

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

VANESSA BUENO DA SILVA

Análise citogenética em espécies de Hypostominae Lacépède, 1803
(Osteichthyes, Loricariidae) da bacia dos rios Uruguai e Paraná: enfoque
biogeográfico e filogenético

Maringá
2014

VANESSA BUENO DA SILVA

Análise citogenética em espécies de Hypostominae spp. Lacépède, 1803
(Osteichthyes, Loricariidae) da bacia dos rios Uruguai e Paraná: enfoque
biogeográfico e filogenético

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido

Maringá
2014

S586a Silva, Vanessa Bueno da
Análise citogenética em espécies de Hypostominae Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae) da bacia dos rios Uruguai e Paraná: enfoque biogeográfico e filogenético.
-- Maringá: UEM, 2014.
69 f. : il.; 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. Maringá, 2014.
Bibliografia: f. 27-32; 42-45; 57-61; 89-94

1. Citotaxonomia. 2. Evolução cromossômica. 3. DNAr. 4. Hypostomini. I. Margarido, Vladimir Pavan. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. III. Título.

CDD 22.ed. 570

FOLHA DE APROVAÇÃO

VANESSA BUENO DA SILVA

Análise citogenética em espécies de Hypostominae Lacépède, 1803
(Osteichthyes, Loricariidae) da bacia dos rios Uruguai e Paraná: enfoque
biogeográfico e filogenético

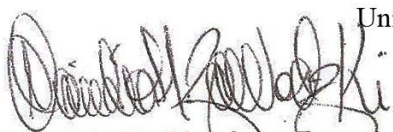
Dissertação/tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA



Dr. Vladimir Pavan Margarido

Universidade Estadual de Maringá (Presidente)



Dr. Cláudio Henrique Zawadzki

Universidade Estadual de Maringá



Dr. Weferson Junio da Graça

Universidade Estadual de Maringá



Dr. Orlando Moreira Filho

Universidade Federal de São Carlos



Dr. Roberto Laridondo Lui

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em: 07 de maio de 2014.

Local de defesa: Sala 214, Bloco G80, campus da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho aos meus pais, Bernardete e Edson, e ao meu irmão Eduardo

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que colaboraram para que este trabalho fosse possível.

À Universidade Estadual de Maringá, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, pela estrutura, suporte e auxílio que permitiram a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Vladimir Pavan Margarido pela oportunidade de ter iniciado os estudos na citogenética, o que fez com que eu chegasse onde estou hoje. Obrigada por todos os anos de ensinamentos, conversas, apoio, amizade e, claro, pela orientação da iniciação científica até esse último passo da pós-graduação.

Ao professor Dr. Cláudio Henrique Zawadzki pela identificação dos espécimes, ideias, amizade e apoio geral com os *Hypostomus* desde o mestrado.

À professora Dr^a. Onildes Maria Taschetto, pelo esforço em relação à estruturação do laboratório de citogenética.

À minha mãe, Bernardete, pelo apoio em todos os momentos, alguns muito difíceis. Por todo o incentivo, pela companhia durante muitas e muitas horas de estudo, pelas caminhadas fora de hora para o centro e tantas, tantas coisas mais. Eu jamais teria conseguido sem você. Ao meu pai, Edson, também pelo apoio, pela compreensão, pela companhia nas viagens pra Curitiba e por todos os interesses que sempre compartilhou comigo, que provavelmente fizeram com que eu acabasse escolhendo esse caminho da pesquisa. Ao meu irmão Eduardo, por estar comigo nos momentos mais difíceis e mais divertidos. Obrigada pelo apoio, pela empolgação com os projetos, pelos softwares, e saiba que você também sempre poderá contar comigo. Também agradeço aos meus avós, João e Amélia, ainda que tarde, por várias lições importantes para minha vida. À minha avó Eclair, pelo amor, carinho e excesso de mimos e ao vô Chico por ter feito parte de tudo o que permitiu que eu estivesse aqui. Amo todos vocês!

À professora MSc. Jociléia Konerat pela longa amizade e parceria. Obrigada por ter me ensinado os primeiros passos da citogenética, pelo apoio, pelo incentivo a ministrar os mini-cursos, que acabaram fazendo com que eu percebesse meu gosto pela docência, pela oportunidade do estágio em docência, e pelo auxílio em tantos momentos complicados. Saiba que você foi muito importante na minha formação científica. Obrigada também pela coleta dos peixes, sem os quais não teria sido possível terminar a tese no tempo necessário.

Ao Otman, pela companhia e apoio desde a época do mestrado. Obrigada por sempre ter uma palavra pra me animar (e conseguir fazer isso tão bem), mesmo estando tão longe. Você

tornou mais fáceis muitos momentos difíceis, e tem sido muito importante para mim por todo esse tempo. Te adoro!

A minha família, especialmente a tia Marlene, Deise, Ester, tia Erica, tio Zé e tia Marli, por diversos bons momentos ao longo da minha vida, pelo carinho, apoio e compreensão. Vocês são todos muito importantes pra mim, mesmo estando muitas vezes longe! Amo vocês!

Ao Lucas Piloto pela amizade por todos esses anos, pelos conselhos, pelos nossos planos malucos de viagens. À Natasha, pela amizade desde sempre! À Elis, pela amizade e apoio, desde a graduação. Ao Leandro, Ariádine, Íris, Paulo e Giovanna pela amizade.

Aos professores Dr. Roberto Laridondo Lui e Dr.^a Rafaela Maria Moresco, da Unioeste.

Ao Reginaldo e à Sama pelo auxílio em diversos momentos, pelas conversas, convivência e amizade. Ao pessoal do laboratório de citogenética da Unioeste, Lucas, Léo, Stephan, Simone, Mariane, Gisele, Simone, Mírcea, Aline, Anahiê, pelo período de convivência e auxílio no laboratório.

Ao técnico do laboratório de genética, Fernandes João Luzzi, e às secretárias do programa de pós-graduação, Marcinha e Estela, pelo auxílio em diversos momentos.

A todos aqueles que auxiliaram nas coletas, em especial à MSc. Jocicléia Thums Konerat, Dr.^a Rafaela Maria Moresco, Edilson Konerat, Edgar Baumgratz, Leonardo Marcel Paiz, Ângelo e Estanislau Przybitowicz, Israel Makoski, Igor Makoski e Geraldo S. Zientarski.

À Fundação Araucária e CNPq pelo financiamento de projetos, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização para a captura dos peixes.

Análise citogenética em espécies de Hypostominae Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae) da bacia dos rios Uruguai e Paraná: enfoque biogeográfico e filogenético

RESUMO

Hypostomus é o gênero mais especioso de Hypostominae, com variação intraespecífica considerável na morfologia e padrões de coloração e um elevado número de espécies ainda não formalmente descritas. O grande número de espécies, distribuídas pela maior parte da América do Sul, dificulta a realização de análises comparativas amplas, cenário também observado nos estudos citogenéticos, filogenéticos e biogeográficos do gênero. Mesmo que a proporção de espécies analisadas ainda seja pequena frente à diversidade do gênero, estudos realizados até o momento indicam que os dados obtidos através de análises moleculares, citogenéticas e biogeográficas têm se complementado, aumentando o entendimento sobre a evolução do grupo. Em relação a análises citogenéticas, o número de espécies nominais de *Hypostomus* analisadas ainda é baixo. O maior número de espécies analisadas pertence à bacia do rio Paraná e existem poucas análises de espécies pertencentes a bacias do extremo norte e ausência em bacias do extremo sul da área de distribuição do gênero. Em relação a espécies existentes no Brasil, isto representaria principalmente as espécies existentes na bacia do rio Amazonas e na bacia do rio Uruguai. Como existe uma grande diversidade cromossômica no gênero, que parece estar relacionada à distribuição das espécies, a ausência de análises destas regiões torna-se um obstáculo para a compreensão do grupo. Devido à ausência de dados sobre grupos potencialmente importantes dentro do gênero, propostas existentes para a evolução cromossômica de *Hypostomus* tratam de tendências gerais, e não existem análises de subgrupos de *Hypostomus*. Considerando as dificuldades encontradas para esclarecer a evolução do gênero, e levando em consideração que correlações entre as hipóteses filogenéticas, evolução cromossômica e biogeografia podem auxiliar no entendimento da diferenciação das espécies, o presente trabalho teve por objetivo analisar subgrupos de espécies próximas de *Hypostomus*, originárias da bacia do rio Uruguai. No primeiro capítulo é realizada uma revisão bibliográfica sobre a bacia do rio Uruguai e *Hypostomus*. No segundo capítulo, três espécies de *Hypostomus*, *H. albopunctatus*, *H. luteus* e *H. isbrueckeri*, foram comparadas citogeneticamente. Estas espécies são parte de um mesmo clado dentro de *Hypostomus*, que contém todas as espécies que ocorrem somente na bacia do rio Uruguai e algumas espécies da bacia do rio Paraná. Os resultados revelaram uma grande semelhança na estrutura cromossômica, principalmente entre *H. albopunctatus* e *H. isbrueckeri*, evidenciando como hipóteses filogenéticas podem ser correlacionadas com a citogenética para uma maior compreensão de grupos complexos. Como existem espécies com números diploides semelhantes em diferentes cladogramas dentro de *Hypostomus*, somente o número diploide não é o bastante para diferenciar grupos. Este trabalho é o primeiro que utiliza a filogenia de subgrupos dentro do gênero para coordenar a comparação entre os cariótipos de espécies próximas. Duas espécies anteriormente consideradas como sinônimos, *H. luteomaculatus* e *H. regani*, foram comparadas citogeneticamente no terceiro capítulo. Ambas apresentaram o mesmo número diploide, fórmula cromossômica e localização do DNAr 5S, sendo distinguidas citogeneticamente somente através de diferenças nos sítios de DNAr 18S. Este capítulo demonstra a utilização da citogenética na taxonomia, sendo uma importante ferramenta para grupos que apresentam delimitações confusas de taxa. Finalmente, no capítulo quatro, espécies de três tribos de Hypostominae são analisadas: *Rhinelepis aspera*, de Rhinelepidini, *Pterygoplichthys ambrosettii*, de Pterygoplichthini e *Megalancistrus*

parananus, de Ancistrini. A correlação dos resultados com a filogenia de Hypostominae revela um número diploide de 52 cromossomos como basal para as tribos Ancistrini e Pterygoplichthini. Enquanto a maior parte dos gêneros de Hypostominae apresenta cariótipos conservados, os gêneros *Ancistrus* e *Hypostomus* apresentam evoluções cromossômicas divergentes. Considerando $2n=54$ cromossomos como característica ancestral para Loricariidae, Rhinelepini apresenta números diplóides ancestrais. Em Hypostominae, observa-se o aumento do número cromossômico em *Hypostomus*. Pterygoplichthini apresenta números diploides de 52 cromossomos, com redução de um par em comparação ao número considerado ancestral. Esta característica é observada também em diversos gêneros de Ancistrini, com a exceção de *Ancistrus*, que apresenta redução no número diploide. Desta forma, Hypostominae, como um todo, não apresenta muitas características derivadas citogeneticamente, sendo que essas características estão concentradas nos gêneros *Hypostomus* e *Ancistrus*.

Palavras-chave: Citotaxonomia. Evolução cromossômica. DNAr. Hypostomini.

Cytogenetical analysis of Hypostominae Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae) species from the Uruguai and Paraná River basins: biogeographical and phylogenetic approach

ABSTRACT

Fishes are a wide and diverse group, with many particularities that make it interesting for studying chromosome evolution. Among fishes, *Hypostomus* is the most specious genus from the subfamily Hypostominae, with considerable intraspecific variation in morphology and color patterns and a high number of species which are not formally described. The great number of species, distributed through most of South America, hinders broad comparative analyses, scenery also observed for cytogenetical, phylogenetical and biogeographical studies on the genus. Even though the number of analyzed species is small compared to the diversity of the genus, studies performed until now show that data obtained from molecular, cytogenetical and biogeographical analyses have been complementing each other, increasing the understanding on the evolution of the group. Regarding cytogenetical analyses, the number of nominal *Hypostomus* species analyzed is still low. Most analyzed species belong to the Paraná River basin and there are few species belonging to northern basins and none from southern basins where the genus is distributed. Regarding species from Brazil, this would represent mainly species from the Amazonas and Uruguay basins. Since there is great chromosome diversity on the genus, that seems to be related to the distribution of species, the absence of analyses from these regions is an obstacle for understanding the group. Due to the absence of analyses from potentially important groups in the genus, existent theories for chromosome evolution in *Hypostomus* deal with general trends, and there are no analyses of *Hypostomus* subgroups. Considering the difficulties found in clarifying the evolution of the genus, and that correlations between phylogeny, chromosome evolution and biogeography may help understanding species differentiation, the present paper aimed to analyze subgroups of closely related *Hypostomus* species from the Uruguay River. On the first chapter, a bibliographical review is made on the Uruguay River basin and *Hypostomus*. On the second chapter, three *Hypostomus* species, *H. albopunctatus*, *H. luteus* and *H. isbrueckeri*, are compared cytogenetically, showing how phylogenetic hypostesis may be correlated with cytogenetics for a better comprehension of complex groups. Since there are species with similar diploid numbers in different clades within *Hypostomus*, only the diploid number is not enough to separate groups. this research is the first to use the phylogeny of groups within the genus to coordinate the comparison between karyotypes of closely related species. These species are part of the same clade in *Hypostomus*, which contains all species that occur only in the Uruguay River basin and some species from Paraná River basin. The results showed great similarity between the chromosome structure of these species, specially *H. albopunctatus* and *H. isbrueckeri*. Two species that were once recognized as synonymous, *H. luteomaculatus* and *H. regani*, were cytogenetically compared in the third chapter. Both showed the same diploid numbers, chromosome formula and location of the 5S rDNA, being distinguished only by differences on the 18S rDNA sites. this chapter shows the use of cytogenetics in taxonomy, being an important tool for groups that have confusing taxa delimitation. Finally, on chapter four, species from three Hypostominae tribes are analyzed: *Rhinelepis aspera*, from Rhinelepini, *Pterygoplichthys ambrosettii*, from Pterigoplichthini and *Megalancistrus parananus*, from Ancistrini. The correlation of the results with the phylogeny of Hypostominae reveals a diploid number of 52 chromosomes as basal for the tribes Ancistrini and Pterygoplichthini. While most Hypostominae genera show conserved

karyotypes, the genera *Ancistrus* and *Hypostomus* show divergent chromosome evolution. Considering $2n=54$ chromosomes as an ancestral feature for Loricariidae, Rhinelepini shows ancestral diploid numbers. In Hypostominae, the increase of diploid numbers is observed in *Hypostomus*. Pterygoplichthini shows diploid numbers of 52 chromosomes, with the reduction of one pair compared to the ancestral diploid number. This feature is observed also in many genera from Ancistrini, with the exception of *Ancistrus*, that shows a reduction of diploid number. So, Hypostominae as a whole does not show many derived features, since these features are concentrated in genera *Hypostomus* and *Ancistrus*.

Keywords: Chromosome Evolution. rDNA. Cytotaxonomy. Hypostomini.

SUMÁRIO

CAPITULO 1.....	14
1 Introdução	15
2 Revisão de Literatura	16
2.1 A Bacia do Rio Uruguai	16
2.2 Siluriformes	17
2.3 <i>Hypostomus</i>	18
2.4 Estudos citogenéticos em <i>Hypostomus</i>	22
3 Referências	27
CAPÍTULO 2.....	33
RESUMO	34
ABSTRACT	35
Introdução	36
Material e métodos	37
Resultados	37
Discussão	38
Agradecimentos	41
Referências	42
CAPÍTULO 3.....	48
RESUMO	49
ABSTRACT	50
Introdução	51
Material e Métodos	52
Resultados	52
Discussão	53
Agradecimentos	56
Referências	57
ANEXO 1	65

CAPÍTULO 4.....	76
RESUMO	77
ABSTRACT	78
Introdução	79
Material e Métodos	80
Resultados	81
Discussão	82
Rhinelepiini.....	82
Hypostomini	83
Pterygoplichthini.....	84
Ancistrini	85
Conclusões	87
Agradecimentos	88
Referências	89
ANEXO 2	103

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1: Bacia do rio Uruguai em território brasileiro 16
- Figura 2: Filogenia de *Hypostomus*, retirada de Montoya-Burgos (2003) 20
- Figura 3: Filogenia de *Hypostomus*, retirada de Armbruster (2004) 21

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Cariótipos de *Hypostomus luteomaculatus* e *Hypostomus regani* corados com Giemsa e C-bandados. Em destaque os cromossomos portadores de sítios de DNAr 5S, DNAr 18S e AgRONS 46
- Figura 2 Metáfases de *Hypostomus luteomaculatus* e *Hypostomus regani* coradas com fluorocromos CMA₃ e DAPI sobrepostos 47
- Figura 3 Dados citogenéticos de espécies de *Hypostomus* do clado D3-1, adaptado de Montoya-Burgos (2003) 47

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Cariótipos de *Hypostomus albopunctatus*, *Hypostomus isbrueckeri* e *Hypostomus luteus* corados com Giemsa e C-bandados. Em destaque os cromossomos portadores de sítios de DNAr 18S e corados com os fluorocromos CMA₃ e DAPI 63
- Figura 2 Cladograma adaptado de Montoya-Burgos (2003) indicando os números diploides observados para as espécies o o clado a que pertencem 64

CAPÍTULO 4

- Figura 1 Cariótipos de *Rhinelepis aspera*, *Pterygoplichthys ambrosettii* e *Megalancistrus parananus* corados com Giemsa e hibridizados com sondas de DNAr 5S e 18S 99
- Figura 2 Cladograma adaptado de Armbruster (2004) indicando a variação do número diploide para os gêneros de Hypostominae 100
- Figura 3 Idiogramas representando cariótipos de *Rhinelepis aspera*, *Pogonopoma wertheimeri*, *Squaliforma emarginata*, *Pterygoplichthys ambrosetti* e *Hemiancistrus* sp. 101
- Figura 4 Relações de *Ancistrus*, indicando os números diploides das espécies 102

CAPITULO 1

Revisão Bibliográfica

1 Introdução

A citogenética é uma ferramenta que auxilia no entendimento da evolução de diversos grupos de seres vivos, entre eles o grupo dos peixes. Uma grande quantidade de dados citogenéticos sobre peixes neotropicais vem sendo obtida, especialmente nas ordens Characiformes e Siluriformes. Ambas as ordens apresentam uma ampla diversidade cariotípica, consequência principalmente da diversidade em grupos particulares que apresentam grandes variações no número diploide e estrutura do cariótipo (ARTONI et al., 2000). Um exemplo é Loricariidae, que apresenta números diploides de 34 a 96 cromossomos, com uma grande variedade de fórmulas cariotípicas principalmente em gêneros como *Ancistrus*, *Hypostomus* e *Rineloricaria* (KAVALCO et al., 2004a; RODRIGUES, 2010; MARIOTTO et al., 2011; BUENO et al., 2012). Estes grupos tendem a apresentar sistemática e filogenia complexas, além de um grande número de espécies, o que dificulta seu entendimento e classificação. Assim, a citogenética pode ser associada às análises filogenéticas e biogeográficas para esclarecer a origem da diversidade cariotípica e evolução desses grupos.

