Glyptoperichthys gibbiceps*, *Hemiancistrus spilomma*, *Liposarcus anisitsi* e *Pterygoplichthys joselimaianus* (Alves *et al.*, 2006 e Oliveira *et al.*, 2006), reforçando o monofiletismo desta tribo.

As espécies analisadas do gênero *Hypostomus* formaram um grupo monofilético (Figura 30) onde *Hypostomus faveolus* (Bacia do rio Araguaia) é a mais basal para o gênero (Figuras 30 e 31), sendo descrita por Zawadzki *et al.* (2008a) e considerada por ele pertencente ao grupo dos *H. plecostomus* (Muller e Weber, 1992), tal como *H. boulengeri* e *H. commersoni* por apresentarem caracteres morfológicos e principalmente dentários muito semelhantes. Porém, nossas análises não corroboram esta hipótese, pois estas três espécies apresentaram-se como mais derivadas. Essas espécies foram

analisadas em Montoya-Burgos (2003) onde foram agrupadas no clado “D2” (Figuras 28 A e B).

Como observado na Figura 30, após separação de *Hypostomus faveolus* ocorre uma nova divisão, na qual o restante das espécies de *Hypostomus* foram divididas em dois grandes grupos (clados A e B, Figuras 30, 32 e 35).



**Figura 31.** Esquema da hipótese filogenética para a subfamília Hypostominae. O grupo irmão do gênero *Hypostomus* é o formado pelos representantes da tribo Pterygoplichthini (*Pterygoplichthys*, *Glyptoperichthys* e *Liposarcus*). *Aphanotorulus unicolor*, espécie conflitante com o gênero *Hypostomus* segundo Armbruster (2004), aparece como externa a ele e irmão de Pterygoplichthini mais *Hypostomus*. Também em destaque está *Hypostomus faveolus*, a espécie mais basal para dentro de *Hypostomus* segundo nossos dados. Como grupos externos foram utilizados representantes da subfamília Neoplecostominae.

Analisando o clado A (Figura 32) do presente trabalho, o agrupamento A-1 apresenta como espécie mais basal *H. plecostomoides* (Bacia do rio Orinoco) considerado no trabalho do Montoya-Burgos (2003) como pertencente ao grupo “D1” (Figuras 28, 30 e 32), sendo grupo irmão de *H. ericae* (Bacia do rio Araguaia), *H. cochliodon* (Bacia do rio Paraguai) e *H. cf. plecostomus* (Bacia do rio Araguaia), pertencentes ao clado “D2-1”, apresentado por Montoya-Burgos (2003) (Figuras 28, 30 e 32). O relacionamento de algumas de nossas espécies do clado A-1 tal como o relacionamento apontado no clado “D2-1” de Montoya-Burgos (2003) pode ser

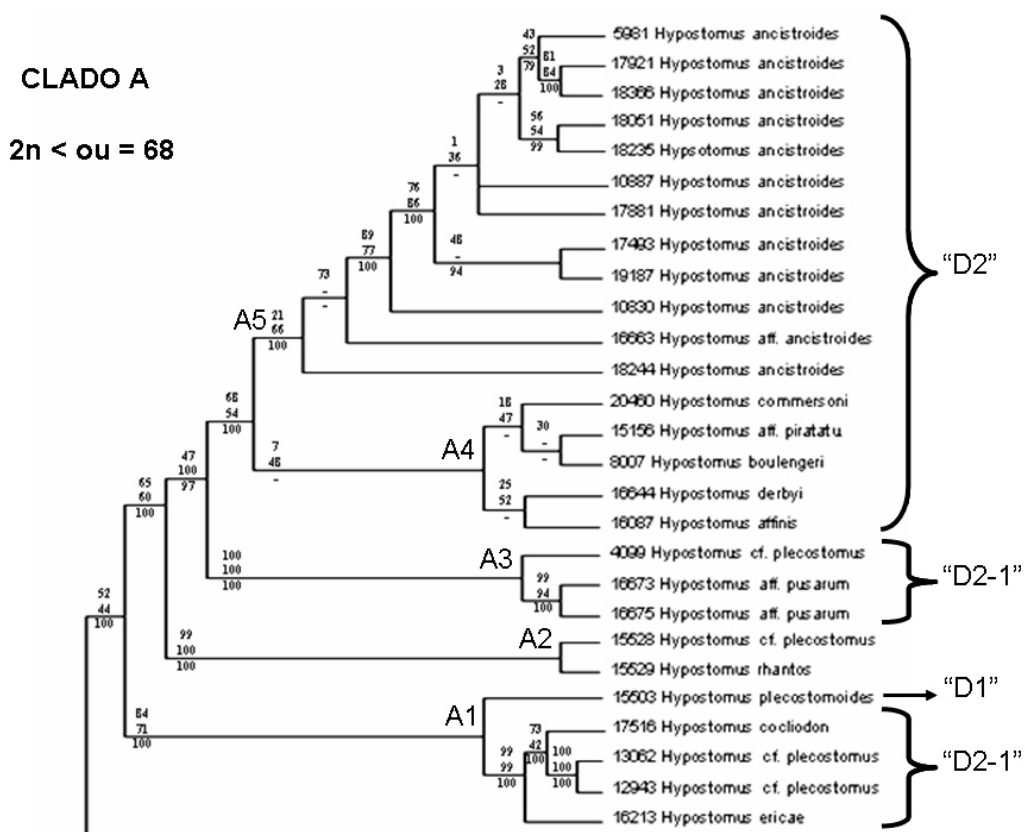
explicado através da ligação entre as bacias do Amazonas com as bacias do Sul do Brasil, hoje não ligadas, devido a eventos de separação por volta de 11,8-10 Ma (Montoya-Burgos, 2003). Esses eventos foram datados através de relógio molecular, utilizando seqüências de DNA, este evento vicariante (Montoya-Burgos, 2003).

O clado A-2 apresenta *H. cf. plecostomus* (Bacia do rio Orinoco) e *H. rhantos* (Bacia do rio Orinoco) (Figuras 30 e 32) forma um grupo irmão do grupo formado pelos cladros A-3, A-4 e A5. (Figuras 30 e 32). O clado A-3, composto por *H. cf. plecostomus* (Bacia do rio Amazonas) e *H. aff. pusarum* (Bacia do Nordeste) faz parte do clado “D2-1” (Figuras 28, 30 e 32) descrito por Montoya-Burgos (2003).

O clado A-4 forma dois subgrupos (Figuras 30 e 32). O primeiro apresenta *H. commersoni* (Bacia Costeira da Costa Oriental), irmão de *H. aff. piratatu* (Bacia do rio Paraguai) mais *H. boulengeri* (Bacia do rio Paraguai). Estas três espécies formam grupo irmão com o segundo grupo composto por *H. derbyi* (Bacia do rio Iguaçu) e *H. affinis* (Bacia do rio Paraíba do Sul). Este clado A-4 apresenta ancestralidade comum compartilhada com *H. ancistroides* (clado A-5). Esta proximidade já havia sido observada antes no clado “D2” (Figuras 28, 30 e 32) proposto em Montoya-Burgos (2003). Esse arranjo já havia sido sugerido também por Muller e Weber (1992), reunindo estes no grupo *Hypostomus plecostomus*.

Citogeneticamente, no clado A-5 (Figuras 28, 30 e 32) são encontradas populações dos rios Paraná, Paranapanema e Piracicaba para *H. ancistroides*. Em nossos dados, ainda não publicados (Capítulo 1) e na literatura, são encontrados apenas números diplóides  $2n=68$  (Artoni e Bertollo, 1996). Dessa forma, os dados citogenéticos vem somar-se aos caracteres de DNA mitocondrial e nuclear para sustentar a hipótese de monofilia de *H. ancistroides*.