Entre os grupos taxonomicamente complexos de Loricariidae, *Hypostomus* se destaca pelo grande número de espécies e pela elevada variação intraespecífica em padrões de coloração (WEBER, 2003). Cromossomicamente, o gênero apresenta muita complexidade, com variação tanto no número diploide quanto nas fórmulas cariotípicas (BUENO et al., 2012). Como as relações entre as espécies de *Hypostomus* ainda não são amplamente conhecidas, o entendimento da evolução cromossômica do gênero apresenta muitos obstáculos. Além da complexidade inerente ao grupo, a proporção de espécies já analisadas citogeneticamente é pequena frente a seu grande número de espécies. Desta forma, tanto os trabalhos que acrescentam dados sobre espécies ainda não analisadas quanto aqueles que buscam padrões gerais na evolução cromossômica de *Hypostomus* representam contribuições importantes para o entendimento deste grupo.

Considerando os dados existentes sobre a citogenética de *Hypostomus*, percebe-se que as descrições são principalmente de espécies da bacia do rio Paraná, e que poucas espécies são provenientes do norte ou do sul da América do Sul (BUENO et al., 2013). Como a filogenia e a distribuição das espécies são relacionadas (MONTROYA-BURGOS, 2003), subgrupos importantes pertencem a estas regiões, e a falta de análises impede uma melhor compreensão do gênero. Assim, o presente trabalho buscou analisar espécies provenientes da

bacia do rio Uruguai, no extremo sul da distribuição de *Hypostomus*, ampliando os dados existentes para esse gênero. Os resultados foram comparados com os dados já existentes para que pudessem ser compreendidos tanto dentro do contexto do gênero quanto da subfamília Hypostominae, fornecendo novas perspectivas para a evolução cromossômica destes grupos.

2 Revisão de Literatura

2.1 A Bacia do Rio Uruguai

A bacia hidrográfica do Prata engloba uma vasta região da América do Sul, tendo volume inferior somente ao da bacia Amazônica. É formada principalmente pelos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, que representam 48,7%, 35,3% e 11,8% da área de superfície da bacia, respectivamente (BREA; ZUCOL, 2011). Embora represente uma proporção relativamente pequena da bacia do Prata, o rio Uruguai possui um comprimento de 1.600 km, e está localizado em três países, com uma porção de cerca de 42% no Brasil, 41% no Uruguai e 16% na Argentina (LABORDE, 2008). Com 178.235 km² em área brasileira (Fig. 1), o rio Uruguai é considerado um rio subtropical, apresentando duas cheias e períodos de baixo nível de água durante o ano (DIEGUES, 1994).

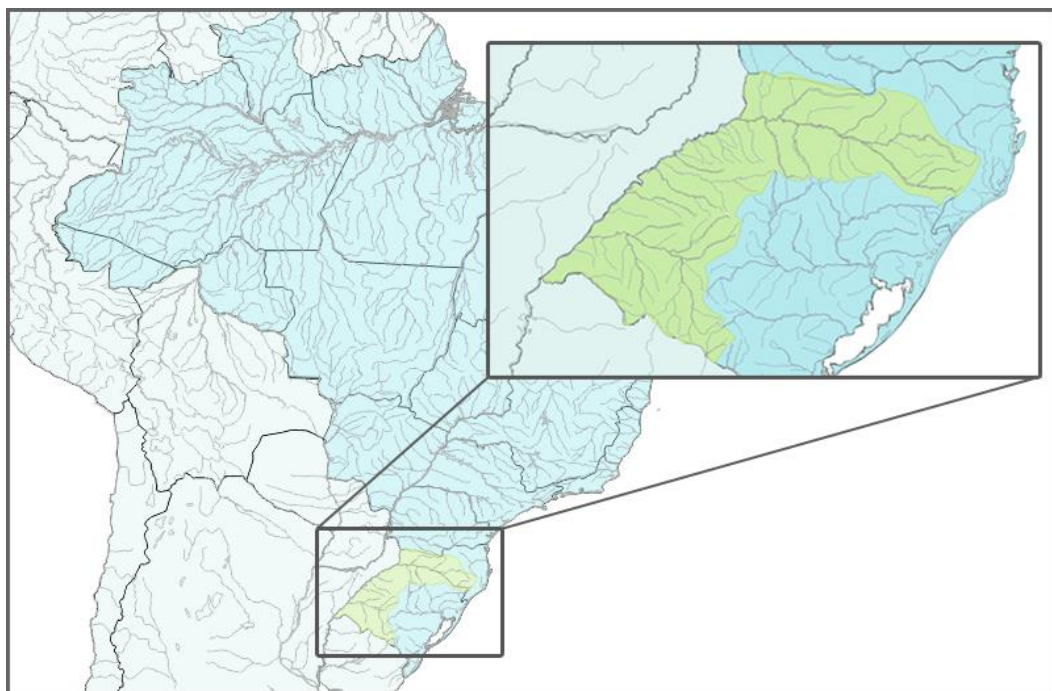


Figura 1 Bacia do rio Uruguai em território brasileiro, destacada em verde.

É formado pela confluência dos rios Pelotas e Canoas, e divide os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina em seu trecho nacional. Em seu trecho compartilhado, divide o território brasileiro do argentino e, posteriormente, serve de fronteira entre o Uruguai e a Argentina (MMA, 2006). O represamento de água em reservatórios de hidroelétricas gera impactos sócio-ambientais na região, além de alterar o regime de inundação do rio (AGOSTINHO et al., 1992; DIEGUES, 1994). Algumas áreas da bacia, como Lages (SC), Chapecó (SC) e Passo Fundo (RS) apresentam uma elevada densidade urbana e industrial, enquanto outras áreas são utilizadas na criação de gado e cultivo de arroz, soja e trigo. Desde a colonização e a chegada de imigrantes de origem predominantemente européia, a região passou por um intenso processo de desmatamento, que afetou profundamente o balanço ecológico da área. O desmatamento, aliado a frequentes inundações causadas pela eliminação da mata ciliar, causou o empobrecimento do solo da região. A agricultura inadequada e utilização de áreas para pasto levaram algumas áreas a um processo de desertificação (DIEGUES, 1994). Existe relativamente pouca informação sobre a composição da ictiofauna da bacia do rio Uruguai. Um levantamento realizado pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler (FEPAM) indicou a existência de cerca de 190 espécies de peixes na região das sub-bacias dos rios Ijuí e Butuí-Piratinim-Icamaquá (VILELLA; BRUSCHI, 2004). Uma comparação entre as espécies de peixes existentes nas ecorregiões da América do Sul indicou que a composição de espécies do Alto e Baixo Uruguai são consideravelmente distintas. Enquanto o Baixo Uruguai tem uma composição de espécies semelhante a do Baixo Paraná, o Alto Uruguai possui uma semelhança maior com as bacias Amazônicas. Esta similaridade na fauna do Alto Uruguai e da bacia Amazônica provavelmente é resultado de extinções que ocorreram em outras porções da bacia do Prata, sendo um dos poucos casos de semelhança significativa na fauna de bacias não contíguas (ALBERT; CARVALHO, 2011).

2.2 Siluriformes

Siluriformes contém mais de 3.000 espécies, das quais cerca de 1.700 habitam as américas. É composta por peixes com grande diversidade na forma, tamanho e habitats, caracterizados pela ausência de escamas, apresentando o corpo nu ou coberto por placas dérmicas, com barbilhões e duas aberturas branquiais (REIS 1998; NELSON, 2006; INGENITO et al., 2004). Embora apresente representantes marinhos e estuarinos,

pertencentes principalmente a Ariidae e Plotostidae, habitam principalmente águas doces (DE PINNA, 1998). A maior parte das espécies de Siluriformes possui hábito noturno, muitos com olhos pequenos, utilizando barbilhões na busca por alimento e exploração do ambiente. Um grande número de espécies possui os raios anteriores das nadadeiras peitorais e dorsal convertidos em um acúleo forte e afiado que o peixe mantém ereto quando alarmado. O acúleo é mantido ereto através de um sistema de trava por fricção. As superfícies ásperas necessárias a esse sistema são utilizadas para a produção de sons por alguns peixes, provavelmente servindo como alerta a predadores (McNEILL, 1981).

Loricariidae, pertencente a Loricarioidea junto com outras importantes e diversas famílias como Trichomycteridae e Callichthyidae, contém cerca de 960 espécies (FROESE; PAULY, 2014), divididas em sete subfamílias: Delturinae, Hypoptomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae, Neoplecostominae e Otothyriinae (REIS et al., 2006; FERRARIS, 2007; CHIACHIO et al., 2008), embora existam controvérsias em relação a Otothyriinae, invalidada a partir de um estudo da filogenia molecular de Neoplecostominae e Hypoptopomatinae (CRAMER *et al.*, 2011).

Hypostominae contém cinco tribos: Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini (ARMBRUSTER, 2004). A maior diversidade de espécies é encontrada nas drenagens costeiras do leste e sudeste brasileiros, sendo principalmente restritas a ambientes de água doce. Os padrões de coloração e morfologia variam consideravelmente dentro de uma mesma espécie, dificultando a delimitação da variabilidade dos táxons, e um grande número de espécies coletadas não apresenta descrição formal. Graças a estas características, existe um grande número de espécies de caráter taxonômico incerto na subfamília, principalmente em *Hypostomus* (WEBER, 2003).

2.3 *Hypostomus*

Hypostomus é o gênero mais especioso de Hypostominae, com mais de 130 espécies válidas (FROESE; PAULY, 2014). Embora o gênero esteja distribuído pela maior parte da América do Sul, as bacias dos rios Amazonas e Paraná concentram a maior diversidade de espécies do gênero (FERRARIS, 2007). Em relação à presença de *Hypostomus* na bacia do Uruguai, nove espécies são encontradas: *H. aspilogaster* (Cope, 1894), *H. commersoni* Valenciennes, 1836, *H. isbrueckeri* Reis, Weber & Malabarba, 1990, *H. luteus* (Godoy, 1980), *H. luteomaculatus* (Devincenzi, 1942), *H. regani* (Ihering, 1905), *H. roseopunctatus*

Reis, Weber & Malabarba, 1990, *H. ternetzi* (Boulenger, 1895) e *H. uruguayensis* Reis, Weber & Malabarba, 1990. *Hypostomus luteomaculatus* foi sinonimizada com *H. regani* por Reis et al. (1990), porém foi considerada válida e distribuída pela bacia do rio Uruguai por Isbrücker (2001), Weber (2003) e Ferraris (2007). Esta diversidade de *Hypostomus* na bacia do Uruguai parece ter duas origens distintas, com algumas espécies mais relacionadas às existentes na bacia do rio Paraguai e outras mais relacionadas às espécies da bacia do rio Paraná (MONTROYA-BURGOS, 2003).

Embora algumas propostas relacionadas à filogenética de *Hypostomus* tenham sido publicadas, o número de espécies nominais incluídas nas análises é relativamente baixo, e não existe um consenso sobre as relações filogenéticas entre a maioria das espécies (MONTROYA-BURGOS, 2003; ARMBRUSTER, 2003; ARMBRUSTER, 2004; MARTINEZ, 2009; CARDOSO et al., 2012). Entre estas, destacam-se as propostas de Montoya-Burgos (2003) (Fig. 2) e de Armbruster (2004) (Fig. 3). Um grupo particularmente bem diagnosticado dentro de *Hypostomus* é o grupo *H. cochliodon*, composto por espécies que ocupam predominantemente o norte da América do Sul, que parece formar um grupo monofilético (ARMBRUSTER, 2003). Outros subgrupos são mencionados na literatura, embora agrupem espécies baseando-se em características morfológicas mais aparentes e não contenham necessariamente espécies filogeneticamente próximas. Considerando o padrão de coloração e número de dentes, Muller e Weber (1992) separam as espécies de *Hypostomus* em dois subgrupos: grupo *H. regani* e grupo *H. plecostomus*. Esta divisão é útil como referência, porém outras análises já demonstraram que o padrão de coloração não é um parâmetro confiável para a divisão das espécies de *Hypostomus* em grupos filogeneticamente relacionados. *Hypostomus faveolus*, uma espécie encontrada nas bacias dos rios Tocantins-Araguaia e Amazonas possui um padrão de coloração com manchas claras, característica semelhante ao observado no grupo *Hypostomus regani*, porém sua distribuição e outras características morfológicas indicam que pertenceria ao grupo *plecostomus*. De forma semelhante, algumas espécies agrupadas com o que seria o grupo *regani* em algumas propostas de filogenia possuem padrões de coloração semelhantes ao do grupo *plecostomus*, com manchas escuras ou sem manchas conspícuas (MONTROYA-BURGOS, 2003; MARTINEZ, 2009). Além disso, a grande variabilidade observada entre indivíduos da mesma espécie e o elevado número de espécies novas impede a identificação correta das espécies, dificultando ainda mais o estudo do gênero (WEBER, 2003).

A. D-loop tree

B. ITS tree

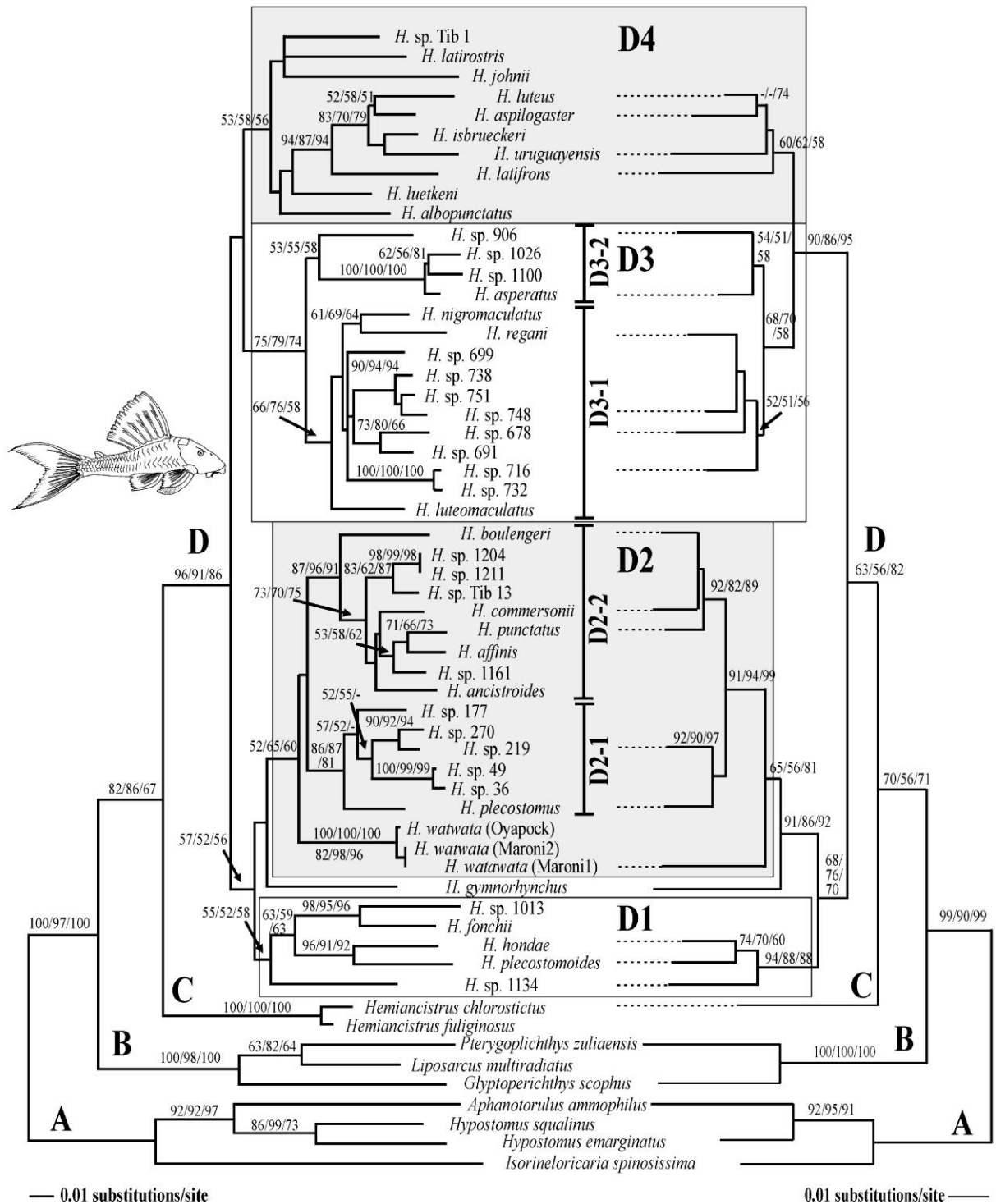


Figura 2 Filogenia de *Hypostomus*, retirada de Montoya-Burgos (2003).

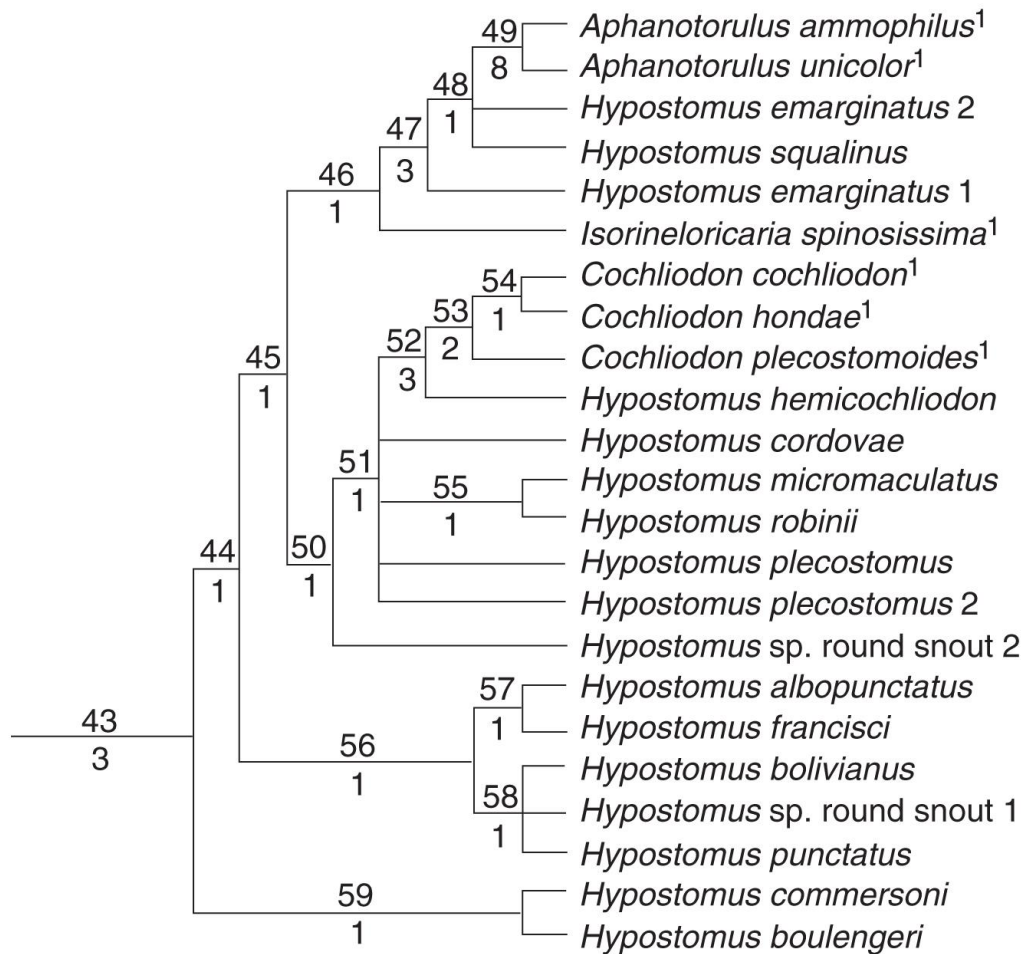


Figura 3 Filogenia de *Hypostomus* retirada de Armbruster (2004).

O primeiro trabalho sobre biogeografia de *Hypostomus* foi publicado por Montoya-Burgos (2003), que associa a filogenia do gênero com sua distribuição. Embora um número considerável de espécies nominais não tenha sido utilizado na análise, o autor consegue correlacionar os principais eventos de cladogênese à história geológica da América do Sul. As espécies que são agrupadas através de análises do *D-loop* do DNA mitocondrial e da região de ITS do DNA ribossomal nuclear apresentam distribuição semelhante. Sendo assim, a análise conjunta da filogenética com a biogeografia pode fornecer resultados mais consistentes e auxiliar nos pontos problemáticos da filogenia do gênero. Sete das nove espécies que estão presentes na bacia do rio Uruguai estão entre as espécies analisadas por Montoya-Burgos (2003), sendo que a maioria das espécies que estão presentes unicamente nessa bacia forma um grupo monofilético (REIS et al., 1990; MONTOYA-BURGOS, 2003; FERRARIS, 2007).

2.4 Estudos citogenéticos em *Hypostomus*

Os estudos citogenéticos em *Hypostomus* iniciaram com a análise de *H. plecostomus* por Muramoto et al. (1968), tendo continuidade somente após nove anos com a publicação de Michele et al. (1977). Posteriormente, um número maior de análises foi realizado por Artoni e Bertollo (1996), com análises de novas espécies sendo publicadas desde então. O número de espécies nominais de *Hypostomus* analisadas citogeneticamente ainda é baixo, e um grande número de descrições está publicado como resumos, apresentados em simpósios da área (BUENO et al., 2012). A maior parte das espécies de *Hypostomus* analisadas citogeneticamente pertence à bacia do Alto rio Paraná, embora existam algumas espécies de bacias costeiras, rio São Francisco, bacia do rio Araguaia, rio Xingu e bacia do rio Paraguai (MILHOMEM et al., 2010; MARTINEZ et al., 2011; BUENO et al., 2012). Como o gênero possui distribuição pela maior parte da América do Sul (FERRARIS, 2007), grupos de espécies restritos ao extremo norte ou ao extremo sul ainda não foram analisados. Em relação a espécies existentes no Brasil, isso representaria principalmente as espécies existentes na bacia do rio Amazonas e na bacia do rio Uruguai. Mesmo assim, já foi verificada uma diversidade cromossômica considerável no gênero, com números diploides variando de $2n=64$ cromossomos em *H. faveolus*, entre outros, a $2n=84$ cromossomos em *Hypostomus perdido* (Tabela 1), com espécies apresentando sistemas de cromossomos sexuais e cromossomos supranumerários (ver BUENO et al., 2012 para uma revisão). A fórmula cariotípica de espécies com o mesmo número diploide também varia consideravelmente, inclusive entre populações da mesma espécie. Alguns exemplos notáveis de espécies com variação intraespecífica são *H. ancistroides* e *H. regani*. Considerando também os dados publicados em resumos apresentados em simpósios da área, existe variação intraespecífica mesmo nos números diploides, como em *H. commersoni*, com $2n=66$ e $2n=68$ cromossomos; *H. cochliodon*, com $2n=62$ e $2n=64$ cromossomos e *H. derbyi* com $2n=66$ e $2n=68$ cromossomos (BUENO et al., 2012). Embora estas variações sejam frequentes em espécies com mais de uma população analisada, ainda não existem estudos sobre sua relevância ou origem.

As propostas existentes para a evolução cromossômica de *Hypostomus* tratam basicamente de características gerais observadas no grupo: número diploide baixo e regiões organizadoras de nucléolos (RONs) simples são considerados basais, e a diferenciação cromossômica teria ocorrido através de fissões cêntricas, que causaram o aumento do número diploide, e rearranjos do tipo inversões que originaram diversidade de fórmulas cromossômicas entre espécies com o mesmo número diploide (ARTONI; BERTOLLO, 1996;

2001; ALVES et al., 2005; KAVALCO et al., 2005; BUENO et al., 2012). A distribuição de heterocromatina em *Hypostomus* varia consideravelmente, com espécies apresentando pouca heterocromatina como em *H. affinis*, grandes bandas heterocromáticas ocupando quase a totalidade do braço longo do cromossomo como em *Hypostomus* sp. B, ou uma quantidade significativa de bandas intersticiais equilocais como em *Hypostomus* sp. E (ARTONI; BERTOLLO, 1999; KAVALCO et al., 2004a). Segundo Artoni e Bertollo (1999), a maior quantidade de heterocromatina estaria associada a números diploides mais elevados. Embora essas propostas demonstrem esta diferenciação cromossômica no gênero como um todo, é muito provável que existam características particulares a subgrupos que ainda não foram abordadas. Um exemplo disso pode ser observado em relação ao número diploide das espécies, que parecem dividir-se ao menos em dois grandes grupos: um grupo com número diploide igual ou abaixo de 68 cromossomos e outro grupo com número diploide igual ou acima de 72 cromossomos (MARTINEZ, 2009). Uma análise correlacionando dados sobre o número diploide de *Hypostomus* com a biogeografia das espécies indicou que as espécies com os menores números diploides do gênero estão concentradas em bacias hidrográficas do norte (BUENO et al., 2013). Considerando as dificuldades encontradas para esclarecer a evolução de *Hypostomus*, correlações entre as hipóteses filogenéticas, evolução cromossômica e biogeografia podem auxiliar no entendimento da diferenciação das espécies. Nenhuma das espécies presentes somente na bacia do rio Uruguai foi analisada citogeneticamente (BUENO et al., 2012), assim como ainda não foram realizadas análises de subgrupos de espécies próximas de *Hypostomus* visando o entendimento de sua complexa evolução cromossômica.

Tabela 1 Dados citogenéticos disponíveis para *Hypostomus*. Nas colunas referentes ao DNAr são indicados o número de sítios, seguido pela morfologia do cromossomo portador e a posição, definida como "t" para sítios terminais e "i" para sítios em posição intersticial, incluindo sítios pericentroméricos.

Espécie	2n	Fórmula cromossômica	DNAr 5S	DNAr 18S	Localidade	Referência
<i>Hypostomus cochliodon</i>	64	12m+16sm+16st+20a	-	Simples*; 1a(t)	Rio Iguaçu (abaixo das cataratas)	Bueno et al. (2013)
<i>Hypostomus faveolus</i>	64	18m+8sm+22st+16a	-	Simples*; 1a(t)	Rio Araguaia	Bueno et al. (2013)
<i>Hypostomus</i> sp. G	64	14m+24sm+26st-a	-	Simples*, 1st-a(t)	Rio Araguaia	Artoni et al. (1998)
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu 1	64	16m+16sm+32st-a	-	Simples*; 1st-a(t)	Rio Xingu	Milhomen et al. (2010)
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu 3	64+B	15m+23sm+26st-a	-	Simples*; 1st-a(t)	Rio Xingu	Milhomen et al. (2010)
<i>Hypostomus affinis</i>	66	14m+14sm+12st+26a	8 sítios	Múltiplas; 1m(t); 2a(t)	Jacuí Stream	Kavalco et al., 2004b; 2005
<i>Hypostomus derbyi</i>	66	6m+10sm+20st+30a	-	Múltiplas; 3(t)	Bacia do rio Iguaçu	Maurutto et al. (2012)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>ancistroides</i>	66	12m+16sm+10st+28a	-	Múltiplas; 3(t)	Bacia do rio Tibagi	Maurutto et al. (2012)
<i>Hypostomus tapijara</i>	66	14m+24sm+14st+14a	2m(i); 1sm(i); 1a(i)	Múltiplas; 1m(t); 1sm(t); 1a(t)	Ribeira do Iguape	Traldi et al. (2013)
<i>Hypostomus</i> sp. Xingu 2	66	18m+14sm+34st-a	-	Simples*; 1st-a(t)	Rio Xingu	Milhomen et al. (2010)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	16m+18sm+34st-a	-	Múltiplas*, 2sm(t); 1st-a(t)	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni; Bertollo (1996)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	18m+10sm+12st+28a	-	Múltiplas*; 1m(t); 2sm(t)	Rio Araquá	Alves et al. (2006)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	10m+26sm+32a	-	Múltiplas; 4a(t)	Bacia do Paranapanema	Rubert et al. (2011)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	14m+14sm+8st+32a	-	Múltiplas*; 2a(t)	Rio Piquiri	Bueno et al., 2012; 2013
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	14m+12sm+18st+24a	-	Múltiplas*; 2sm(t)	Córrego Dourados	Endo et al. (2012)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	16m+12sm+18st+22a	-	Múltiplas*; 1m(t); 1sm(t); 1st(t)	Córrego Maringá	Endo et al. (2012)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	8m+10sm+18st+32a	-	Múltiplas*; 1m(t); 2sm(t)	Córrego Ximbaúva	Endo et al. (2012)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	10m+28sm+30st-a	-	-	-	Michele et al. (1977)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	14m+16sm+22st+16a	1m(i); 2sm(i)	Múltiplas; 3sm(t)	Córrego Lapa	Traldi et al. (2013)
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	16m+4sm+16st+32a	-	Múltiplas* 1m(t); 1sm(t)	Rio Corumbataí	Alves et al. (2012a)
<i>Hypostomus commersoni</i>	68	12m+14sm+14st+28a	-	Múltiplas*; 1st(t/i); 2a(t)	Rio Iguaçu (abaixo das cataratas)	Bueno et al. (2013)
<i>Hypostomus commersoni</i>	68	12m+12sm+8st+36a	-	Simples; 1(t)	Bacia do rio Iguaçu	Maurutto et al. (2012)
<i>Hypostomus macrops</i>	68	10m+14sm+44st-a	-	-	-	Michele et al. (1977)
<i>Hypostomus</i> prope <i>plecostomus</i>	68	12m+16sm+12st+28a	-	Simples; 1st(t)	Rio Orinoco	Alves et al. (2012a; 2012b)
<i>Hypostomus</i> sp.	68	6m+6sm+32st+24a	-	Múltiplas*; 2st(t)	Rio Mogi Guaçu	Martinez et al. (2011)
<i>Hypostomus</i> sp. A	70	18m+14sm+38st-a	-	Múltiplas*; 1m(t); 2st-a(t)	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni; Bertollo (1996)

Continua

Tabela 1 Dados citogenéticos disponíveis para *Hypostomus*. Nas colunas referentes ao DNAr são indicados o número de sítios, seguido pela morfologia do cromossomo portador e a posição, definida como "t" para sítios terminais e "i" para sítios em posição intersticial, incluindo sítios pericentroméricos.

Continuação.

Espécie	2n	Fórmula cromossômica	DNAr 5S	DNAr 18S	Localidade	Referência
<i>Hypostomus goyazensis</i>	72	10m+16sm+10st+36a	-	Simples*; 1a(t)	Rio Vermelho	Alves et al. (2006)
<i>Hypostomus cf. heraldoi</i>	72	6m+6sm+26st+34a	-	Simples*; 1a(t)	Rio Mogi Guaçu	Martinez et al. (2011)
<i>Hypostomus hermanni</i>	72	10m+8sm+32st+22a	-	Múltiplas*; 3a(t)	Rio Piquiri	Bueno et al. (2013)
<i>Hypostomus regani</i>	72	10m+20sm+42st-a	-	-	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni; Bertollo (1996)
<i>Hypostomus regani</i>	72	12m+18sm+26st+16a	-	Múltiplas*; a(t)	Rio Araquá	Alves et al. (2006)
<i>Hypostomus regani</i>	72	6m+6sm+32st+28a	-	Múltiplas*; 2st(t)	Rio Mogi Guaçu	Martinez et al. (2011)
<i>Hypostomus regani</i>	72	8m+16sm+20st+28a	1sm(i); 2a(t); 1?	Simples; 1st(t)	Rio Piumhi	Mendes-Neto et al. (2011)
<i>Hypostomus regani</i>	72	10m+18sm+44st-a	-	Múltiplas; 2st-a(t)	Bacia do rio Paranapanema	Rubert et al. (2011)
<i>Hypostomus regani</i>	72	12m+14sm+26st+20a	-	Múltiplas*; 2st(t)	Rio Ivaí	Endo et al. (2012)
<i>Hypostomus regani</i>	72	12m+8sm+10st+42a	-	Múltiplas*; 2a(t)	Rio Piquiri	Bueno et al. (2013)
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	10m+16sm+46st-a	-	Múltiplas; 2st-a(t)	Bacia do rio Paranapanema	Rubert et al. (2011)
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	10m+14sm+18st+30a	-	Múltiplas*; 3st(t); 1a(t)	Rio Ivaí	Endo et al. (2012)
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	72	12m+12sm+18st+30a	-	Múltiplas*; 2a(t)	Rio Piquiri	Bueno et al. (2013)
<i>Hypostomus</i> sp. B	72	12m+18sm+42st-a	-	Simples*; 1st-a(t)	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni; Bertollo (1996)
<i>Hypostomus</i> sp. C	72	10m+18sm+44st-a	-	Múltiplas*; 2(t)	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni; Bertollo (1996)
<i>Hypostomus</i> sp. D1	72	10m+26sm+36st-a	-	Múltiplas*; 2(t)	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni; Bertollo (1996)
<i>Hypostomus</i> sp. D2	72	14m+20sm+38st-a	-	-	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni; Bertollo (1996)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>agna</i>	74	8m+10sm+32st+24a	-	Múltiplas*; 1sm(t); 1st(t)	Ribeirão Cavalão	Martinez et al. (2011)
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	10m+20sm+44st-a	-	Múltiplas; 3(t)	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni; Bertollo (1996)
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	10m+20sm+16st+28a	-	Simples*; 1sm(t)	Rio Corumbataí	Alves et al. (2012a)
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	8m+14sm+16st+36a	-	Simples*; 1a(t)	Rio Piquiri	Bueno et al. (2013)
<i>Hypostomus prope iheringi</i>	74	10m+14sm+20st+30a	-	Múltiplas*; 4a(t)	Rio Corumbataí	Alves et al. (2012a)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>paulinus</i>	74	10m+12sm+20st+32a	-	Simples*; 1a(t)	Rio Piquiri	Bueno et al. (2013)
<i>Hypostomus paulinus</i>	74	10m+20sm+44st-a	-	-	-	Michele et al. (1977)
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	74	8m+4sm+62st-a	-	-	-	Michele et al. (1977)
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	74	10m+14sm+14st+36a	-	Múltiplas*; 1st(t); 3a(t)	Rio Corumbataí	Alves et al. (2012a)

Continua

Tabela 1 Dados citogenéticos disponíveis para *Hypostomus*. Nas colunas referentes ao DNAr são indicados o número de sítios, seguido pela morfologia do cromossomo portador e a posição, definida como "t" para sítios terminais e "i" para sítios em posição intersticial, incluindo sítios pericentroméricos.