As análises de isoenzimas (Zawadzki *et al.*, 1999 e Zawadzki *et al.*, 2001), sugerem que *H. commersoni* (Bacia da costa Oriental - clado A-4) e *H. derbyi* (Bacia do rio Iguaçu – clado A-4) são mais próximos entre si do que cada um deles com *H. myersi* (Bacia do rio Iguaçu), o que é sustentado por nossa hipótese (Figuras 30, 32 e 35), sendo que este faz parte do segundo grande grupo de *Hypostomus* sustentado por nossa análise (clado B) e aqueles do primeiro grupo (clado A).



**Figura 32.** Esquema da hipótese filogenética para *Hypostomus* apresentando o clado A e suas divisões (A1, A2, A3, A4 e A5), comparando com a hipótese de Montoya-Burgos (2003), que divide em quatro clados (D1, D2, D3 e D4), de acordo a distribuição das espécies.

O clado B se divide em dois grandes subgrupos (subgrupo do clado B1 e o outro formado pelos clados B-2, B-3, B-4, B-5 e B-6) (Figuras 30 e 35). O clado B1 (Figuras 30 e 35) é composto por *H. aff. agna* (Bacia da Costa Oriental) a espécie mais basal deste agrupamento, que tem como grupo irmão o clado formado por *H. albopunctatus* (Bacia do rio Paranapanema), *H. strigaticeps* (Bacia do rio Paranapanema e Bacia do rio Tietê) e *H. aff. hermanni* (Bacia do rio Paranapanema). Esta última espécie apresenta-se em nossas análises em conflito com *H. strigaticeps* (Bacia do rio Paranapanema e Bacia do rio Tietê), sugerindo uma grande proximidade entre eles, fato ainda não observado em trabalhos anteriores. Porém, a espécie *H. strigaticeps* forma um grupo polifilético em nossas análises, sugerindo que este grupo forma um complexo de espécies, com suas relações ainda não estabelecidas.

O clado B-2 (Figuras 30 e 35) é composto por *H. cf. iheringi* (Bacia do rio Tietê) grupo irmão de *H. goyazensis* (Bacia do rio Araguaia). Este ramo B-2 é o segundo a divergir dentro do clado B.

O clado B-3 (Figuras 30 e 35) é composto por apenas *H. albopunctatus* (Bacia do Rio Paranapanema), grupo irmão dos cladros B-4, B-5 e B-6, podendo pertencer ao clado “D4” (Figuras 28, 30 e 35) apresentado por Montoya-Burgos (2003).

O clado B-4 (Figuras 30 e 35) é composto por *H. aff. margaritifera* (Bacia do rio São Francisco), *H. margaritifera* (Bacia do rio Paraná), *H. cf. iheringi* (Bacia do rio Paranaíba) e *H. margaritifera* (Bacia do rio Paranaíba), que se relacionam com *H. microstomus* (Bacia do rio Paraná) e com *H. strigaticeps* (Bacia do rio Mogi-guaçu). Contudo o conjunto de dados apresentando não é suficiente para inferir sobre o relacionamento destes, pois os valores de *bootstrap* são muito baixos.

O clado B-5 (Figuras 30 e 35) apresenta-se irmão do clado B-6 e a espécie *H. cf. topavae* (Bacia do rio Paraná) como a primeira a divergir dentro dele, porém com uma baixa sustentação estatística. *H. aff. nigromaculatus* (Bacia do rio Araguaia) se relaciona com *H. nigromaculatus* (Bacia do rio Paranapanema) mais *H. sp. E3* (Bacia do rio Paranaíba), porém também com baixa sustentação estatística. *H. regani* (Bacia do rio Mogi-Guaçu) e *H. cf. strigaticeps* (Bacia do rio Mogi-Guaçu) apresentaram-se em um clado com alto valor estatístico, sugerindo estreita relação entre estas duas espécies, ainda não observada na literatura, já que muitas de nossas análises estão sendo realizadas pela primeira vez. Porém esta relação sugere a necessidade de uma análise taxonômica mais detalhada deste grupo, pois as espécies da bacia do rio Mogi-Guaçu estão intimamente relacionadas, porém tanto *H. cf. strigaticeps* quanto *H. regani* não formam um grupo monofilético em nossas análises.

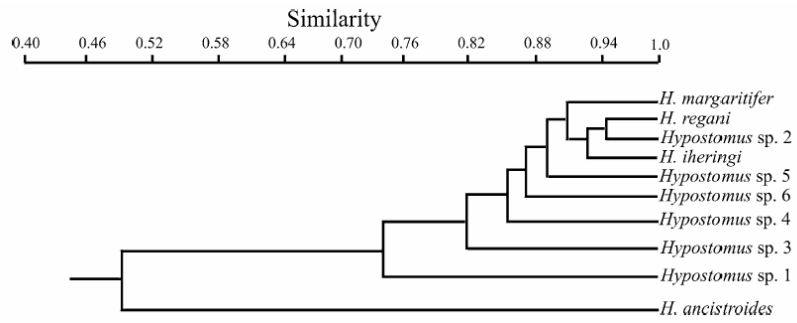
As espécies de *H. regani* e *H. nigromaculatus* são também encontradas no clado “D3-1” (Figuras 28, 30 e 35) apresentado por Montoya-Burgos (2003), que reúne espécies que estão no grupo Regani, proposto por Muller e Weber (2002), agrupando espécies com base em caracteres morfológicos, principalmente características dos dentes.

No clado B-6, sustentado por um baixo valor de *bootstrap* (Figuras 30 e 35), a primeira espécie a divergir foi *H. strigaticeps* (Bacia do rio Paranapanema), grupo irmão do composto por *H. regani* (Bacia do Paranapanema), *H. myersi* (Bacia do rio Iguaçu), *Hypostomus sp.* (Bacia do rio Paranapanema), *H. paulinus* (Bacia do rio Piracicaba), podendo pertencer ao clado “D3-1” (Figuras 28, 30 e 35) proposto em

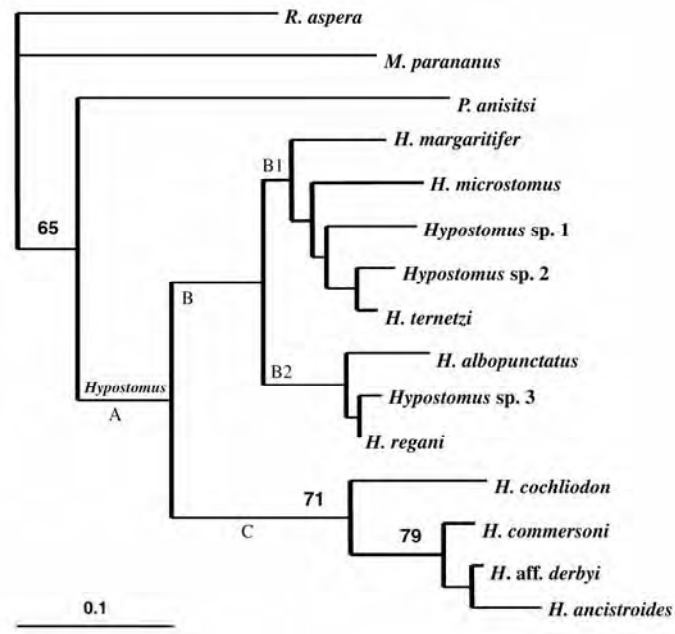
Montoya-Burgos (2003). Esta hipótese se relaciona bem com o clado “D3” (Figura 28) (Montoya-Burgos, 2003), pois são espécies que pertencem às bacias do Amazonas e Paraná, pode não ser o resultado de um evento de dispersão alopátrica ocorrido entre 11.4 e 10.5 Ma. Entretanto, os relacionamentos dentro deste grupo não são tão sustentáveis com os dados apresentados.