Continuação.

Espécie	2n	Fórmula cromossômica	DNAr 5S	DNAr 18S	Localidade	Referência
<i>Hypostomus</i> aff. <i>auroguttatus</i>	76	8m+30sm+38st-a	-	Simples*; 1st-a(t)	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni; Bertollo (1996)
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	8m+20sm+48st-a	-	Múltiplas*; 2st-a(t)	Rio Mogi Guaçu	Rubert et al. (2008)
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	6m+20sm+50st-a	-	Múltiplas*; 2st-a(t)	Rio Tibagi	Rubert et al. (2008)
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	12m+22sm+30st+12a	1m(i)	Simples; 1a(t)	Córrego Lapa	Traldi et al. (2013)
<i>Hypostomus paulinus</i>	76	6m+16sm+54st-a	-	Simples; 1st-a(t)	Bacia do rio Paranapanema	Rubert et al. (2011)
<i>Hypostomus</i> prope <i>paulinus</i>	76	6m+18sm+12st+40a	-	Simples*; 1a(t)	Rio Corumbataí	Alves et al. (2012a)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	12m+16sm+48st-a	-	Simples, 1m(t)	Rio das Contas	Bitencourt et al. (2012)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	12m+20sm+44st-a	-	Simples, 1m(t)	Rio Preto do Costa	Bitencourt et al. (2012)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	10m+14sm+52st-a	-	Simples, 1m(t)	Rio Oricó	Bitencourt et al. (2012)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	10m+20sm+46st-a	-	Simples, 1m(t)	Rio Preto do Criciúma	Bitencourt et al. (2012)
<i>Hypostomus</i> cf. <i>wuchereri</i>	76	10m+18sm+48st-a	-	Simples*; 1m(t)	Rio Mutum	Bitencourt et al. (2011)
<i>Hypostomus</i> cf. <i>wuchereri</i>	76	10m+18sm+48st-a	-	Simples*; 1m(t)	Rio Una	Bitencourt et al. (2011)
<i>Hypostomus</i> sp. F	76	10m+16sm+50st-a	-	-	Rio São Francisco	Artoni; Bertollo (1999)
<i>Hypostomus iheringi</i>	80	8m+16sm+28st+28a	1sm(i)	Múltiplas; 2st(t); 1a(t)	Córrego Lapa	Traldi et al. (2012)
<i>Hypostomus</i> cf. <i>topavae</i>	80	6m+8sm+42st+24a	-	Múltiplas*; 1st(t); 1a(t)	Córrego Carrapato	Martinez et al. (2011)
<i>Hypostomus topavae</i>	80	14m+10sm+26st+30a	-	Simples*, 1a(t)	Rio Piquiri	Bueno et al. (2012; 2013)
<i>Hypostomus</i> sp. E	80	8m+16sm+56st-a	-	Múltiplas*; 1sm; 1st-a(t)	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni; Bertollo (1996; 1999)
<i>Hypostomus</i> sp. 3	82+B	6m+12sm+64st-a	-	-	Córrego Salobrinha	Cereali et al. (2008)
<i>Hypostomus perdido</i>	84	6m+16sm+62st-a	-	Simples*; 1st-a(t)	Rio Perdido	Cereali et al. (2008)

*Sítios localizados indiretamente através de impregnação por nitrato de prata.

3 Referências

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JÚNIOR, H. F.; BORGHETTI, J. R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. **UNIMAR**, v. 14, supl., p. 89-107, 1992.

ALBERT, J. S.; CARVALHO, T. P. Neogene Assembly of Modern Faunas. In: Albert, J.S.; Reis, R. E. (eds.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes** California:University of California Press, 2011. p. 119-136.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, v. 124, p. 127-136, 2005.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, p. 1-9, 2006.

ALVES, A. L., BORBA, R. S., OLIVEIRA, C., NIRCHIO, M., GRANADO, A., FORESTI, F. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 6, p. 443-452, 2012a.

ALVES, A. L., BORBA, R. S., POZZOBON, A. P. B., OLIVEIRA, C., NIRCHIO, M., GRANADO, A., FORESTI, F. Localization of 18S ribosomal genes in suckermouth armoured catfishes Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) with the discussion on the Ag-NOR evolution. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, p. 315-321, 2012b.

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

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

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

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**, v. 106, p. 209-214, 1999.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, p. 201-210, 2001.

ARTONI, R.F.; VENERE, P.C.; BERTOLLO, L.A.C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**, v. 63, p. 421-425, 1998.

ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. **Biological and Health Sciences**, v. 6, p. 43-60, 2000.

BITENCOURT, J. A., AFFONSO, P. R. A. M., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A. L. Identification of distinct evolutionary units in allopatric populations of *Hypostomus* cf. *wuchereri* Günther, 1864 (Siluriformes: Loricariidae): karyotypic evidence. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, p. 317-324, 2011.

BITENCOURT, J. A.; AFFONSO, P. R. A. M.; GIULIANO-CAETANO, L.; CARNEIRO, P. L. S.; DIAS, A. L. Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 933-943, 2012.

BREA, M.; ZUCOL, A.F. The Paraná-Paraguay Basin: Geology and Paleoenvironments. In: ALBERT JS, REIS RE, eds. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**, California:University of California Press, 2011. p. 69-87.

BUENO, V.; ZAWADZKI, C.H.; MARGARIDO, V. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 241-250, 2012.

BUENO, V.; VENERE, P.C.; ZAWADZKI, C.H.; MARGARIDO, V. Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p. 103-112, 2013.

CARDOSO, Y. P.; ALMIRÓN, A.; CASCIOTTA, J.; AICHINO, D.; LIZARRALDE, M. S.; MONTROYA-BURGOS, J. I. Origin of species diversity in the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) inhabiting the Paraná river basin, with the description of a new species. **Zootaxa**, v. 3453, p. 69-83, 2012.

CEREALI, S.S.; POMINI, E.; ROSA, R.; ZAWADZKI, C.H.; FROELICH, O.; GIULIANO-CAETANO, L. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 583-591, 2008.

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

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

DE PINNA, M.C.C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysii): Historical Overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba LR., Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**, Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 279-330.

DIEGUES, A.C.S. The Platina Basin. In: DIEGUES, A.C.S. **An inventory of Brazilian wetlands**. Switzerland: IUCN, 1994. p. 99-120.

ENDO, K. S., MARTINEZ, E. R. M., ZAWADZKI, C. H., PAIVA, L. R. S., JÚLIO JR, H. F. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. **Acta Scientiarum**, v. 34, p.181-189, 2012.

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

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. World Wide Web electronic publication. 2012. Disponível em <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 16 Abr 2014.

INGENITO, L.F.S.; DUBOC, L.F.; ABILHOA, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto rio Iguaçú, Paraná, Brasil. **Arquivos de ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 7, p. 23-36, 2004.

ISBRÜCKER, I. J. H. Nomenklator der Gattungen und Arten der Harnischwelse. Familie Loricariidae Rafinesque, 1815 (Teleostei, Ostariophysii). **Datz Sonderheft Harnischwelse** v. 2, p. 25-1, 2001.

- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Hereditas**, v. 141, p. 237-242, 2004a.
- KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 106, p. 107-110, 2004.
- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, v. 94, p. 180-186, 2005.
- LABORDE, L.C. The Rio de la Plata River Basin: The Path Towards Basin Institutions. In: VARIS, O.; TORTAJADA, C.; BISWAS, A.K.; eds. **Management of Transboundary Rivers and Lakes**, Berlin:Springer, 2008. p. 269-292.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. *Caderno da Região Hidrográfica do Uruguai*, Brasília:MMA.
- MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, p. 289-300, 2011.
- MARTINEZ, E.R.M. **Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e seqüências de DNA**. Botucatu: UNESP, 2009. 119 p. Tese (doutorado) –Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009.
- MARTINEZ, E.R.M.; ZAWADZKI, C.H.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 562-568, 2011.
- MAURUTTO, F. A. M.; MANVAILER, L. F. S.; SCZEPANSKI, T. S.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F. Cytogenetic characterization of three allopatric species of *Hypostomus* Lacépède (1803) (Teleostei, Loricariidae). **Caryologia**, v. 65, p. 340-346, 2012.
- McNEILL, A.R. Carps and perches. In: McNeill, A.R. **The Chordates**. 2^a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. p. 173-206.

- MENDES-NETO, E. O.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comparative Cytogenetics**; v. 5, p. 133–142, 2011.
- MICHELE, J. L., TAKAHASHI, C. S., FERRARI, I. Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). **Cytologia**, v. 42, p. 539-546, 1977.
- MILHOMEM, S.S.R.; CASTRO, R.R.; NAMAGASHI, C.Y.; SOUZA, A.C.P; FELDBERG, E.; PIECZARKA, J.C. Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). **Comparative Cytogenetics**, v. 4, p.45-54, 2010.
- MONTOYA-BURGOS, J.I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1855-1857, 2003.
- MULLER, S.; WEBER, C. Les dents des sous-families Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 99,p. 747-754, 1992.
- MURAMOTO, J.I.; OHNO, S.; ATKIN, N.B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**, v. 24, p. 59-66, 1968.
- NELSON, J.S. *Fishes of the World*, New York: John Wiley and Sons, 2006.
- REIS, R.E.; WEBER, C.; MALABARBA, L.R. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Revue Suisse de Zoologie**, v. 97, p. 729-766, 1990.
- REIS, R.E. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 124, p. 105-168, 1998.
- REIS, R.E.; PEREIRA, E.H.L.; ARMBRUSTER, J.W. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 147, p. 277-299, 2006.
- RODRIGUES, R.M. Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva. Botucatu: USP, 2010. 119 p. Dissertação (mestrado) –Curso de Pós-Graduação em Biologia, área de

concentração: Genética, Universidade Estadual de São Paulo, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2010.

RUBERT, M.; ZAWADZKI, C. H.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 6, p. 93–100. 2008.

RUBERT, M.; ROSA, R.; JEREP, F. C.; BERTOLLO, L. A. C.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, p. 397–410. 2011.

TRALDI, J. B.; VICARI, M. R.; BLANCO, D. R.; MARTINEZ, J. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. First karyotype description of *Hypostomus iheringii* (Regan, 1908): a case of heterochromatic polymorphism. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, p. 115–125, 2012.

TRALDI, J. B.; BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; MARTINEZ, J. F.; LUI, R. L.; BARROS, A. V.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 463–471, 2013.

VILELLA, F.S.; BRUSCHI Jr, W. Meio Biótico Aquático. In: FEPAM/UFRGS. **Análise de fragilidades ambientais e da viabilidade de licenciamento de aproveitamentos hidrelétricos dos rios Ijuí e Butuí-Piratinim-Icamaquã, região hidrográfica do rio Uruguai, RS**. Porto Alegre, 1 CD-Rom. 2004. Disponível em: http://www.fepam.rs.gov.br/biblioteca/hidreletrico_uruguai/arquivos/pg08.html. Acesso em 22 out 2011.

WEBER, C. Hypostominae. In: REIS R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr., C.J. (eds.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**, Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 351-372.

CAPÍTULO 2

**Citotaxonomia de *Hypostomus luteomaculatus* e *Hypostomus regani*
(Loricariidae: Hypostominae): um caso de não sinonímia confirmado pela
citogenética**

Artigo elaborado e formatado conforme as
normas para publicação científica no
periódico *Journal of Fish Biology*

RESUMO

Duas espécies de *Hypostomus* (*H. luteomaculatus* e *H. regani*) foram analisadas através de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares. Ambas apresentaram o número diploide de 72 cromossomos ($20m-sm+52st-a$). O bandamento C e a coloração por fluorocromos base-específicos revelaram diversas bandas intersticiais AT-ricas em ambas espécies. A hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S demonstrou somente um par de cromossomos portando essas sequências. A hibridização com sondas de DNAr 18S confirmou marcações obtidas com impregnação por nitrato de prata em um único par em *H. luteomaculatus* e em dois pares em *Hypostomus regani*, consistindo na única diferença observada entre as espécies. A ocorrência de *H. regani* em simpatria com *H. luteomaculatus*, com ambas espécies apresentando características diferentes em relação aos sítios de DNAr 18S, é considerada um indicativo de que as espécies são entidades distintas isoladas reprodutivamente. Comparações com filogenias propostas para o gênero são realizadas, e possíveis características do clado a que pertencem estas espécies são discutidas.

Palavras-chave: Citotaxonomia; DAPI; dispersão de heterocromatina; DNAr 18S

ABSTRACT

Two species of *Hypostomus* (*H. luteomaculatus* e *H. regani*) were analyzed through classical and molecular cytogenetic techniques. Both species had the diploid number of 72 chromosomes ($20m-sm+52st-a$). C-banding and base-specific fluorochrome staining showed many AT-rich bands in both species. Fluorescence *in situ* hybridization with 5S rDNA probes showed only one chromosome pair bearing these sequences. Hybridization with 18S rDNA probes confirmed the markings obtained through silver nitrate impregnation in only one chromosome pair in *H. luteomaculatus* and two pairs in *Hypostomus regani*, which consisted in the only difference between species. The sympatric occurrence of *H. regani* and *H. luteomaculatus*, with both species showing different characteristics regarding the 18S rDNA sites, is considered an indicative that both species are distinct entities reproductively isolated one from another. Comparisons with phylogenies proposed for the genus are performed, and possible characteristics of the clade that contains them are discussed.

Keywords: Cytotaxonomy; DAPI; 18S rDNA; heterochromatin dispersion

Introdução

Hypostomus é um gênero complexo do ponto de vista taxonômico e evolutivo. Com um grande número de espécies, além de uma grande variabilidade intraespecífica nos padrões morfológicos e de coloração, a delimitação das espécies é pouco clara (Weber, 2003). O gênero também é citogeneticamente diverso, com uma grande variação nos números diploides e fórmulas cariotípicas. Os números diploides variam de $2n=64$ a $2n=84$ cromossomos, considerando *Squaliforma* como um gênero válido, e diversas espécies apresentam variações populacionais na fórmula cariotípica (Bueno *et al.*, 2012). Como o número de espécies é muito elevado, os estudos citogenéticos neste grupo tendem a ser descritivos, e existe muita dificuldade na comparação dos dados.

Em grupos problemáticos, a citogenética pode ser utilizada como uma ferramenta para auxiliar a identificação de espécies, suas relações filogenéticas e a caracterização de complexos de espécies (Artoni *et al.*, 2000; Bellafronte *et al.*, 2005). Um estudo comparativo entre a filogenia, biogeografia e citogenética do grupo já foi realizado, demonstrando a existência de ao menos dois grandes grupos de espécies apresentando intervalos específicos de números diploides (Bueno *et al.*, 2013). Análises com espécies relacionadas dentro destes grupos ainda não foram realizadas, desta forma pouco se sabe sobre particularidades da evolução cromossômica em grupos de espécies próximas.

As espécies de *Hypostomus* do rio Uruguai são parte de clados distintos dentro do gênero, indicando sua origem diversa (Reis *et al.*, 1990; Montoya-Burgos, 2003; Cardoso *et al.*, 2012). Entre elas, *H. regani* e *H. luteomaculatus* fazem parte de um mesmo clado relacionado com espécies da bacia do Paraná. Reis *et al.* (1990) consideraram *H. luteomaculatus* como sinônimo júnior de *H. regani* por não encontrarem características diagnósticas entre espécimes da bacia do rio Paraná e da bacia do rio Uruguai. Posteriormente, a espécie foi revalidada (Isbrücker, 2001; Weber, 2003), e tem sido considerada válida em trabalhos posteriores (Montoya-Burgos, 2003; Ferraris, 2007; Cardoso *et al.*, 2012). Em relação à distribuição, *H. luteomaculatus* é descrito para a bacia do rio Uruguai, porém com relatos de sua presença na bacia do Prata, próximo a seu estuário (Reis *et al.*, 2009, Ferraris, 2007, Cardoso *et al.*, 2012).. *H. regani* é descrito para as bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Ferraris, 2007; Reis *et al.*, 2009). O presente trabalho teve por objetivo analisar citogeneticamente *H. regani* e *H. luteomaculatus*, verificando se estas espécies apresentam diferenças cariotípicas relevantes e comparando os resultados com as

propostas filogenéticas para o grupo, aumentando o entendimento sobre a evolução cromossômica deste grupo.