A análise de isoenzimas (Zawadzki *et al.*, 2008c) (Figura 33) propõe para espécies de *Hypostomus* do rio Corumbá (Bacia do rio Paranaíba) uma hipótese de relacionamento onde *H. margaritifer*, *H. regani* e *H. iheringi* são muito próximas geneticamente e distantes de *H. ancistroides*, de modo semelhante ao apresentado no presente trabalho (Figura 30).

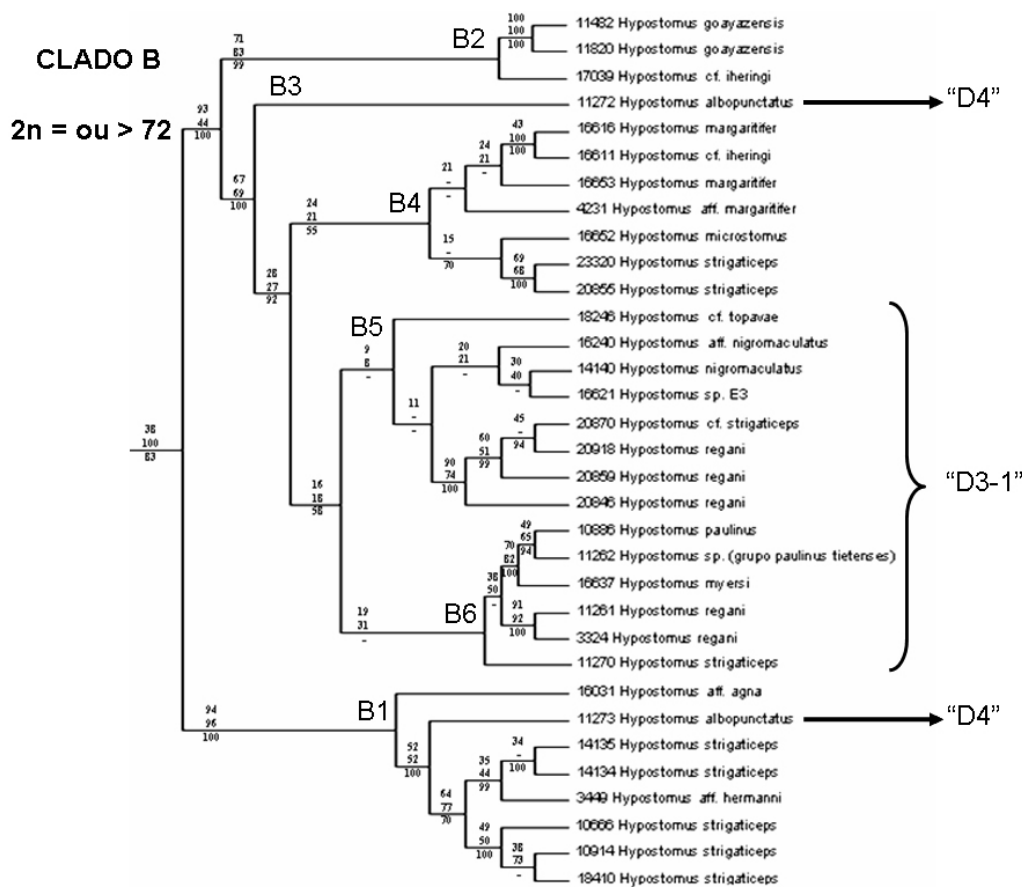
A hipótese com base em dados enzimáticos (Zawadzki *et al.*, 2005) (Figura 34) para Hypostominae do alto rio Paraná, mostra que *Hypostomus* é monofilético, tendo dois grandes clados, onde o clado B ainda se divide em dois grupos, B1 composto por *H. margaritifer*, *H. microstomus*, *H. ternetzi*, *Hypostomus* sp. 1 e *Hypostomus* sp. 2, grupo irmão do clado B2 composto por *H. albopunctatus*, *H. regani* e *Hypostomus* sp. 3. O clado C é composto por *H. cochliodon*, irmão de *H. commersoni*, *H. debyi* e *H. ancistroides*. Esta hipótese se assemelha muito à hipótese de nosso trabalho, mas com representantes de outras localidades (Figura 30).



**Figura 33.** Hipótese de relacionamento para *Hypostomus* com bases em dados enzimáticos propostos por Zawadzki *et al.* (2008c).



**Figura 34.** Hipótese de relacionamento para *Hypostomus* com bases em dados enzimáticos propostos por Zawadzki *et al.* (2005).



**Figura 35.** Esquema da hipótese filogenética para *Hypostomus* apresentando o clado B e suas divisões (B-1, B-2, B-3, B-4, B-5 e B-6), comparando com a hipótese de Montoya-Burgos (2003), que divide em quatro clados (D1, D2, D3 e D4), de acordo a distribuição das espécies.

*H. regani*, *H. strigaticeps* e *H. albopunctatus* foram apresentados não formando agrupamentos monofiléticos, onde se separam *H. regani* pelas bacias dos rios Mogi-Guaçu e Paranapanema. Embora *H. regani* não seja monofilético estas espécies possuem o mesmo número cariotípico conservado  $2n=72$  (Alves *et al.*, 2006), que é igual ao número cariotípico dos exemplares da bacia do Tietê. Essa bacia engloba a localidade tipo da espécie que é o rio Piracicaba, segundo Weber (2003), próxima à localidade tipo. Isso mostra que estas espécies não são diferentes citogeneticamente, mas podem ser diferenciadas com dados moleculares, mesmo contando com baixo suporte estatístico, por apresentar em *Hypostomus* cf. *strigaticeps* em posição interna a *H. regani*.

São encontrados números diplóides 72 e 74 para *H. strigaticeps* e *H. cf. strigaticeps* nesta mesma ordem subsequente para o rio Mogi-Guaçu e 72 para o rio



Tietê e Paranapanema. A localidade tipo para esta espécie é o rio Piracicaba (Weber, 2003). Encontrado próximo da localidade tipo (bacia do rio Tietê) o número diplóide 72 (nossos dados não publicados, Capítulo I). Portanto, é possível supor que números diplóides diferentes da localidade tipo não representam *H. strigaticeps*.

*H. albopunctatus* apresenta  $2n=74$  (Artoni e Bertollo, 1996) que é encontrado para o rio Mogi-Guaçu, não sendo possível inferir citogeneticamente para as espécies da nossa hipótese, pois não temos dados citogenéticos da bacia do rio Paranapanema e nem da localidade tipo que é o Rio Piracicaba (Weber, 2003), mas é possível com nossa hipótese filogenética indicar o não monofiletismos para estas espécies.

Estas hipóteses citogenéticas discutidas acima são também corroborada por outros trabalhos da literatura de citogenética, com os termos de “complexo de espécies”, “espécies crípticas”, “citótipos”, utilizado para designar espécies que são muito difíceis de serem diferenciadas morfológicamente, mas que apresentam caracteres genéticos e de comportamento que as diferenciam. Na citogenética são exemplos com números diplóides diferentes *Astyanax scabripinnis* (Mizoguchi e Matins-Santos, 1998), *Hoplias malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000 e Born e Bertollo, 2001), *Serrasalmus rhombeus* (Nakayama *et al.*, 2001).

No clado A (Figura 29) são encontrados números cromossômicos de  $2n=66$  e  $2n=68$ . *H. affinis* (Bacia do rio Paraíba do Sul) que tem  $2n=66$  (Kavalco *et al.*, 2004) no clado A-4 e no clado A-5 (Figura 32), são encontradas populações dos Rios Paraná, Paranapanema e Piracicaba para *H. ancistroides*, nossos dados não publicados (Capítulo 1) e na literatura são encontrados apenas números diplóides  $2n=68$  (Artoni e Bertollo, 1996).

Para o clado B são encontrados números cromossômicos que variam entre  $2n=72$  e  $2n=80$ . O clado B-1 (Figuras 35), *H. sp. aff. agna* (Bacia Costeira Oriental),  $2n=74$  (Nossos dados não publicados, Ver Capítulo 1), *H. albopunctatus* (Bacia do rio Mogi-Guaçu),  $2n=74$  (Artoni e Bertollo, 1996), *H. strigaticeps* (Bacia do rio Paranapanema e Tietê),  $2n=72$  (Nossos dados não publicados, Ver Capítulo 1).

Nos cladros B2 e B3 (Figuras 35) com *H. goyazensis* (Bacia do rio Araguaia), com  $2n=72$  (Alves *et al.*, 2006), *H. albopunctatus* (Bacia do rio Paranapanema), com  $2n=74$  (Artoni e Bertollo, 1996) e *H. strigaticeps* (Bacia do rio Mogi-Guaçu) com  $2n=72$ .

O clado B-4 (Figuras 35) apresenta *H. cf. topavae* (Bacia do rio Paraná),  $2n=80$  (Nossos dados não publicados, Ver Capítulo 1), *H. aff. nigromaculatus* (Bacia do rio

Araguaia) e *H. nigromaculatus* (Bacia do rio Paranapanema),  $2n=76$  (Rubert *et al.*, 2008) e *H. cf. strigaticeps* (Bacia do rio Mogi-Guaçu),  $2n=74$  (Nossos dados não publicados, Ver Capítulo 1), *H. regani* (Mogi-Guaçu),  $2n=72$  (Nossos dados não publicados, Ver Capítulo 1, Artoni e Bertollo, 1996).

Para o clado B-5 (Figuras 35) com *H. strigaticeps* (Bacia do Rio Paranapanema),  $2n=72$  (Presente estudo), *H. regani* (Bacia do rio Paranapanema),  $2n=72$  (Nossos dados não publicados, Ver Capítulo 1) e *H. paulinus*,  $2n=74$  (Michele *et al.*, 1977).

Com estes dados citogenéticos apresentados acima, comparados com a nossa hipótese filogenética é possível supor que os cladogramas A e B (Figuras 32 e 35), além de se diferenciarem filogeneticamente, também se diferenciam pela quantidade de cromossomos, onde no clado A tem números diplóides iguais ou inferiores a  $2n=68$  e no clado B tem números diplóides iguais ou maiores de  $2n=72$ .

## Conclusão

O gênero *Hypostomus* que tem *H. faveolus* como mais basal é monofilético e pode ser dividido em dois grandes grupos, que tem *H. faveolus* como mais basal. A espécie de *H. ancistroides* é monofilética, o mesmo não ocorrendo com *H. albopunctatus*, *H. regani*, *H. margaritifera* e *H. strigaticeps*. A hipótese biogeográfica de Montoya-Burgos (2003), que divide o gênero em quatro cladogramas, revela ser muito similar com a hipótese apresentada no presente trabalho.

Os dados de número de cromossomos encontrados na literatura e apresentados revelam ser úteis nos agrupamentos e separação de espécies crípticas, mas não ajuda em alguns casos.

Os dados citogenéticos analisados das comparações com a nossa hipótese filogenética, permitem supor que os cladogramas A e B, além de se diferenciarem filogeneticamente, também se diferenciam pela quantidade de cromossomos. No clado A as espécies apresentam números diplóides iguais ou inferiores a  $2n=68$ , enquanto no clado B apresentam números diplóides iguais ou maiores que  $2n=72$ .

Hipóteses formuladas a partir de dados obtidos com Isoenzimas corroboram nossas análises, apesar das espécies não pertencerem às mesmas bacias em alguns casos.

Nossas hipóteses filogenéticas, aliadas à caracteres morfológicos, citogenéticos e moleculares vem contribuir para a caracterização de espécies pouco estudadas e muitos

parecidas morfológicamente, contribuindo para uma melhor compreensão das relações evolutivas entre as espécies de *Hypostomus*.

## Agradecimentos

Agradecemos a Claudio Henrique Zawadzki pela identificação e doação de tecidos dos exemplares e a José A. Senhorini e José Carlos Pansonato Alves pela doação de exemplares. Ao CEPTA (Centro de Pesquisa em Treinamento em Aqüicultura da Fundação Padre Anchieta). À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Investigação Científica (CNPq) e Coordenadoria de Apoio à Pós-Graduação e Pesquisa (CAPES).

**Tabela 4.** Relação das espécies analisadas, procedência de coleta, número do exemplar (Ne), número de depósito na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP – Botucatu – SP e da coleção de peixes do Nupélia (NUP) da UEM - Maringá – PR, tamanho das seqüências obtidas para os genes Citocromo b (Cit. *b*) (seqüências completas) e 16S rRNA (16S) (seqüências parciais) mitocondriais e F-Reticulon 4 (F-R.4) (seqüências parciais) nuclear.

<b>Espécie</b>	<b>Procedência</b>	<b>Ne</b>	<b>LBP/NUP</b>	<b>Cit. <i>b</i></b>	<b>16S</b>	<b>F-R.4</b>
<b>Hypostominae</b>						
<i>Aphanotorulus unicolor</i>	Rio Araguaia, Aragarças GO. (Bacia do rio Araguaia)	28159	LBP 5769	921	610	703
<b>Ancistrinini</b>						
<i>Ancistrus</i> sp.	Rio Iguaçu, Reservatório de Caxias, PR. (Bacia do rio Iguaçu)	16647	NUP 701	921	631	-
<i>Lithoxancistrus</i> sp.	Rio Piranha-Açu, RN. (Bacia do Nordeste)	16682	NUP 4793	921	624	702
<i>Megalancistrus aculeatus</i>	Rio Paranapanema, Salto Grande, SP. (Bacia do rio Paranapanema)	12132	LBP 1668	921	619	702
<i>M. parananus</i>	Rio Manso, MT. (Bacia do rio Paraguai)	16659	NUP 1012	921	620	702
<b>Hypostomini</b>						
<i>Hypostomus affinis</i>	Lagoa Feia, Campo dos Goytacazes, RJ. (Bacia do rio Paraíba do Sul)	16087	LBP 2371	921	622	705
<i>H. albopunctatus</i>	Rio Paranapanema, Andirá, PR. (Bacia do rio Paranapanema)	11272	LBP 1678	921	600	708