Material e métodos

Hypostomus luteomaculatus e *H. regani* sintópicas foram analisados através de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares. *Hypostomus luteomaculatus* (três machos e quatro fêmeas), provenientes do rio das Antas, bacia do rio Uruguai, Mondaí - Santa Catarina, e *H. regani* (três machos e duas fêmeas) provenientes do rio Piquiri, bacia do alto Paraná, Nova Laranjeiras - Paraná e um espécime coletado no rio das Antas, na mesma localidade que *H. luteomaculatus*.

Metáfases foram obtidas a partir de células do rim anterior (Bertollo *et al.*, 1978), e analisadas através de coloração convencional por Giemsa. As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram localizadas através de impregnação por prata (Howell & Black, 1980). O bandamento C foi realizado de acordo com Sumner (1972), com adaptações propostas por Lui *et al.* (2009), e a coloração pelos fluorocromos CMA₃/DAPI seguiu o protocolo proposto por Schweizer (1980). A hibridização *in situ* por fluorescência com sondas de DNA ribossomal 5S e 18S (Pinkel *et al.*, 1986, com modificações sugeridas por Margarido & Moreira-Filho, 2008). As sondas de DNAr 5S foram obtidas de acordo com Martins & Galetti (1999), e as sondas de DNAr 18S de acordo com Hatanaka & Galetti (2004). A marcação das sondas foi realizada através de *nick translation* com digoxigenina-11-dUTP (DNAr 5S) e biotina-16-dUTP (DNAr 18S) (Roche). Os sinais foram detectados com anti-digoxigenina rodamina (DNAr 5S; Roche) e streptavidina-FITC (DNAr 18S; Sigma-Aldrich), e as lâminas foram contracoradas com DAPI. As lâminas foram analisadas no microscópio de epifluorescência Olympus BX 61. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan *et al.* (1964) e agrupados em metacêntricos-submetacêntricos e subtelocêntricos-acrocêntricos para a montagem dos cariótipos.

Resultados

Hypostomus luteomaculatus apresentou $2n=72$ cromossomos ($20m-sm+52st-a$) e AgRONs simples, localizadas na região terminal do braço curto do par 35. A hibridização *in*

situ com sondas de DNAr 18S confirmou as marcações pelo nitrato de prata. Sítios de DNAr 5S foram localizados somente em posição pericentromérica do braço curto do par 8. O bandamento C identificou bandas centroméricas, terminais e diversas bandas intersticiais. As bandas intersticiais mostraram-se todas AT-ricas através da dupla coloração com DAPI e Cromomicina A₃ (Fig. 1a-b; 2a).

Hypostomus regani apresentou $2n=72$ cromossomos ($20m-sm+52st-a$) e AgRONS múltiplas, localizadas na região terminal do braço curto dos pares 32 e 35. Alguns espécimes apresentaram uma marcação adicional no par 25. Todas as marcações observadas por através de impregnação por nitrato de prata foram confirmadas através da hibridização *in situ* com sondas de DNAr 18S. Somente um par de cromossomos (par 8) apresentou sítios de DNAr 5S, em posição pericentromérica. O bandamento C identificou um padrão de bandas semelhante ao de *H. luteomaculatus*, com algumas bandas centroméricas e terminais, além de diversas bandas intersticiais. As bandas intersticiais observadas em *H. regani* também apresentaram composição AT-rica (Fig. 1 c-d; 2b).

Discussão

Hypostomus regani e *H. luteomaculatus* são duas espécies morfologicamente semelhantes, de tal forma que *H. luteomaculatus* já foi considerado sinônimo júnior de *H. regani* (Reis *et al.*, 1990). Citogeneticamente, o presente trabalho é a primeira descrição de *H. luteomaculatus*, enquanto *H. regani* já apresenta diversas descrições (Artoni & Bertollo, 1996; Alves *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2011; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2013). Cada população de *H. regani* analisada apresentou particularidades referentes à composição cromossômica. Porém, as diferentes fórmulas cariotípicas propostas resultam de diferenças pequenas entre os cromossomos, que posicionam alguns pares em pontos diferentes do cariótipo, sendo que a macroestrutura cariotípica permanece bastante semelhante, de forma geral.

As duas espécies analisadas apresentaram o mesmo número diploide, fórmula cariotípica, padrão de bandamento e localização do DNAr 5S, diferindo somente no número de sítios de DNAr 18S. Pelo elevado número de espécies de *Hypostomus* existentes e pela ausência de filogenias amplas para o gênero, não existem estudos comparando cariótipos de espécies filogeneticamente próximas de *Hypostomus*. Ao contrário, a maior parte dos estudos foca na diversidade cromossômica do gênero. *Hypostomus luteomaculatus* e *H. regani* não

são somente semelhantes morfológicamente, mas também estão em um mesmo clado em *Hypostomus* (Montoya-Burgos, 2003; Cardoso *et al.*, 2012), o que justifica sua semelhança a nível citogenético. Além destas espécies, *H. nigromaculatus* e *H. myersi* também fazem parte deste clado de *Hypostomus*. A primeira apresenta três populações analisadas, com o mesmo número diploide (76 cromossomos), mas diferem consideravelmente entre si cromossomicamente (Rubert *et al.*, 2008; Traldi *et al.*, 2013). A população de *H. nigromaculatus* analisada por Traldi *et al.* (2013) aparenta mais semelhanças com as analisadas no presente estudo, porém nenhum dos dois estudos apresentou o grande número de bandas intersticiais observado para as espécies aqui analisadas. *Hypostomus myersi* ainda não apresenta descrição citogenética publicada, porém já foi analisada e os resultados foram publicados em eventos científicos. Casale *et al.* (2001) descrevem o cariótipo de *H. myersi* com 74 cromossomos, AgRONS simples e presença de muitos blocos heterocromáticos, possivelmente se assemelhando às espécies aqui analisadas. Embora *H. luteomaculatus* e *H. regani* sejam citogeneticamente mais semelhantes entre si do que a estas espécies, filogeneticamente *H. regani* é irmã de *H. nigromaculatus* e *H. luteomaculatus* é irmã de um clado contendo *H. myersi*, *H. nigromaculatus* e *H. regani* (Cardoso *et al.*, 2012) (Fig. 3).

Outras espécies de *Hypostomus* com $2n=72$ cromossomos são *H. goyazensis*, *H. aff. heraldoi*, *H. hermanni* e *H. strigaticeps* (Alves *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2013), das quais as três últimas apresentam cariótipos mais semelhantes aos observados no presente estudo. De acordo com seus números diploides, essas espécies provavelmente fazem parte do clado D3 ou D4 da filogenia proposta por Montoya-Burgos (2003) e Cardoso *et al.* (2013). Considerando os dados existentes para esses grupos, cada um desses clados parece ter características citogenéticas particulares (Capítulo 3), porém não existem dados o suficiente pra confirmar que estas características estejam restritas a cada um dos grupos.

Reis *et al.* (1990) sinonimizaram *H. luteomaculatus* a *H. regani* por não encontrar diferenças diagnósticas entre as populações do rio Paraná e do rio Uruguai. Embora as duas espécies analisadas compartilhem muitas características morfológicas e citogenéticas, elas diferem em relação ao número de pares portadores de DNAr 18S. Somente uma das populações de *H. regani* analisadas, proveniente do rio Piumhi (Mendes-Neto *et al.*, 2011) apresenta um único par com sítios de DNAr 18S. Esta população também apresenta múltiplos pares com sítios de DNAr 5S, diferindo da população analisada no presente estudo também nesse aspecto. Somente a variação no número de sítios de DNAr 18S não seria o bastante para apoiar o status de *H. luteomaculatus* como válida. Porém, esta característica foi observada

também em um espécime de *H. regani* em sintopia com *H. luteomaculatus*. Se estes indivíduos de fato tratassem de uma única espécie, seria esperado que ao menos parte dos espécimes de *H. luteomaculatus* apresentassem cromossomos adicionais com sítios de DNAr 18S, o que não foi verificado em nenhum espécime analisado. Em alguns grupos de peixes, as RONS são consideradas um marcador específico, como em *Parodon* (Jesus & Moreira-Filho, 2000) e Curimatidae (Teribele *et al.*, 2008). Embora este não seja o caso para *Hypostomus* na maior parte dos casos, a presença de um número diferente de sítios de DNAr 18S e AgRONS nas espécies analisadas constituiu um marcador que permitiu o discernimento entre estas. Aliado aos resultados das filogenias moleculares propostas por Montoya-Burgos (2003) e Cardoso *et al.* (2012), que separam *H. luteomaculatus* de *H. regani*, o presente trabalho também indica que ambas espécies são entidades válidas.

As espécies analisadas no presente trabalho apresentaram uma grande quantidade de heterocromatinas AT-ricas intersticiais equilocais. Esta situação já foi observada em *Hypostomus* sp. F e *Hypostomus* sp. E (Artoni & Bertollo, 1999). Estas duas espécies apresentam números diploides maiores do que *H. regani* e *H. luteomaculatus*, com 76 (*Hypostomus* sp. F) e 80 (*Hypostomus* sp. E) cromossomos, porém o mesmo número de pares com estas heterocromatinas é observado nas espécies aqui analisadas e em *Hypostomus* sp. E, todas em cromossomos subtelocêntricos ou acrocêntricos (Artoni & Bertollo, 1999). Artoni & Bertollo (1999) explicam a ocorrência de tais heterocromatinas equilocais pelo modelo de dispersão de heterocromatina de Schweizer & Loidl (1987), onde a presença intersticial equilocal nos cromossomos maiores é resultado da transposição de heterocromatina terminal de cromossomos menores para estas regiões devido à proximidade no núcleo interfásico. Enquanto este evento pode ter ocorrido independentemente em espécies ou grupos de *Hypostomus*, a existência destas bandas em mesmo número e posição em mais de uma espécie indica uma possível origem comum. A heterocromatina GC-rica, em contrapartida, foi localizada na região das RONS, com um bloco heterocromático conspicuo e com composição fortemente GC-rica.

Os marcadores cromossômicos foram eficientes na separação de *H. regani* e *H. luteomaculatus* e forneceram novos dados sobre a correlação de características citogenéticas à evolução do gênero. Esta análise demonstra que a associação da filogenia à interpretação de dados citogenéticos de grupos complexos é uma ferramenta importante para a compreensão da evolução cromossômica destes grupos. Com o elevado número de espécies existentes em *Hypostomus*, um número maior de espécies analisadas citogeneticamente e o estabelecimento de filogenias mais amplas para o gênero auxiliariam grandemente o entendimento do grupo.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização para a captura dos peixes. Os autores agradecem a Ângelo e Estanislaw Przybitowicz, à Unioeste e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) pelo suporte logístico. Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária, CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências

- 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.
- Artoni, R. F. & Bertollo, L. A. C. (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* **49**, 81–90.
- Artoni, R. F. & Bertollo, L. A. C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* **106**, 209–214.
- Artoni, R. F., Vicari, M. R. & Bertollo, L. A. C. (2000). Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. *Biological and Health Sciences* **6**, 43-60.
- Bellafronte, E.; Margarido, V. P. & Moreira-Filho, O. (2005) Citotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Genetics and Molecular Biology* **28**, 710-716.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* **1**, 103–120.
- Bueno, V., Zawadzki, C. H. & Margarido, V. (2012). Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **22**, 241–250.
- Bueno, V., Venere, P. C., Zawadzki, C. H. & Margarido V. (2013). Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **23**, 103–112.

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

Casale, V. C.; Tchaicka, L.; Pegoraro, J. L & Margarido, V. P. (2001). Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies pertencentes ao gênero *Hypostomus* (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Anais do 47º Congresso Nacional de Genética. Águas de Lindóia, SP. Disponível em: http://web2.sbg.org.br/congress/CongressosAnteriores/Pdf_resumos/47/GA/773.pdf

Endo, K. S., Martinez, E. R. M., Zawadzki, C. H., Paiva, L. R. S. & Júlio Jr, H.F. 2012. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. *Acta Scientiarum* **34**: 181–189.

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

Hatanaka, T. & Galetti Jr., P. M. (2004). Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* **122**, 239-244.

Howell, W. M. & Black D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a I-step method. *Experientia* **36**, 1014–1015.

Isbrücker, I. J. H. (2001). Nomenklator der Gattungen und Arten der Harnischwelse. Familie Loricariidae Rafinesque, 1815 (Teleostei, Ostariophysi). *Datz Sonderheft Harnischwelse* **2**, 25–1.

Jesus, C. M. & Moreira-Filho, O. (2000). Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei, Parodontidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **11**, 75–80.

Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**, 201–220.

Lui, R. L., Blanco, D. R., Margarido, V. P. & Moreira-Filho, O. (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco basin (MG, Brasil). *Micron* **40**, 552–559.

Margarido, V. P. & Moreira-Filho, O. (2008). Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostaariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology* **31**, 235–238.

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

Martins, C. & Galetti Jr., P. M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* **7**: 363–367.

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

Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 2934–2938.

Reis, R. .; 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 de Zoologie* **97**, 729-766.

Rubert, M., Zawadzki, C. H. & Giuliano-Caetano, L. (2008). Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology* **6**, 93–100.

Rubert, M., Rosa, R., Jerep, F. C., Bertollo, L. A. C. & Giuliano-Caetano, L. (2011). Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803

(Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *Comparative Cytogenetics* **5**, 397–410.

Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **27**, 190-193.

Schweizer D, Loidl J (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes Today* **9**, 61-74.

Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**, 304-306.

Teribele, R.; Graena, W.; Carvalho, K.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A. L. (2008). Karyotypic analysis in two species of fishes of the family Curimatidae: AgNO₃, CMA3 and FISH with 18S probe. *Caryologia* **61**, 211-215.

Traldi, J. B., Blanco, D. R., Vicari, M. R., Martinez, J. F., Lui, R. L., Barros, A. V., Artoni, R. F. & Moreira-Filho, O. (2013). Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genetics and Molecular Research* **12**, 463–471.

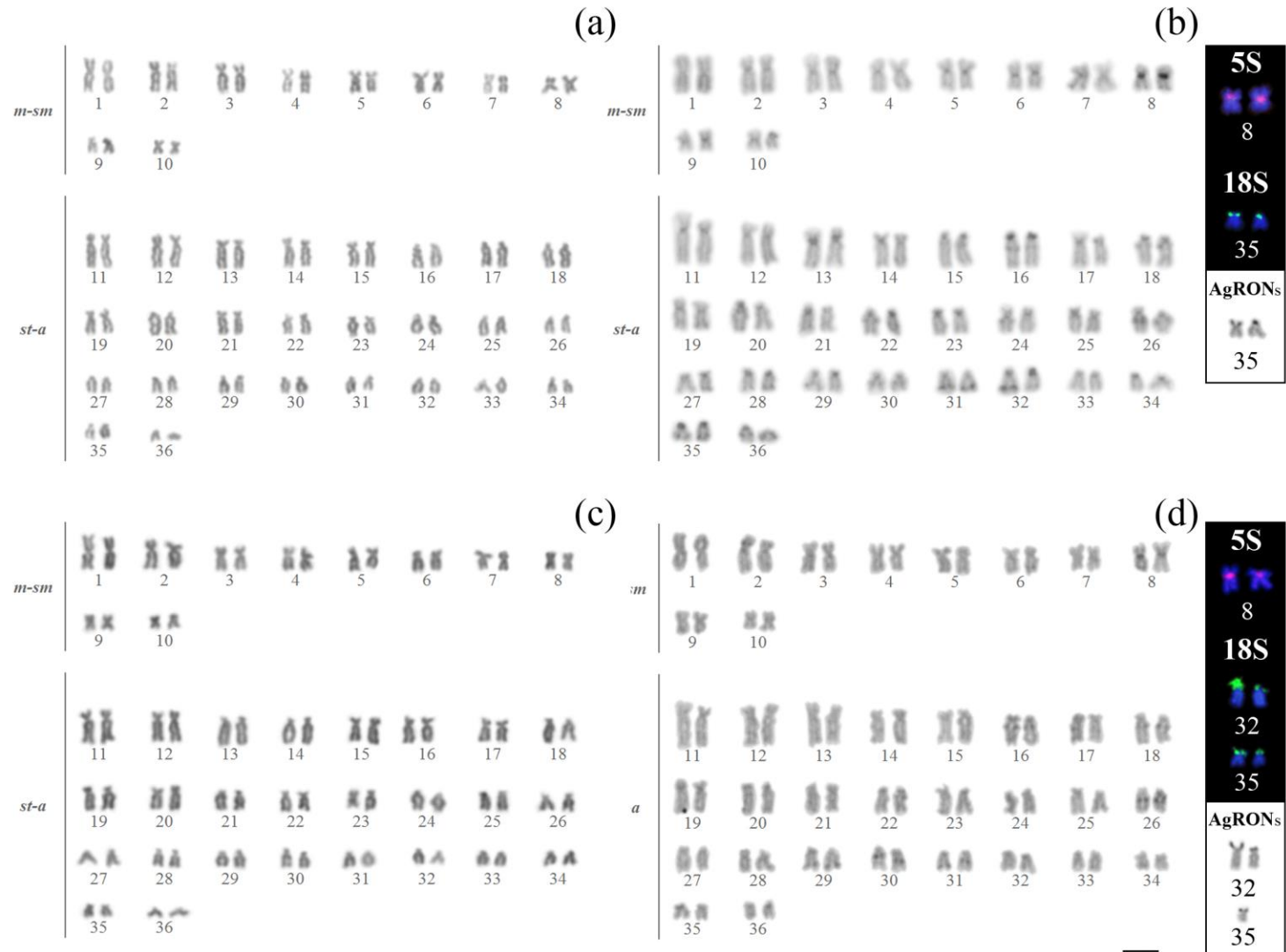


Figura 1 Cariótipos de *Hypostomus luteomaculatus* (a;b) e *Hypostomus regani* (c; d) corados por Giemsa (a; c) e c-bandados (b; d). Em destaque os cromossomos portadores dos sítios de DNAr 5S, 18S e Ag RONS. A barra representa 5µm.