<i>H. albopunctatus</i>	Rio Paranapanema, Andirá, PR. (Bacia do rio Paranapanema)	11273	LBP 1678	921	603	704
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Canta Galo, Ipeúna, SP. (Bacia do rio Piracicaba)	5981	LBP 473	921	606	709
<i>H. ancistroides</i>	Rio Corumbataí, SP. (Bacia do rio Piracicaba)	10887	LBP 2544	921	619	706
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Campo Novo, Bauru, SP. (Bacia do rio Tietê)	17921	LBP 4205	921	591	706
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Jacutinga, Bofete, SP. (Bacia do rio Tietê)	18366	LBP 4204	921	608	708
<i>H. ancistroides</i>	Rio Capivara, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	18051	LBP 3244	921	580	695
<i>H. ancistroides</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	18235	LBP 3243	921	615	695
<i>H. ancistroides</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	17881	LBP 4206	921	618	706
<i>H. ancistroides</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	19187	LBP 3242	921	623	703
<i>H. ancistroides</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	10830	LBP 2147	921	613	674
<i>H. ancistroides</i>	Rio Paraitinga, Salesópolis, SP. (Bacia do rio Tietê)	17493	LBP 3248	921	617	706
<i>H. ancistroides</i>	Córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná)	18244	LBP 3250	921	617	680
<i>H. boulengeri</i>	Rio Paraguai, Poconé, MT. (Bacia do rio Paraguai)	8007	LBP 679	921	591	707
<i>H. commersoni</i>	Pequeno Arroio Sem Nome, Rio Grande, RS. (Bacia da Costa Oriental)	20460	LBP 3324	921	615	697
<i>H. derbyi</i>	Rio Iguaçu, Reservatório de Caxias, PR. (Bacia do rio Iguaçu)	16644	NUP 677	921	620	694
<i>H. faveolus</i>	Rio Insula, Barra do Garças, MT. (Bacia do rio Araguaia)	13156	LBP 1839	921	592	706
<i>H. plecostomoides</i>	Laguna de Castilleros, Caiçara del Orinoco, Bolivar, Venezuela (Bacia do rio Orinoco)	15503	LBP 2197	921	588	686
<i>H. aff. ancistroides</i>	Ribeirão Maringá, Maringá, PR. (Bacia do rio Paraná)	16663	NUP 4776	921	579	704
<i>H. aff. agna</i>	Córrego Ribeirão	16031	LBP 2360	921	621	684

<i>H. aff. hermanni</i>	Cavalo, Jaraguá do Sul, SC. (Bacia da Costa Oriental) Reservatório de Jurumirim, Itatinga, SP. (Bacia do rio Paranapanema)	3449	LBP 116	921	618	687
<i>H. aff. margaritifera</i>	Rio Paracatu, Brasilândia, MG. (Bacia do rio São Francisco)	4231	LBP 258	921	607	686
<i>H. aff. nigromaculatus</i>	Córrego Fundo, Barra do Garças, MT. (Bacia do rio Araguaia)	16240	LBP 2448	921	618	690
<i>H. aff. piratatu</i>	Rio Paraguai, Porto Jofre, MS. (Bacia do rio Paraguai)	15156	LBP 2156	921	613	721
<i>H. cf. plecostomus</i>	Igarapé S. Francisco, Rio Branco, AC. (Bacia do Rio Amazonas)	4099	LBP 221	921	615	703
<i>H. cf. plecostomus</i>	Laguna de Castilleros, Caiçara del Orinoco, Bolivar, Venezuela (Bacia do Rio Orinoco)	15528	LBP 2198	921	604	706
<i>H. cf. plecostomus</i>	Córrego Voadeira, Barra do Garças, MT. (Bacia do rio Araguaia)	17516	NUP 915	921	616	704
<i>H. cf. plecostomus</i>	Córrego Sem Nome, Barra do Garças, MT. (Bacia do rio Araguaia)	12943	LBP 1827	921	626	691
<i>H. cf. pusarum</i>	Rio Piranha-Açu, RN. (Bacia do Nordeste)	16673	NUP 4597	921	598	706
<i>H. cf. pusarum</i>	Rio Piranha-Açu, RN. (Bacia do Nordeste)	16675	NUP 4597	921	613	703
<i>H. cf. iheringi</i>	Rio Corumbá, GO. (Bacia do rio Paranaíba)	16611	NUP 6677	921	621	687
<i>H. cf. iheringi</i>	Rio Santa Bárbara, Buritama, SP. (Bacia do rio Tietê)	17039	LBP 2638	921	616	691
<i>H. cf. strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	20870	LBP 4209	921	605	705
<i>H. cf. topavae</i>	Córrego Carrapato, Penápolis, SP. (Bacia do rio Paraná)	18246	LBP 3249	921	622	686
<i>H. sp. E3</i>	Rio Corumbá, GO. (Bacia do rio Paranaíba)	16621	NUP 4296	921	620	684
<i>H. sp. (grupo paulinus tietensis)</i>	Rio Paranapanema, Andirá, PR. (Bacia do rio Paraná)	11262	LBP 1681	921	603	682

<i>H. coeliodon</i>	Rio Manso, MT. (Bacia do rio Paraguai)	17516	NUP 915	921	619	704
<i>H. ericae</i>	Córrego Fundo, Barra do Garças, MT. (Bacia do rio Araguaia)	16213	LBP 2424	921	600	706
<i>H. goyazensis</i>	Rio Vermelho, Goiás, GO. (Bacia do rio Araguaia)	11482	LBP 2150	921	617	688
<i>H. goyazensis</i>	Rio Vermelho, Goiás, GO. (Bacia do rio Araguaia)	11820	LBP 1656	921	618	676
<i>H. margaritifera</i>	Rio Corumbá, GO. (Bacia do Paranaíba)	16616	NUP 2682	921	620	687
<i>H. margaritifera</i>	Rio Paraná, Guaíra, PR. (Bacia do rio Paraná)	16653	NUP 2572	921	598	685
<i>H. microstomus</i>	Rio Paraná, Guaíra, PR. (Bacia do rio Paraná)	16652	NUP 1725	921	612	685
<i>H. myersi</i>	Rio Iguaçu, Reservatório de Caxias, PR. (Bacia do rio Iguaçu)	16637	NUP 680	921	622	688
<i>H. nigromaculatus</i>	Córrego Hortelã, Botucatu, SP. (Bacia do rio Paranapanema)	14140	LBP 1993	921	607	687
<i>H. paulinus</i>	Rio Corumbataí, SP. (Bacia do rio Piracicaba)	10886	LBP 2548	921	620	667
<i>H. regani</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	20918	LBP 4210	921	612	688
<i>H. regani</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	20859	LBP 2943	921	608	688
<i>H. regani</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	20846	LBP 3943	921	615	691
<i>H. regani</i>	Rio Paranapanema, Andirá, PR. (Bacia do rio Paraná)	11261	LBP 1672	921	618	687
<i>H. regani</i>	Reservatório de Jurumirim, Itatinga, SP. (Bacia do rio Paranapanema)	3324	LBP 113	921	608	688
<i>H. rhanos</i>	Rio Cataniapo, Porto Ayacucho, Venezuela (Bacia do rio Orinoco)	15529	LBP 2185	921	618	681
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)	23320	LBP 4209	921	611	684
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Mogi-Guaçu,	20855	LBP 3945	921	609	688

	Pirassununga, SP. (Bacia do rio Mogi-Guaçu)						
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Paranapanema, Andirá, PR. (Bacia do rio Paraná)	11270	LBP 1673	921	607	670	
<i>H. strigaticeps</i>	Córrego Hortelã, Botucatu, SP. (Bacia do rio Paranapanema)	14135	LBP 1992	921	601	686	
<i>H. strigaticeps</i>	Córrego Hortelã, Botucatu, SP. (Bacia do rio Paranapanema)	14134	LBP 1992	921	607	686	
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Araquá, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	10666	LBP 2148	921	618	708	
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Alambari, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	10914	LBP 2543	921	615	682	
<i>H. strigaticeps</i>	Rio Alambari, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	18410	LBP 4202	921	604	686	
<b>Pterygoplichtini</b>							
<i>Glyptoperichthys gibbiceps</i>	Laguna de Castilleros, Caicara del Orinoco, Bolivar, Venezuela (Bacia do rio Orinoco)	15527	LBP 2174	921	618	703	
<i>Liposarcus anisitsi</i>	Rio Tietê, Barra Bonita, SP. (Bacia do rio Tietê)	5859	LBP 452	921	605	704	
<i>L. anisitsi</i>	Rio Manso, MT. (Bacia do rio Paraguai)	17522	NUP 2555	921	587	703	
<i>L. anisitsi</i>	Rio Capivara, Botucatu, SP. (Bacia do rio Tietê)	18042	LBP 3252	921	621	683	
<i>Pterygoplichthys edentaculus</i>	Rio Paracatu, Três Marias, MG. (Bacia do rio São Francisco)	4233	LBP 275	921	618	698	
<i>P. edentaculus</i>	Rio Paracatu, Três Marias, MG. (Bacia do rio São Francisco)	4234	LBP 275	921	621	702	
<b>Neoplecostominae</b>							
<i>Kronichthys</i> sp.	Riacho Sítio do Meio, Mongaguá, SP. (Bacia da Costa Oriental)	12885	LBP 1766	921	619	705	
<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Rio Corumbá, GO. (Bacia do rio Paranaíba)	16627	NUP 2528	921	609	691	
	Tamanho Médio (pb)			921	579 a 631	676 a 721	