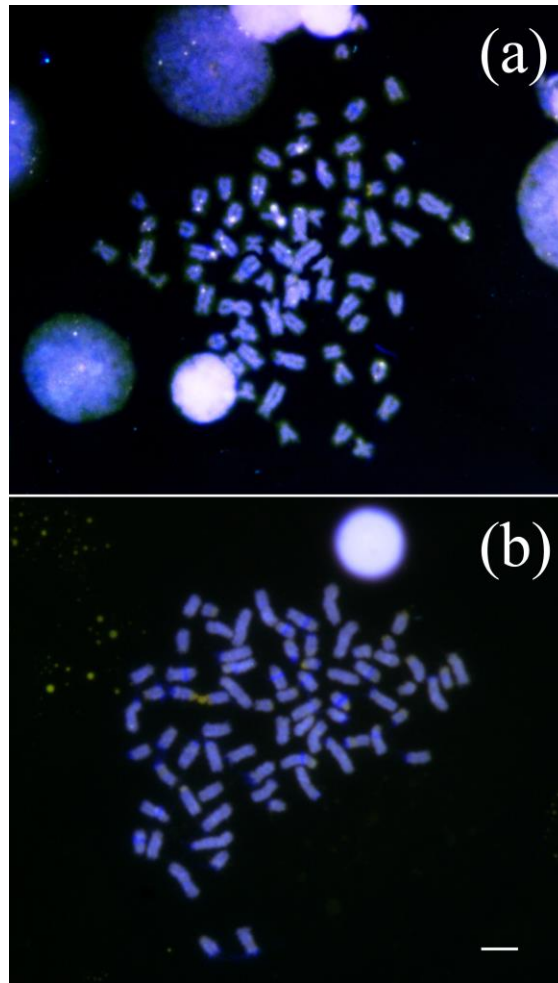


Figura 2 Metáfases de *Hypostomus luteomaculatus* (a) e *Hypostomus regani* (b) coradas pelos fluorocromos CMA₃ e DAPI sobrepostos. A barra representa 5µm.

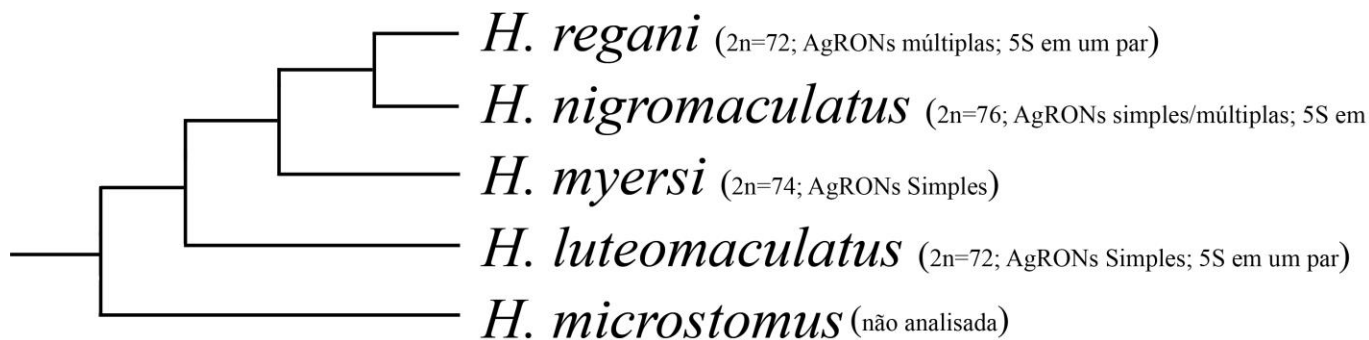


Figura 3 Dados citogenéticos de espécies de *Hypostomus* do clado D3-1, adaptado de Montoya-Burgos (2003).

CAPÍTULO 3

Citogenética comparativa entre três espécies de *Hypostomus* (Loricariidae: Hypostominae) de um mesmo clado das bacias dos rios Uruguai e Paraná

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Journal of Fish Biology*

RESUMO

Hypostomus é um gênero de peixes taxonomicamente e filogeneticamente complexo dentro de Loricariidae. Esta complexidade se estende ao nível cromossômico, sendo *Hypostomus* um dos gêneros cromossomicamente mais diversos de Hypostominae. Desta forma, estudos comparativos que integrem diferentes aspectos da evolução deste grupo são ferramentas válidas para sua melhor compreensão. O presente estudo caracterizou citogeneticamente três espécies filogeneticamente próximas de *Hypostomus*, duas das quais descritas citogeneticamente pela primeira vez. *Hypostomus albopunctatus* e *H. luteus* apresentaram $2n=74$ cromossomos, ambas com $22m-sm+52st-a$. *Hypostomus isbrueckeri* apresentou $2n=76$ cromossomos, com $22m-sm+54st-a$. Todas as espécies apresentaram pouca heterocromatina e sítios de DNAr 18S em um par de cromossomos acrocêntricos pequenos. A maior parte dos exemplares de *H. isbrueckeri* apresentou uma marcação extra em um cromossomo metacêntrico pequeno. As três espécies analisadas apresentaram uma estrutura cariotípica semelhante, corroborando sua proximidade filogenética.

Palavras-chave: bacia do rio Uruguai, DNAr 18S, Evolução cromossômica, filogenia de *Hypostomus*

ABSTRACT

Hypostomus is a taxonomically and phylogenetically complex fish genus in Loricariidae. This complexity extends to chromosome level, since *Hypostomus* is one of the genera with most chromosome diversity in Hypostominae. Therefore, comparative studies that integrate different aspects of the evolution of this group are valid tools for its better comprehension. The present study characterized cytogenetically three phylogenetically close species of *Hypostomus*, from which two are being cytogenetically described for the first time. *Hypostomus albopunctatus* and *H. luteus* had $2n=74$ chromosomes, both with $22m-sm+52st-a$. *Hypostomus isbrueckeri* had $2n=76$ chromosomes, with $22m-sm+54st-a$. All species showed little heterochromatin and 18S rDNA sites in a small acrocentric chromosome pair. Most specimens of *H. isbrueckeri* had an extra mark in a small metacentric chromosome. The three analyzed species showed a similar karyotypic structure, corroborating their close phylogenetic relationship.

Keywords: Chromosome evolution, 18S rDNA, Uruguay River basin, *Hypostomus* phylogeny

Introdução

Loricariidae é a maior família da ordem Siluriformes, com espécies distribuídas pelas Américas Central e do Sul (Armbruster, 2004). Entre os loricariídeos, *Hypostomus* é um gênero de peixes particularmente complexo, com um elevado número de espécies e variação intra e interespecífica nos padrões de coloração, o que dificulta a delimitação de espécies (Weber, 2003). Associado à sua ampla distribuição, o número de espécies descritas é um obstáculo para estudos amplos sobre o gênero, resultando na predominância de estudos descritivos e poucas propostas verdadeiramente abrangentes sobre a evolução do grupo.

Entre as filogenias existentes para *Hypostomus* destacam-se as propostas por Montoya-Burgos (2003) e Cardoso *et al.* (2012), baseadas em caracteres moleculares, e a proposta por Armbruster (2004), baseada em caracteres morfológicos, porém incluindo um número menor de espécies, visto que o foco do estudo foi Hypostominae, não *Hypostomus* especificamente. Embora o uso de uma grande proporção de espécies diferentes entre os estudos moleculares e morfológicos impeça uma comparação precisa entre ambos, alguns agrupamentos aparentam ser semelhantes. Exemplos são o grupo *H. cochliodon*, cujas espécies se encontram agrupadas em ambas filogenias, ou o agrupamento de *H. commersoni* com *H. boulengeri*. Em contraste com estes dados, os grandes clados formados em cada um dos estudos têm posições consideravelmente diferentes, e existem pontos de conflito, como a posição de *H. punctatus* e de *Squaliforma*.

Os estudos citogenéticos são uma ferramenta útil em estudos evolutivos, podendo auxiliar no esclarecimento de grupos complexos (Artoni *et al.*, 2000). Citogeneticamente, *Hypostomus* é particularmente interessante por possuir características muito divergentes dos outros Hypostominae. Enquanto a maior parte das espécies desta subfamília apresenta números diploides de 52 ou 54 cromossomos (ver capítulo 4), próximos ao número considerado primitivo para Loricariidae (Artoni & Bertollo, 2001), *Ancistrus* e *Hypostomus* apresentam números diploides mais baixos e mais altos do que este valor, respectivamente. No caso de *Hypostomus*, a variação de números diploides é de 64 a 84 cromossomos (Bueno *et al.*, 2012). Assim como a filogenia do gênero é complexa, também o aumento no número diploide não segue um padrão claro, e espécies com números diploides próximos não estão necessariamente relacionadas (Bueno *et al.*, 2013). Desta forma, a comparação dos dados citogenéticos com as filogenias existentes para o gênero permite uma confirmação mútua entre os dados, que podem ser comparados para reforçar as hipóteses existentes. Assim, o

presente trabalho teve por objetivo comparar citogeneticamente espécies filogeneticamente próximas buscando ampliar a compreensão sobre a evolução cromossômica deste complexo grupo de peixes.

Material e Métodos

Foram coletadas três espécies de *Hypostomus* pertencentes ao clado D4 da filogenia proposta por Montoya-Burgos (2003). *Hypostomus albopunctatus* (treze machos e cinco fêmeas) foi coletado no rio Piquiri, bacia do rio Paraná, Nova Laranjeiras - Paraná; *H. isbrueckeri* (dezoito machos e cinco fêmeas) e *H. luteus* (seis machos e duas fêmeas) foram coletados no rio das Antas, bacia do rio Uruguai, Mondaí - Santa Catarina.

Os animais foram anestesiados e sacrificados através de overdose de óleo de cravo (Griffiths, 2000). Células metafásicas foram obtidas do rim anterior (Bertollo *et al.*, 1978), e analisadas através de coloração convencional por Giemsa, bandamento C (Sumner, 1972, com adaptações propostas por Lui *et al.*, 2009) e hibridização *in situ* por fluorescência com sondas de DNA ribossomal 18S (Pinkel *et al.*, 1986, com modificações sugeridas por Margarido & Moreira-Filho, 2008). As sondas de DNAr 18S foram obtidas de acordo com Hatanaka & Galetti (2004), marcadas através de *nick translation* com biotina-16-dUTP. Os sinais foram detectados com streptavidina-FITC (Sigma-Aldrich), e as lâminas foram contracoradas com DAPI. A coloração com os fluorocromos CMA₃/DAPI seguiu o protocolo proposto por Schweizer (1980). As lâminas foram analisadas no microscópio de epifluorescência Olympus BX 61. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan *et al.* (1964) e agrupados em metacêntricos-submetacêntricos e subtelocêntricos-acrocêntricos para a montagem dos cariótipos. A montagem do cariótipo com somente dois grupos de cromossomos (metacêntricos+submetacêntricos e subtelocêntricos+acrocêntricos) teve a intenção de evitar alterações de posição baseadas em diferenças mínimas, que acabam por resultar em fórmulas cariotípicas diferentes baseadas em um conjunto de cromossomos muito semelhante.

Resultados

Hypostomus albopunctatus apresentou $2n=74$ cromossomos com $22m-sm+52st-a$. O bandamento C evidenciou blocos heterocromáticos principalmente na região centromérica e telomérica dos cromossomos, além de em posição intersticial no braço longo do par 18, que se

mostrou parcialmente AT-rico. Sítios de DNAr 18S foram observados somente no par 35, na região terminal do braço curto, com uma marcação adicional no braço longo do mesmo par cromossômico em alguns indivíduos (Fig. 1a e 1b). *Hypostomus isbrueckeri* apresentou $2n=76$ cromossomos, com $22m-sm+54st-a$. *Hypostomus isbrueckeri* apresentou heterocromatina principalmente em posição centromérica e terminal, com uma banda intersticial inconspícua no par 26. Sítios de DNAr 18S foram localizados no par 35, na região terminal do braço longo. A maioria dos indivíduos apresentou uma marcação adicional em um cromossomo do par 33. Quando este sítio adicional se encontra presente o cromossomo apresenta uma morfologia diferente (metacêntrico), sendo observado tanto em machos quanto em fêmeas. Na ausência deste sítio, o par é acrocêntrico (Fig. 1c e 1d). *Hypostomus luteus* apresentou 74 cromossomos, com $22m-sm+52st-a$. Blocos heterocromáticos foram observados principalmente na região centromérica dos cromossomos e no braço longo do par 24, em posição intersticial e terminal. Ambas as bandas do par 24 apresentaram composição GC-rica. Sítios de DNAr 18 S foram localizados na região terminal do braço longo do par 24 (Fig. 1e e 1f).

Discussão

O presente trabalho é o primeiro a apresentar dados citogenéticos de espécies de *Hypostomus* da bacia do rio Uruguai. As espécies analisadas apresentaram números diploides próximos, e estruturas cromossômicas semelhantes. Espécies deste gênero com números diploides elevados, com $2n=72$ ou mais cromossomos, são frequentes principalmente para a bacia do rio Paraná, porém estão distribuídos por diversas drenagens da porção central ao sul da América do Sul (Bueno *et al.*, 2013). Desta forma, a presença de espécies com $2n=74$ e 76 cromossomos na bacia do rio Uruguai é congruente com os resultados já existentes sobre a forma como espécies com estes números diploides estão distribuídas. Espécies com estes mesmos números diploides (de 74 e 76 cromossomos) são encontradas em bacias costeiras, no rio São Francisco e na já mencionada bacia do rio Paraná (Tabela 1). Esta distribuição é coincidente com a proposta de Montoya-Burgos (2003) e Cardoso *et al.* (2012), que propõem que as espécies do rio São Francisco e de algumas bacias costeiras tenham se distribuído a partir da bacia do Prata. Todas as espécies de *Hypostomus* existentes na bacia do rio Uruguai estão relacionadas a espécies do rio Paraná. As espécies analisadas no presente trabalho, assim como *H. uruguayensis* e *H. aspilogaster* estão relacionadas ao rio Paraná através de *H.*

albopunctatus e *H. luetkeni*. *Hypostomus luteomaculatus*, *H. regani*, *H. commersoni*, *H. ternetzi*, apresentam populações em ambas as bacias hidrográficas (Montoya-Burgos, 2003; Cardoso *et al.*, 2012). *Hypostomus roseopunctatus*, por sua vez, talvez esteja relacionado ao clado de *H. regani*, considerando sua morfologia (Muller & Weber, 1992).

Embora apresentem números diploides iguais, a estrutura cariotípica das espécies com 74 e 76 cromossomos apresenta uma variabilidade considerável. Uma comparação com a filogenia proposta por Montoya-Burgos (2003) revela que neste grupo existem espécies provenientes de dois grandes clados dentro de *Hypostomus* (clados D3 e D4), que são mais próximos entre si do que dos clados formados pelos grupos de *H. cochliodon* e *H. plecostomus* (Fig. 2). A relação de espécies com números diploides de 72 ou mais cromossomos com estes clados já foi verificada e discutida em Bueno *et al.* (2013), porém ainda não existe um estudo mais aprofundado sobre quais seriam as características citogenéticas de espécies de cada um desses dois clados.

Enquanto a estrutura cariotípica geral das três espécies analisadas é semelhante, podem-se observar pequenas diferenças entre os cariótipos. Estas diferenças são decorrentes frequentemente de variações muito pequenas no tamanho dos cromossomos ou relação entre braços, que acabam alterando a posição dos cromossomos no cariótipo. Além das análises citadas na Tabela 1, existe uma análise de *H. luetkeni* da bacia do Rio Doce (Eler *et al.*, 2003), também com $2n=74$ cromossomos. Desta forma, todas as espécies citogeneticamente analisadas presentes neste clado apresentam número diploide de 74 ou 76 cromossomos, indicando a possibilidade de que o ancestral comum deste clado em particular tivesse $2n=74$ cromossomos.. Como um número diploide semelhante a este é observado para o clado D3, somente o número diploide das espécies não é o bastante para associá-la a um destes dois clados. De forma geral, algumas diferenças podem ser observadas entre espécies já analisadas dos dois clados. *Hypostomus regani* e *H. luteomaculatus*, parte do clado D3, apresentam uma estrutura cariotípica distinguível das espécies analisadas no presente estudo, com todas as populações analisadas apresentando um par metacêntrico perceptivelmente grande em contraste com os cromossomos metacêntricos com tamanhos próximos observados para as três espécies aqui analisadas (Artoni & Bertollo, 1996; Alves *et al.*, 2006; Mendes-Neto *et al.*, 2011; Rubert *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2013; capítulo 2). Já as três populações de *H. nigromaculatus* descritas, pertencentes ao mesmo clado que *H. regani*, apresentam cariótipos contrastantes, inviabilizando também o uso da estrutura cariotípica como indício da posição filogenética das espécies (Rubert *et al.*, 2008; Traldi *et al.*, 2013).