***CONCLUSÕES***



## 5 CONCLUSÕES

1. As espécies do gênero *Hypostomus* apresentam uma grande variedade de número de cromossomos e diversidade morfológica, sugerindo que ocorreram rearranjos cromossômicos dos tipos fissão cêntrica e inversão pericêntrica na diversificação, pelo grande aumento de cromossomos do tipo subtelocêntricos e acrocêntricos.
2. A NOR múltipla encontrada em posição terminal na maioria das espécies, deste gênero, sugere que seja esta uma condição derivada para Loricariidae.
3. As espécies do gênero *Hypostomus* são muito parecidas morfológicamente, sendo muito difícil sua identificação (espécies crípticas). Do ponto de vista taxonômico, o estudo citogenético tem-se revelado de grande valia, uma vez que diversos grupos, identificados apenas com base em estudos morfológicos, mostram-se formados por diversas unidades, possivelmente isoladas geneticamente.
4. Na nossa hipótese filogenética, a espécie *Aphanotorulus unicolor* (Bacia do rio Araguaia), encontra-se como grupo irmão de Pterygoplichthini mais o gênero *Hypostomus*, não corroborando a hipótese de Armbruster (2004) de que *Aphanotorulus* estaria inserida no gênero *Hypostomus*.
5. Na nossa hipótese filogenética, Pterygoplichthini é apontado como um grupo monofilético, irmão do gênero *Hypostomus*, não corroborando a proposição de Armbruster (2004).
6. Em nossa hipótese filogenética é proposto que o gênero *Hypostomus* que tem *H. faveolus* como mais basal é monofilético e pode ser dividido em dois grandes grupos.
7. As relações filogenéticas para o gênero *Hypostomus* apresentadas no presente trabalho revelam que a espécie *H. ancistroides* é monofilética, o mesmo não ocorrendo com *H. albopunctatus*, *H. regani*, *H. margaritifer* e *H. strigaticeps*.
8. A hipótese biogeográfica de Montoya-Burgos (2003), que divide o gênero *Hypostomus* em quatro clados, revela ser muito similar ao proposto com a nossa hipótese filogenética.
9. Os dados de número de cromossomos encontrados na literatura e nossos dados apresentados no capítulo 1, comparados com nossa hipótese filogenética,

revelam ser úteis nos agrupamentos e separação de espécies crípticas, mas não ajuda em alguns casos.

10. A partir dos dados citogenéticos encontrados, comparados com a nossa hipótese filogenética, é possível verificar que os clados A e B, além de se diferenciarem filogeneticamente, também se diferenciam pela quantidade de cromossomos, onde no clado A tem números diplóides são iguais ou inferiores a 68, enquanto no clado B, os números diplóides são iguais ou maiores que 72.
11. Hipóteses formuladas a partir de dados obtidos pela análise com Isoenzimas corroboram os resultados das nossas análises, apesar das espécies não pertencerem às mesmas bacias hidrográficas em alguns casos.
12. A nossa hipótese filogenética aliada a caracteres morfológicos, citogenéticos e moleculares vem contribuir para a caracterização de espécies pouco estudadas e muitas parecidas morfológicamente, contribuindo para a melhor compreensão das relações evolutivas entre as espécies de *Hypostomus*.



## ***REFERÊNCIAS***

## 6 REFERÊNCIAS

- Alexander, R.M. (1965). Structure and function in catfish. *J. Zool.*, 148: 88-152.
- Almeida Toledo, L.F. (1978). Contribuição à citogenética dos Gymnotoidei (Pisces, Ostariophysi). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 128p.
- Almeida-Toledo, L.F., Viegas-Pequignot, E., Foresti, F., Toledo, S.A., Dutrillaux, B. (1988). BrdU replication patterns demonstrating chromosome homeologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 48: 117-120.
- Alves, A.L., Oliveira, C., Foresti, F. (2003). Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*, 56(1): 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-Gomes, J., Ortí, G., Haygood, M., Heiligenberg, W., Meyer, A. (1995). Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 298-318.
- Armbruster, J.W. (2004). Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *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(1): 81-90.
- Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica*, 106: 209-1999.
- Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C. (2001). Trends in the Karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134: 201-210.
- 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.
- Bertollo, L.A.C., Born, G.G., Dergam, J.A., Fenocchio, A.S., Moreira-Filho, O. (2000). A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographical distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8: 603-613.
- Bertollo, L.A.C., Born, G.G., Dergam, J.A., Fenocchio, A.S., Moreira-Filho, O. (2000) A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8: 603-613.
- Born, G.G., Bertollo, L.A. (2001) Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with  $2n = 42$  chromosomes. *Genetica*, 110: 1-9.
- Britto, M.R. (2002). Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 512 pp.
- Burgess, W.E. (1989). An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A Preliminary Survey of Siluriformes. T.F.H. Publications, Neptune, NJ.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A., DeSalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 36: 135-153.
- Carvalho, M.L., Oliveira, C., Foresti, F. (1998). Nuclear content of thirty species of Neotropical fishes. *Genet. Mol. Biol.*, 21: 47-54.
- 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. *Genet. Mol. Res.*, 7(3): 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.
- Chubb, A.L. (2004). New nuclear evidence for the oldest divergence among neognath birds: the phylogenetic utility of ZENK (i). *Mol. Biol. Evol.*, 30: 140-151.
- Cole, C.J., Leavens, C.R. (1971). Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetology*, Van Nuys, 3: 102.
- de Pinna, M.C. (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi):

- historical overview and synthesis of hypotheses. IN: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, pp. 279-330.
- Delany, M.E., Bloom, S.E. (1984). Replication banding patterns in the chromosomes of rainbow trout. *J. Heredity*, 75: 431-434.
- Delsuc, F., Stanhope, M.J., Douzery, E.J.P., (2003). Molecular systematics of armadillos (Xenarthra, Dasypodidae): contribution of maximum likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28: 261-275.
- Diogo, R. (2003). Higher-level phylogeny of Siluriformes - An overview. In: Arratia, G.; Kapoor, B.G.; Chardon, M.; Diogo, R. (Eds.). *Catfishes*. London: Science Publishers, pp.353-384.
- Edgar R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput Nucleic Acids Research, 32: 1792-1797. Disponível em (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>). Acesso em 05/02/2008.
- Eschmeyer, W.N. (1998). *Catalog of fishes*. Vol. 3. California Academy of Science, California.
- Felsenstein, J., (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fernandes-Matioli, F.M.C. (1996). Análises citogenéticas e dos padrões de descargas dos órgãos elétricos (DOEs) no gênero *Gymnotus* (Pisces, Gymnotidae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 160 pp.
- Ferraris CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418: 1-628.
- Ferraris, C. J. (1998). Catfishes and knifefishes. IN: *Encyclopedia of fishes* (Paxton, J.R., Eschmeyer, W.N., eds.). 2a. ed., Academic Press, San Diego, pp. 106-112.
- Ferreira, D.C., Chiachio, M.C., Takako, A.K., Andreato, A.A., Foresti, F., Oliveira, C. (2005) Comparative cytogenetics of nine species of Hypoptomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): the importance of structural rearrangements in chromosome evolution. *Caryologia*, 58(4): 387-395.
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool. J. Linn. Soc. Lond.*, 72: 297-353.
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1996). Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). In: Stiassny, M.L.J., Parenti, L. R., Johnson, G. D. (Eds). *Interrelationships of fishes*. San Diego: Academic Press, pp. 209-49.
- Foresti, F., Almeida Toledo, L.F., Toledo Filho, S.A. (1984). Chromosome studies in *Gymnotus carapo* and *Gymnotus* sp. (Pisces, Gymnotidae). *Caryologia*, 37:141-146.
- Foresti, F., Almeida Toledo, L.F., Toledo Filho, S.A. (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell Genet.*31:137-144.
- Futuyma, D.J. (1992). *Biologia Evolutiva*. 2 ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq.
- Giuliano-Caetano, L. (1986). Estudo citogenético em *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) de diferentes bacia hidrográficas brasileira. Tese de Mestrado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos. 84 p.
- Giuliano-Caetano, L. (1998). Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae). PhD. Thesis. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos.
- Gold, J.R., Li, Y.C., Shipley, N.S., Powers, P.K. (1990). Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563-575.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hardman M (2005) The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Mol. Evol.*, 37: 700-720.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetics systematics*. University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
- Hillis, D.M., Mable, B.K., Moritz, C. (1996). Applications of molecular systematics. IN: *Molecular Systematics*. (Hillis, D.M, Moritz, C., Mable, B.K., eds). Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA, pp. 515-543.
- Howell, W.M., Black, D.A. (1981). Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Hrbek, T., Küçük, F., Frickey, T., Stölting, K.N., Wildekamp, R.H., Meyer, A. (2002). Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of central Anatolia, Turkey. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 25: 125-137.

- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K., Nishida, M. (2001). A mitogenetic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 20: 275-285.
- Jianxun, C., Xiuhai, R., Qixing, Y. (1991). Nuclear DNA content variation in fishes. *Cytologia*, 56: 425-429.
- Kavalco, K.F., Pazza, R., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O. (2004) Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas*, 141: 237-242.
- Kavalco, K.F., Pazza, R., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O. (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes) *Heredity*, 94: 180-186.
- Klinkhardt, M., Tesche, M., Greven, H. (1995). Database of fish chromosomes. Magdeburg: Westarp-Wiss., 237 pp.
- Kocher, T.D., Stepien, C.A. (1997). *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, London, U.K.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 6196-6200.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I., Nei, M. (2001). MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis, ver. 2.1. Pennsylvania State University, University Park, and Arizona State University, Tempe.
- Lavoué, S., Sullivan, J.P., Hopkins, C.D., 2003. Phylogenetic utility of the first two introns of the S7 ribosomal protein gene in African electric fishes (Mormyroidea: Teleostei) and congruence with other molecular markers. *Biol. J. Linn. Soc.*, 78: 273-292.
- Lee, M.R., Elder, F.F.B. (1980). Yeast simulation for bone marrow mitosis for cytogenetic investigation. *Cytogenet Cell Genet*, 26: 36-40.
- Levan, A., Fregda, K., Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas, Landskrona*, v.52, p.201-220.
- Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press Inc., New York, 1272 p.
- Lovejoy, N.R., Collete, B.B., 2001. Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia*, 324-338.
- Maistro, E.L., Oliveira, C., Foresti, F. (1998). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology*, 21: 201-206.
- Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (1998). Phylogeny and classification of neotropical fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- Martinez, E.R.M., Nirchio, M., Granado, A., Foresti, F., Oliveira, C. (2008) Cytogenetic analysis of three catfish species of the family Pseudopimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31(3): 692-696.
- Martinez, E.R.M., Oliveira, C. and Foresti, F. (2004) Cytogenetic analyses of *Pseudopimelodus mangurus* (Teleostei, Siluriformes, Pseudopimelodidae). *Cytologia*, 69: 419-424.
- Martinez, E.R.M., Oliveira, C., Júlio-Junior, H.F. (2004) Cytogenetic analysis of species of the genera *Acestrorhynchus*, *Oligosarcus* and *Rhaphiodon* (Teleostei: Characiformes). *Caryologia*, 57(3): 294-299.
- Mazzoni, R., Caramaschi, U., Weber, C. (1994). Taxonomical revision of the species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) from lower rio Paraíba do Sul, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revue suisse de Zoologie*, 101(1): 3-18.
- Mendel, J., Lusk, S., Vasil'eva, E.D., Vasil'ev, V.P., Lusková, V., Ekmekci, F.G., Erk'akan, F., Ruchin, A., Koščo, J., Vetešník, L., Halacjka, K., Šanda, R., Pashkov, A.N., Reshetnikov, S.I. (2008). Molecular phylogeny of the genus *Gobio* Cuvier, 1816 (Teleostei: Cyprinidae) and its contribution to taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 1061–1075.
- Michele, J.L., Takahashi, C.S., Ferrati, I. (1977). Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia*, 42: 539-546.
- Misawa, K., Janke, A., (2003). Revisiting the Glires concept-phylogenetic analysis of nuclear sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 320-327.
- Mizoguchi, S.M.H.N., Martins-Santos, I.C. (1998) Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, 21(1).
- 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.

- Montoya-Burgos, J.I., Muller, S., Weber, C., Pawlowski, J. (1998). Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) basen on mitochondrial rRNA gene sequences. IN: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). Porto Alegre: EDIPUCRS, pp. 363-375.
- Montoya-Burgos, J.I., Muller, S., Weber, C., Pawlowski, J. (1997). Phylogenetic relationship between Hypostominae and Ancistrinae (Siluroidei: Loricariidae): first results from mitochondrial 12S and 16S rRNA gene sequences. *Rev. Suis. Zool.* 104(1): 185-198.
- Montoya-Burgos, J.I., Weber, C., Le Bail, P.-Y. (2002). Phylogenetic relationships within *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and related genera based on mitochondrial D-loop sequences. *Rev. Suis. Zool.* 109(2): 369-382.
- Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C., (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Revista Brasileira de Genética*, 14: 331-358.
- Muller, S., C. Weber, (1992). Les dents des sous-familles Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. *Rev. suis. Zool.* 99(4): 747-754.
- Murphy, W.J., Collier, G.E. (1997). A molecular phylogeny for Aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): the role of vicariance and the origins of annualism. *Mol. Biol. Evol.*, 14: 790-799.
- Murphy, W.J., Thomerson, J.E., Collier, G.E. (1999). Phylogeny of the neotropical killifish family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13: 289-301.
- Nakayama, C., Jégu, M., Porto, J.I.R., Feldberg, E. (2001) Karyological Evidence for a Cryptic Species of Piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. *Copeia*, 3: 866–869.
- Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, USA.
- Nelson JS. (2006) *Fishes of the World*, 4th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Oliveira C and Gosztonyi AE (2000) A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomistidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriforms. *Caryologia*. 53(1): 31-37.
- Oliveira, C., Almeida Toledo, L.F., Foresti, F., Britski, H.A., Toledo Filho, S.A. (1988). Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Rev. Brasil. Genet.*, 11: 577-624.
- Oliveira, C., Almeida-Toledo, L., Foresti, F. (2006) Karyotypic evolution in Neotropical fishes. *In: E. Pisano; C. Ozouf-Costaz; F. Foresti; B.G. Kapoor (Org.). (2007) Fish Cytogenetics*. 1ª ed.: Ed., 2006, Enfield, 1: 111-164.
- Oliveira, C., Chew, J.S.K., Porto-Foresti, F., Dobson, M., Wright, J.M. (1999). A LINE2 repetitive DNA sequence from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: sequence analysis and chromosomal distribution. *Chromosoma*, 108(7): 457-468, 1999.
- 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 spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotropical Ichthyology*, 4(1):93-97.
- Orti, G. (1997). Radiation of characiform fishes: evidence from mitochondrial and nuclear DNA sequences. IN: *Molecular Systematics of Fishes*. (Kocher, T.D. e Stephien, C.A., eds). Academic Press, London, U.K., 1-11.
- Orti, G., Meyer, A. (1996). Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 556-573.
- Orti, G., Meyer, A. (1997). The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol.*, 46: 75-100.
- 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.
- Paiva, S., Renesto, E., Zawadzki, C.H. (2005). Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3): 370-375
- Parkinson, C.L. (1999). Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Copeia*, 576-586.
- Paxton, J.R., Eschmeyer, W.N. (1998). *Encyclopedia of fishes*. 2a. ed., Academic Press, San Diego.
- Phillips, R.B., Ihssen, P.E. (1985). Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Cytogen. Cell Genet.* 39: 14-18.
- Posada, D., Crandall, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