O padrão de bandamento C sem muitas bandas conspícuas é frequente para *Hypostomus*, com um grande número de bandas sendo encontrado somente em algumas espécies ou grupos. *Hypostomus ancistroides* e espécies relacionadas, como *H. affinis* e *H. commersoni*, apresentam um ou mais blocos heterocromáticos GC-ricos que podem apresentar heteromorfismo de tamanho (Kavalco *et al.*, 2004; Rubert *et al.*, 2011; Bueno, 2012). *Hypostomus regani* e *H. luteomaculatus* apresentam uma série de bandas intersticiais AT-ricas (capítulo 2). *Hypostomus strigaticeps* e *H. paulinus* também apresentam algumas bandas AT-ricas conspícuas (Rubert *et al.*, 2011). Duas das espécies analisadas no presente trabalho, *H. albopunctatus* e *H. isbrueckeri*, apresentaram uma banda intersticial inconspícua nos pares 18 e 26, respectivamente. Estes segmentos aparentam ter composição parcialmente AT-rica, aparecendo com uma marcação cromomicina-negativa e pouco mais brilhante do que o resto do cromossomo em DAPI, indicando uma possível origem comum (Fig. 1). Em contraste, a banda intersticial no par 24, em *H. luteus*, é DAPI-negativa. Como está localizada no mesmo cromossomo portador dos sítios de 18S, é possível que esta heterocromatina seja proveniente da região das RONS, passando a uma posição intersticial por uma inversão paracêntrica. Nenhum cromossomo com bandas intersticiais AT-ricas é observado em *H. luteus*.

A maior parte das espécies de *Hypostomus* com 74-76 cromossomos apresenta RONS simples, porém a presença de RONS múltiplas também é frequente. RONS simples é uma característica considerada primitiva para Loricariidae (Artoni & Bertollo, 2001), e também é encontrada em todos os clados de *Hypostomus*, indicando que esta característica seja ancestral também para este gênero (Martinez, 2009; Bueno *et al.*, 2013). Os sítios de DNAr encontram-se predominantemente em posição terminal em *Hypostomus*, porém sua localização varia muito entre o braço longo e curto dos cromossomos, e muitas vezes os sítios estão localizados em cromossomos morfológicamente muito diferentes entre as espécies. Como o gênero é cariotipicamente diverso, com espécies apresentando diversos números e estruturas cariotípicas, é inviável determinar se os pares portadores dos sítios de DNAr são correspondentes (homeólogos) somente através da morfologia cromossômica, porém este não parece ser o caso. Milhomem *et al.* (2013) analisaram a localização das RONS em *Gymnotus* com sondas de DNAr 18S e sondas feitas a partir do cromossomo portador das RONS em *G. carapo*, encontrando variação no par portador dos sítios ribossomais. A variação observada pôde ser comparada com as filogenias propostas para o grupo. Em *Hypostomus*, uma quantidade significativa de espécies apresenta DNAr 18S em cromossomos acrocêntricos pequenos possivelmente relacionados, como as observadas no presente estudo além de *H. faveolus*, *H. affinis*, *H. regani*, *H. cochliodon*, *H. aff. paulinus*, *H. strigaticeps*, *H.*

nigromaculatus, entre outros, porém estudos posteriores são necessários para determinar se estes cromossomos são homeólogos (Kavalco *et al.*, 2004; Rubert *et al.*, 2008; Rubert *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2013). Considerando a presença de sítios de DNAr 18S somente em um par de cromossomos primitiva para Loricariidae e *Hypostomus*, pode-se observar que esta característica provavelmente foi mantida no ancestral comum do clado D4, já que até o presente momento todas as espécies deste clado ou apresentam somente RONS simples, como *H. luetkeni* (Eler *et al.*, 2003) e *H. luteus*, ou apresentam populações com RONS simples, como *H. albopunctatus* e *H. isbrueckeri*.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização para a captura dos peixes. Os autores agradecem a Ângelo e Estanislau Przybitowicz, à Unioeste e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) pelo suporte logístico. Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária, CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências

- Alves, A.L., Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A. & Foresti, F. (2006). Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica* **128**: 1-9.
- Alves, A.L., Borba, R.S., Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A. & Foresti, F. (2012). Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comparative Cytogenetics* **6**: 443–452.
- Armbruster, J. W. (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society* **141**, 1-80.
- Artoni, R. F. & Bertollo, L. A. C. (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* **49**, 81–90.
- Artoni, R. F. & Bertollo, L. A. C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* **134**, 201–210.
- Artoni, R. F. & Bertollo, L. A. C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* **106**, 209–214.
- Artoni, R. F., Vicari, M. R. & Bertollo, L. A. C. (2000). Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. *Biological and Health Sciences* **6**, 43-60.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* **1**, 103–120.

- Bitencourt, J. A., Affonso, P. R. A. M., Giuliano-Caetano, L. & Dias, A. L. (2011). Identification of distinct evolutionary units in allopatric populations of *Hypostomus* cf. *wuchereri* Günther, 1864 (Siluriformes: Loricariidae): karyotypic evidence. *Neotropical Ichthyology* **9**, 317-324.
- Bitencourt, J. A., Affonso, P. R. A. M., Giuliano-Caetano, L., Carneiro, P. L. S. & Dias, A. L. (2012). Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Research* **11**, 933-943.
- Bueno, V. (2012). Caracterização citogenética básica e molecular em *Hypostomus* spp. Lacépède, 1803 do rio Piquiri (PR). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
- Bueno, V., Zawadzki, C. H. & Margarido, V. (2012). Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **22**, 241–250.
- Bueno, V., Venere, P. C., Zawadzki, C. H. & Margarido V. (2013). Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **23**, 103–112.
- Eler, E. S.; Santos, J. A. D. & Alvarenga, S. M. (2003). Descrição do cariótipo de *Hypostomus luetkeni* da bacia do Rio Doce - Região sudeste. Resumos do 49º Congresso Brasileiro de Genética. Disponível em: http://web2.sbg.org.br/congress/CongressosAnteriores/Pdf_resumos/49/ga/ga090.pdf
- Griffiths, S. P. (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* **57**, 1453–1464.
- Hatanaka, T. & Galetti Jr., P. M. (2004). Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* **122**, 239-244.

- 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.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**, 201–220.
- Lui, R. L., Blanco, D. R., Margarido, V. P. & Moreira-Filho, O. (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco basin (MG, Brasil). *Micron* **40**, 552–559.
- Margarido, V. P. & Moreira-Filho, O. (2008). Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Osteariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology* **31**, 235–238.
- Martinez, E. R. M., Zawadzki, C. H., Foresti, F. & Oliveira, C. (2011). Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). *Genetics and Molecular Biology* **34**, 562–568.
- Martinez, E. R. M. (2009). Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e seqüências de DNA. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista.
- Mendes-Neto, E. O., Vicari, M. R., Artoni, R. F. & Moreira-Filho, O. (2011). Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. *Comparative Cytogenetics* **5**, 133–142.
- Michele, J. L., Takahashi, C. S. & Ferrari, I. (1977). Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia* **42**, 539–546.
- Milhomem, S. S. R., Scacchetti, P. C., Pieczarka, J. C., Ferguson-Smith, M. A., Pansonato-Alves, J. C., O'Brien, P. C. M., Foresti, F., Nagamachi, C. Y. (2013). Are NORs always

located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). *PLoS One* **8**, e55608.

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**, 1855–1857.

Muller, S. & Weber, C. (1992). Les dents des sous-familles Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. *Revue Suisse de Zoologie* **99**, 747–754.

Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 2934–2938.

Rubert, M., Zawadzki, C. H. & Giuliano-Caetano, L. (2008). Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology* **6**, 93–100.

Rubert, M., Rosa, R., Jerep, F. C., Bertollo, L. A. C. & Giuliano-Caetano, L. (2011). Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *Comparative Cytogenetics* **5**, 397–410.

Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **27**, 190-193.

Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**, 304-306.

Traldi, J. B., Blanco, D. R., Vicari, M. R., Martinez, J. F., Lui, R. L., Barros, A. V., Artoni, R. F. & Moreira-Filho, O. (2013). Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genetics and Molecular Research* **12**, 463–471.

Weber, C. (2003). Hypostominae. In *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris Jr., C. J., eds.), pp. 351–372. Porto Alegre, RS: Edipucrs.

Tabela 1 Dados citogenéticos de espécies de *Hypostomus* com número diploide de 74 ou 76 cromossomos.

Espécie	2n	Fórmula cariotípica	AgRONS/ DNAr 18S	Localidade	Referência
<i>Hypostomus</i> aff. <i>agna</i>	74	8m+10sm+32st+24a	Múltiplas*; 1sm(t); 1st(t)	Ribeirão Cavalão	Martinez <i>et al.</i> (2011)
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	10m+20sm+44st-a	Múltiplas; 3(t)	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni & Bertollo (1996)
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	10m+20sm+16st+28a	Simples*; 1sm(t)	Rio Corumbataí	Alves <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	74	8m+14sm+16st+36a	Simples*; 1a(t)	Rio Piquiri	Bueno <i>et al.</i> (2013)
<i>Hypostomus</i> prope <i>iheringi</i>	74	10m+14sm+20st+30a	Múltiplas*; 4a(t)	Rio Corumbataí	Alves <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>paulinus</i>	74	10m+12sm+20st+32a	Simples*; 1a(t)	Rio Piquiri	Bueno <i>et al.</i> (2013)
<i>Hypostomus paulinus</i>	74	10m+20sm+44st-a	-	-	Michele <i>et al.</i> (1977)
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	74	8m+4sm+62st-a	-	-	Michele <i>et al.</i> (1977)
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	74	10m+14sm+14st+36a	Múltiplas*; 1st(t); 3a(t)	Rio Corumbataí	Alves <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>auroguttatus</i>	76	8m+30sm+38st-a	Simples*; 1st-a(t)	Piracicaba e Mogi Guaçu	Artoni & Bertollo (1996)
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	8m+20sm+48st-a	Múltiplas*; 2st-a(t)	Rio Mogi Guaçu	Rubert <i>et al.</i> (2008)
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	6m+20sm+50st-a	Múltiplas*; 2st-a(t)	Rio Tibagi	Rubert <i>et al.</i> (2008)
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	76	12m+22sm+30st+12a	Simples; 1a(t)	Córrego Lapa	Traldi <i>et al.</i> (2013)
<i>Hypostomus paulinus</i>	76	6m+16sm+54st-a	Simples; 1st-a(t)	Bacia do rio Paranapanema	Rubert <i>et al.</i> (2011)
<i>Hypostomus</i> prope <i>paulinus</i>	76	6m+18sm+12st+40a	Simples*; 1a(t)	Rio Corumbataí	Alves <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	12m+16sm+48st-a	Simples*, 1m(t)	Rio das Contas	Bitencourt <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	12m+20sm+44st-a	Simples*, 1m(t)	Rio Preto do Costa	Bitencourt <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	10m+14sm+52st-a	Simples*, 1m(t)	Rio Oricó	Bitencourt <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypostomus</i> aff. <i>unae</i>	76	10m+20sm+46st-a	Simples*, 1m(t)	Rio Preto do Criciúma	Bitencourt <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypostomus</i> cf. <i>wuchereri</i>	76	10m+18sm+48st-a	Simples*; 1m(t)	Rio Mutum	Bitencourt <i>et al.</i> (2011)
<i>Hypostomus</i> cf. <i>wuchereri</i>	76	10m+18sm+48st-a	Simples*; 1m(t)	Rio Una	Bitencourt <i>et al.</i> (2011)
<i>Hypostomus</i> sp. F	76	10m+16sm+50st-a	-	Rio São Francisco	Artoni & Bertollo (1999)

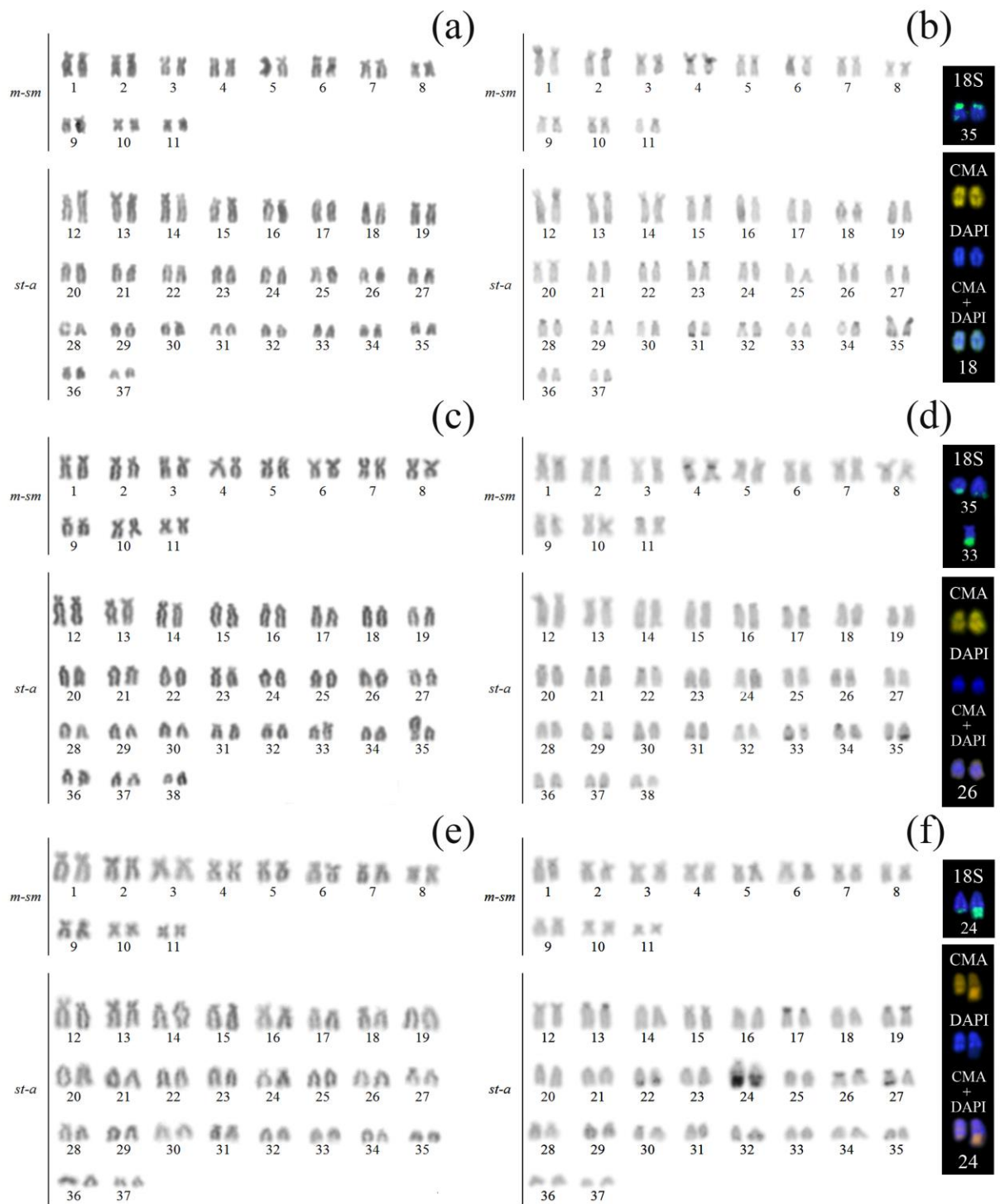


Figura 1 Cariótipos de *Hypostomus albopunctatus* (a, b); *Hypostomus isbrueckeri* (c, d) e *Hypostomus luteus* (e, f) corados com Giemsa (a, b, e) e C-bandados (b, d, f). Os cromossomos marcados pela FISH com sondas de DNAr 18S e corados com os fluorocromos CMA₃ e DAPI estão destacados nos quadros. A barra representa 5µm.

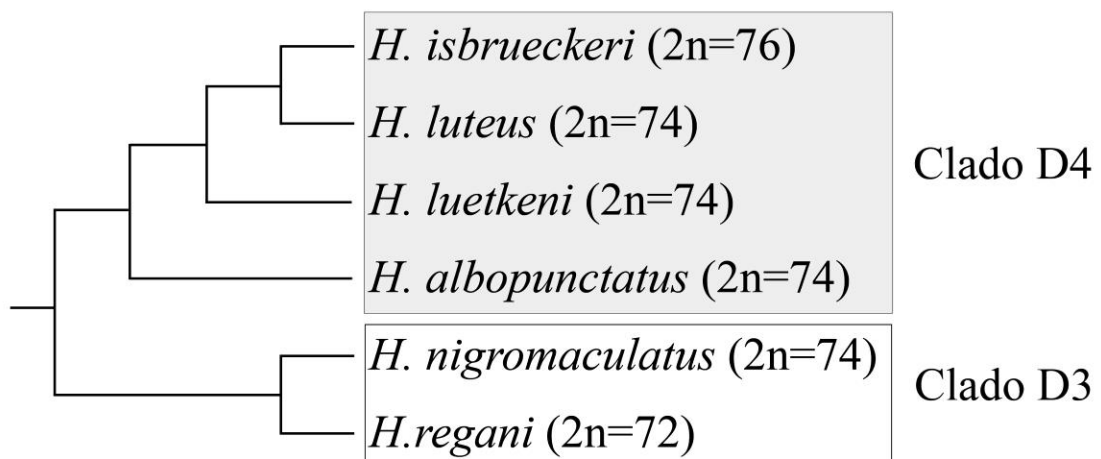


Figura 2 Cladograma adaptado de Montoya-Burgos (2003) indicando os números diploides observados para as espécies e o clado a que pertencem na referida filogenia.