- Rastorguev, S., Mugue, N., Volkov, A., Barmintsev, V., 2008. Complete mitochondrial DNA sequence analysis of Ponto-Caspian sturgeon species. *J. Appl. Ichthyol.*, 24 (1): 46–49.
- Reeder, T.W. (1995). Phylogenetic relationships among phrynosomatid lizards as inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences: substitutional bias and information content of transitions relative to transversions. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 4: 203-222.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris-Jr., C.J. (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central. Porto Alegre : EDIPUCRS. 742 p.
- Reis, R.E., Pereira, E.H.L., Armbruster, J.H. (2006) Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 147: 277–299
- Reis, R.E., Weber, C., Malabarba, L.R. (1990) Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue Suisse Zool.*, 97(3): 729-766.
- Renesto, E., Zawadzki, C.H., Paiva, S. (2007) Allozyme differentiation and relationships within *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the upper Paraguay River basin. *Brazil Biochemical Systematics and Ecology* 35: 869-876
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Rubert, M., Zawadzki, C.H., Giuliano-Caetano, L. (2008) Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, 6(1):93-100.
- Savage, J.M. (1995). Systematics and the biodiversity crisis. *BioScience*, 45: 673-679.
- Schaefer, S.A. (1987). Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogenetic analysis of the loricariidae subfamilies (Pisces: Siluroidei). *Contributions in Science*, Los Angeles, 394: iii-iv, 1-31.
- Schaefer, S.A. (1998). Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 375-400.
- Schubart, O., (1964). Sobre algumas Loricariidae da bacia do Rio Mogi-Guaçu. *Boletim do Museu Nacional*, 251: 1–19.
- Sequin application Version 9.00. Disponível em (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Acesso em 10/02/2008.
- Shimabukuro-Dias, C.K., Oliveira, O., Reis, R.E., Foresti, F. (2004). Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 152-163.
- Slowinski, J.B., Lawson, R., 2002. Snake phylogeny: evidence from nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 194-202.
- Sola, L., Cataudella, S., Capanna, E. (1981). New developments in vertebrate cytology III. Karyology of bony fishes: a review. *Genetica*, 54: 285-328.
- Stephien, C.A., Dillon, A.K., Brooks, M.J., Chase, K.L., Hubers, A.N. (1997). The evolution of blennioid fishes based on an analysis of mitochondrial 12S rDNA. IN: *Molecular Systematics of Fishes*. (Kocher, T.D. e Stephien, C.A., eds). Academic Press, London, U.K., 245-270.
- Stock, D.W., Gibbons, J.K., Whitt, G.S. (1991). Strengths and limitations of molecular sequences comparisons for inferring the phylogeny of the major groups of fishes. *J. Fish Biol.*, 39: 225-236.
- Sullivan JP, Lundberg JG and Hardman M (2006) A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 41: 636-662
- Swofford, D.L. (2002). PAUP\* - Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Teeling, E.C., Madsen, O., Murphy, W.J., Springer, M.S., O'Brien, S.J., (2003). Nuclear gene sequences confirm an ancient link between New Zealand's short-tailed bat and South American noctilionoid bats. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 308-319.
- Teugels, G.G. (1996). Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei); an overview. *Aquat. Living Resour.*, 9: 9-34.
- Vari, R.P., Malabarba, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology: an overview. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 1-11.



- Vicari, M.R., Noletto, R.B., Artoni, R.F., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. (2008). Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. *Evolutionary and biogeographical inferences. Genetics and Molecular Biology*, 31 (1): 173-179.
- Vicari, M.R., Pazza, R., Artoni, R.F., Margarido, V.P., Bertollo, L.A.C. (2006). Cytogenetics and Biogeography: Considerations about the Natural Origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçú River. *Brazilian archives of biology and technology*, 49 (2): 297-303.
- Wagner, R.P., Maguire, M.P., Stallings, R.L. (1993). *Chromosomes: a synthesis*. Wiley-Liss, Inc., New York, 523 pp.
- Weber, C. (2003). SubFamily Hypostominae (Armored catfishes). In: Check list of the freshwater fishes of South America, eds.: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr., C.J. Porto Alegre: Edipucrs, 351-372.
- Weber, C., Montoya-Burgos, J.I. (2002) *Hypostomus fonchii* sp. n. (Siluriformes: Loricariidae) from Peru, a key species suggesting the synonymy of *Cochliodon* with *Hypostomus*. *Revue Suisse de Zoologie*, 109(2): 355-368.
- Xia, X., Xie, Z., (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92, 371-373.
- Zardoya, R., Meyer, A. (1997). The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of a “living fossil” the coelacanth (*Latimeria chalumnae*). *Genetics*, 146: 995-1010.
- 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 rio Xingu basins in central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6(3):395-402.
- Zawadzki, C.H., Machado, M.F.P.S., Renesto, E. (2001). Differential expression for tissue-specific isozymes in three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei: Loricariidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 911-922.
- Zawadzki, C.H., Renesto, E., Bini, L.M. (1999). Genetic and morphometric analyses of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the rio Iguaçú basin (Brazil). *Rev. Sui. Zool.*, 106(1): 91-105.
- Zawadzki, C.H., Renesto, E., Mateus, R.P. (2008c) Allozyme Analysis of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the Rio Corumbá, Upper Rio Paraná Basin, Brazil. *Biochem Genet.*
- Zawadzki, C.H., Renesto, E., Paiva, S., Lara-Kamei, M.C.S. (2004) Allozyme differentiation of four populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica*, 121: 251–257.
- 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. *Genetics and Molecular Biology*, 31(3): 767-771.
- Zawadzki, C.H., Renesto, E., Reis, R.E., Moura, M.O., Mateus, R.P. (2005) Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genética*, 123: 271–283.
- Zawadzki, C.H., Weber, C., Pavanelli, C.S. (2008d) Two new species of *Hypostomus* Lacépède (Teleostei: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6(3): 403-412.
- Zawadzki, C.H., Weber, C., Pavanelli, C.S., Renesto, E. (2002) Morphological and biochemical comparison of two allopatrid populations of *Hypostomus margaritifer* (Regan, 1907) (Osteichthyes, Loricariidae) from the upper Paraná River basin, Brazil *Acta Scientiarum Maringá*, 24(2): 499-505.
- Zhang, D.-X., Hewitt, G.M. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.*, 11: 247-251.