ANEXO 1

Normas para publicação no periódico *Journal of Fish Biology*

1. *Journal of Fish Biology* welcomes research manuscripts containing new biological insight into any aspect of fish biology. We invite papers that report results and ideas of value to fish biology that will serve a wide international readership. Hence the novelty of the content of manuscripts should have relevance beyond a particular species or place in which the work was carried out. **All material submitted must be original and unpublished, and not under consideration for publication elsewhere.** If in doubt about overlap, please give details of any related work submitted or in press when submitting your manuscript. The *Journal* uses plagiarism detection software, so in submitting your manuscript you accept that it may be screened against previously published literature.

The Fisheries Society of the British Isles (FSBI) considers that scientists should avoid research threatening the conservation status of any species of fish, which is already regarded as threatened according to the IUCN Red List of Threatened Species and the associated Red List Categories and Criteria version 3.1 (<http://www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria>) or which is listed as such in a Red Data Book appropriate to the geographic area concerned. In accordance with this view, papers based on such research will not be accepted, unless the work had clear conservation objectives.

Authors are encouraged to place all species distribution records in a publicly accessible database such as the national Global Biodiversity Information Facility (GBIF) nodes (www.gbif.org) or data centres endorsed by GBIF, including BioFresh (www.freshwaterbiodiversity.eu/).

2. **Submission of manuscripts.** We will consider: Regular papers (original research), Review papers, which will either be invited or agreed with an Associate Editor (see 17), Brief Communications (see 18), Letters (see 19), and Comments and Replies (see 20). Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on submissions and authorship in *Journal of Fish Biology* **79**, 1-2 (2011) (available [here](#)) Manuscripts are submitted online at <http://jfb.edmgr.com>, where a user ID and password are assigned on the first visit. Full instructions and support are available on this site. **Authors are expected to suggest potential referees**, selected internationally, for their manuscripts in the 'Suggest Reviewers' section.

3. *Preparation of manuscripts.* Authors should consult a recent issue of Journal of Fish Biology for details of style and presentation. **If their manuscript does not follow the format of the Journal, it will be returned to them unreviewed.** Manuscripts must be **double-spaced throughout**, all pages must be numbered and **line numbering set to continuous**, including tables, figure legends and reference lists. **Use a font size ≥ 12 . Do not save files in PDF (portable document format) format.**

The first page must contain the following information: the title of the paper, name(s) (initials ONLY for forenames) and FULL academic address(es) of ALL author(s); if the address of any author has changed, it should be added as a footnote. Telephone number and email address for the corresponding author (**one only**) should be provided as a footnote. A concise running headline of not more than 45 characters inclusive of spaces should also be given on this page. For regular papers arrange sections in the following sequence: Title page (as a separate page), Abstract and Key Words (as a separate page), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion (**a combined Results and Discussion is not acceptable and Conclusions as a heading is only acceptable in Review Papers**), Acknowledgements (for individuals use initials only for forenames and no titles), References, Tables (with captions; see 6 below), Figure captions, Figures and Appendices. Within sections, subdivisions should not normally exceed two grades; decimal number classification of headings and subheadings should not be used (see recent past issues). Footnotes should not be used except in Tables. Spelling must be U.K. English, e.g. Concise Oxford English Dictionary (as distinct from American English) throughout, except in quotations and references. All Latin words (but excluding scientific words other than genus and species) should be in italics. **Do not write text in the first person.**

Do not duplicate information in tables and figures, or *vice versa* or in text and figures. Do not repeat table headings and figure legends in the text. Punctuation should be consistent and only a single space inserted between words and after punctuation. **Do not indicate positions of tables and figures in the text.** Two blank lines should be left after headings and between paragraphs. Text should be typed without end of line hyphenation, except for compound words. Lower case 'l' for '1' or 'O' for '0' should not be used.

4. *Abstract.* This must be concise and summarize **only** the significant findings of the paper (*i.e.* not the background or methods). It should be followed by a list of ≤ 6 **key words or key phrases that are not included in the title, with a maximum of 100 characters (including punctuation and spacing).**

5. **Illustrations.** Photographs should be selected only to illustrate something that cannot adequately be displayed in any other manner. Magnification should be given in actual terms and all stains used should be described in full. Colour figures can be included; the first two will be produced free of charge, additional figures will be produced online free of charge, print production will be at the author's expense. Authors must complete a Colour Work Agreement Form for any colour figures requiring payment. This will be indicated on acceptance. The form can be downloaded as a PDF from the home page at <http://jfb.edmgr.com>, or by clicking [here](#) Please note that the Colour Work Agreement Form must be returned by post to the address provided on acceptance. Number figures consecutively using Arabic numerals [Fig. 1, 2, *etc.*: subdivide by (a), (b), *etc.*], in order of their mention in the text. A fully descriptive caption must be provided for every figure and the complete list of captions typed together on a separate page. Captions must not be included on the figures. All relevant information, *e.g.* keys to the symbols and formulae, should be included in the caption. The minimum reduction for the figures may be indicated. Artwork should be received in digital format. Line artwork (vector graphics) should be saved as Encapsulated PostScript (EPS) and bitmap files (half-tones or photographic images) as Tagged Image Format (TIFF). Native file formats should not be submitted. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

6. **Tables.** Number consecutively in Roman numerals (Table I, II, *etc.*), **in the order of their mention in the text.** Captions for tables should be **typed directly above each table**, not on a separate page. Footnotes to tables should be indicated by superscripts and typed at the bottom of the tables. Tables and figures must 'stand alone' and so all abbreviations must be defined in the figure captions and as footnotes in the tables. Tables, figures and figure captions should be saved in separate files from the main text of the manuscript. Tables should not be embedded in the text file in picture format.

7. **Units and symbols.** Use metric units. Physical measurements should be in accordance with the Système International d'Unités (SI), *e.g.* mm, mm³, s, g, µg, m s⁻¹, g l⁻¹. Use joules not calories. Authors will find the following two publications helpful: *British Standard 1991: Part 1: 1967 Recommendations for Letter Symbols, Signs and Abbreviations and Units, Symbols and Abbreviations. A Guide for Biological and Medical Editors and Authors* (Baron, D.N., ed.) published by the Royal Society of Medicine, London.

In mathematical expressions, single letters (italics) should be used for variables, qualifying them with subscripts (not italics) if required, e.g. length L, fork length L_F, standard length L_s,

index I , gonado-somatic index I_G , hepato-somatic index I_H , etc. The 24 hour clock should be used for time of day, *e.g.* 1435 hours, not 2.35 p.m. Calendar dates should be as, *e.g.* 15 June 1998. In the text, one-digit numbers should be spelt out unless they are used with units of measure (in which case they should not be hyphenated), *e.g.* five boxes, 5 cm. Numerals should be used for all numbers of two or more digits, *e.g.* 34 boxes. Use mass(es) rather than weight(s). Means and error (S.D., S.E., 95% C.L., *etc.*), should be to the same number of decimal places. Salinity is dimensionless with no units; do not use psu, ‰ or similar.

8. **Statistics.** Present statistics as follows: name of test, test statistic with associated degrees of freedom (d.f.; note that an F -distribution has TWO d.f. values) and probability level (P). If data conform to all the assumptions of the statistical method used, precise P -values can be given, otherwise P -values should be >0.05 , 0.05, 0.01 and 0.001. The P -values given by statistical packages assume that all the assumptions of the statistical method are fully met. Although ANOVA and regression are robust, the real P -values are likely to be different from the values printed by the package, because of violations of the assumptions. Provide confidence intervals (95% C.I.) for parameters estimated by ANOVA and regression analysis. Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on reporting statistical results in *Journal of Fish Biology* **78**, 697-699 (2011) (available [here](#))

9. **Species nomenclature.** On first mention of a species name in the main text, the common name of the species, if one is available, followed by the scientific species name (Latin binomial name, in italics) with the describing authority and date of authorship must be given. The common name should not be separated from the scientific name by a comma nor should the species name be in parentheses. The describing authority and date of authorship should not be separated by a comma. For example: the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792); NOT, the rainbow trout, [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)]. First use of species names in the title and Abstract should include common and scientific names as above, but do not require the describing authority and date of authorship.

Use standard sources for species common names, including: Wheeler, A. (1992). A list of the common and scientific names of fishes of the British Isles. *Journal of Fish Biology* **41**(Supplement A) (for British fishes); Wheeler, A.C., Merrett, N.R. & Quigley, D.T.G. (2004). Additional records and notes for Wheeler's (1992) *List of the Common and Scientific Names of Fishes of the British Isles*. *Journal of Fish Biology* **65**, Supplement B (for British fishes); Nelson, J.S., Crossman, E.J., Espinosa-Pérez, H., Findley, L.T., Gilbert, C.R., Lea, R.N. & Williams, J.D. (2004). *Common and scientific names of fishes from the United*

States, Canada, and Mexico. Committee on Names of Fishes. 6th edn. Bethesda, MD, U.S.A.: American Fisheries Society (for North American fishes; except those covered above for British fishes); Froese, R. & Pauly, D. (Eds) (2010). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org; *FAO Guides for Fisheries Purposes*.

When first using scientific species names the describing authority name appears in parentheses only if the binomial combination of the name has changed since the original description. *Oncorhynchus clarkii* (Richardson 1836) for example, includes the authority name in parentheses because Richardson initially described the species in the genus *Salmo*, under the name *Salmo clarkia*, whereas the name *Salmo marmoratus* Cuvier 1829 is currently recognized exactly as originally named by Cuvier. When the describing authority is Linnaeus, this should be abbreviated to L., e.g. *Cyprinus carpio* L. 1758. The citation for the original description of a species should not be included in the References unless additional specific details (*i.e.* more than just the species name) supplied by that publication are discussed in the manuscript. Use the online *Catalog of Fishes* as the standard authority for species nomenclature and date of description: Eschmeyer, W. N. (Ed.) *Catalog of Fishes* electronic version (5 January

2011). <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> After initial use of the species' common and scientific names, subsequent reference to the species should use the scientific name (without describing author or date) NOT the common name. The genus name should be abbreviated to a single letter (*e.g.* *C. carpio* and *O. mykiss*), except at the start of a sentence or where confusion may arise from multiple genera with the same first letter.

When listing synonyms for a species, the following style is required [based in part on Mincarone & Fernholm *Journal of Fish Biology* (2010) **77**, 779–801]:

Eptatretus cirrhatum (Forster 1801)

Homea banksii Fleming 1822: 375 (original description; type locality: South Seas; holotype: unknown)

Bdellostoma heptatrema Müller 1836: 79 (original description; type locality: South seas; holotype: unknown)

Bdellostoma forsteri Müller 1836: 80 (original description; type locality: Queen Charlotte Sound, New Zealand; holotype: unknown). Conel, 1931: 76 *Bdellostoma forsteri* var. *heptatrema*. Müller, 1838: 174 (new combination)

Bdellostoma cirrhatum. Günther, 1870: 511 (in part). Hutton, 1872: 87 (in part). Putnam, 1874: 160 (in part). Günther, 1880: 27

(Note that species names that are modifications of an existing binomial, rather than an original

description, are separated from the author name by a full stop, *Bdellostoma cirrhatum*.
 Günther, 1870: 511 (in part).
 The plural 'fish' should be used for the same species, 'fishes' for more than one species. Any specimens used for taxonomic analyses should, wherever possible, be deposited in appropriate scientific collections (*e.g.* museums and university collections, or private collections when there is good evidence that these are adequately maintained), with identifying catalogue numbers, so that they are accessible to the scientific community for subsequent examination and taxonomic revision. **Namebearing type specimens of taxa that are described in the *Journal of Fish Biology* as new to science must be deposited in recognized national or international institutions that can meet Recommendations 72F.1-5 of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 1999; available [here](#)) for institutional responsibility.** The chosen institute for deposition of name-bearing type specimens should be able to meet these responsibilities into the foreseeable future. A paratype series may be distributed among more than one recognized national or international institution at the discretion of the authors. This is encouraged for paratype series that include numerous specimens, where the paratype series can be split into two or more representative samples, comprising several specimens that are deposited at different institutions. For examples of recognized national or international institutions see earlier taxonomic publications in the *Journal of Fish Biology*, or check institutions listed in Eschmeyer's *Catalog of Fishes Online* (available [here](#)), and see Poss & Collette, *Copeia* **1995**, 48- 70, for U.S. and Canadian institutions. Institutional abbreviations used in manuscripts should follow standard code designations as given in Eschmeyer's *Catalog of Fishes Online* (see link above). Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on correct nomenclature in *Journal of Fish Biology* **78**, 1283-1290 (2011) (available [here](#))

10. **Genetic nomenclature.** The *Journal* uses the zebrafish system (see <http://zfin.org/zfinfo/nomen.html>) for genes and proteins of fish origin. Genes should be in italic lower case text and proteins in non-italic lower case text with the first letter capitalized. If the genes and proteins are of human origin, use the human nomenclature, with genes in upper case italic text and proteins in upper case non-italic text. Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on correct nomenclature in *Journal of Fish Biology* **78**, 1283-1290 (2011) (available [here](#))

11. **Sequence data.** Manuscripts containing novel amino acid sequences (*e.g.* primer sequences) will only be accepted if they carry an International Nucleotide Sequence Databases (INSD) accession number from the European Biology Laboratory (EMBL),

GenBank Data Libraries (GenBank) or DNA Data Bank of Japan (DDBJ). The *Journal of Fish Biology* strongly recommends that when authors deposit data in genetic data banks they include specimen catalogue numbers (for specimens preserved in collections), a note identifying sequences that are derived from type specimens (see 9) and collection locality data. The data base accession number must be given in the Materials and Methods section of the manuscript. For taxonomic papers that refer to sequences derived from specimens preserved in collections (see 9), authors should include a table that clearly links each sequence accession number with the specimen from which it was derived. Sequences from type specimens should also be clearly identified in this Table (*e.g. given in bold text*). A nomenclature for genetic sequences for type and some non-type specimens has been proposed by Chakrabarty *et al.* (2013) [Chakrabarty, P., Warren, M., Page, L., Baldwin, C. (2013). GenSeq: An updated nomenclature for genetic sequences and a formal ranking of sequences from type and non-type sources. *Zookeys* **346**, 29–41, doi: 10.3897/zookeys.346.5753] and may be used (but is not obligatory): sequences from holotypes are identified as genseq-1, paratypes genseq-2, those from topotypes are genseq-3, and the genetic marker(s) used are incorporated into the nomenclature (*e.g.* genseq-2 ND2). Lengthy nucleotide sequences will only be published in the text if, in the judgement of the Editor-in-Chief, these results are of general interest and importance. **Where sequences are already published, reference to the original source will suffice.**

12. **RAPD.** Data derived by RAPDs (randomly amplified polymorphic DNAs) technology are frequently not satisfactory and conclusions derived from them unreliable. Papers submitted to the *Journal* should not include data generated by this technique.

13. **Acknowledgement of copyright.** Authors should obtain permission from the copyright owner (usually this is the publisher) to use any figure, table or extended quotation from material that has previously been published. Acknowledgements, however, should cite the author: ‘Reproduced with permission from Einstein (1975)’.

14. **References.**

The list of references should be arranged alphabetically according to the surname of the first author and set out as follows:

Boisvert, C. A. (2005). The pelvic fin and girdle of *Panderichthys* and the origin of tetrapod locomotion. *Nature* **438**, 1145–1147.

Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T. & Katsu, Y. (1995). Regulation of oocyte growth and maturation in fish. In *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 30

(Pederson, R. A. & Schatten, G., eds), pp. 103–145. San Diego, CA: Academic Press.
Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*, 4th edn. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

It is important to include the article's Digital Object Identifier (DOI) (see section 24) in the reference as volume and page information is not always available for articles published online. Please note the following example:

Song, J., Mathieu, A., Soper, R. F. & Popper, A. N. (2006). Structure of the inner ear of bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Journal of Fish Biology* **68**, 1767–1781.doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01057.x

The order in the list should be:

(i). Single authors. Where more than one reference is given for a single author the publications should be listed chronologically.

(ii). Two authors. These should be arranged first alphabetically, then chronologically. For text citations, use the names of both authors and the year. Do not use *et al.* for two-author references.

(iii). Three or more authors. These should be arranged chronologically. For all text citations, use the surname of the first author only, followed by *et al.* and the date.

If more than one reference by the same author(s) published in the same year is cited, use *a, b, etc.* after the year in both text and list, *e.g.* (1963*a*). Text citations can be given in either of two ways: (a) with date in parentheses, 'as demonstrated by Jones (1956)'; (b) with names and date in parentheses, 'according to recent findings (Jones, 1956)'. **Where more than one reference is cited in the text these should be in chronological order**, *e.g.* Smith, 1975; Arnold, 1981; Jones, 1988. **Journal titles must be given in full**. Provide names and initials of **all** authors, the full title of the paper, the volume number and the page numbers.. **Authors should check that all citations in the text are in the list of references and vice versa**, and that their dates match. Journal titles, book titles and any other material within the reference list which will be italicized in print should be italicized or underlined in the manuscript.

References must be available in the public domain, *e.g.* 'do not include grey' literature.

List electronic references separately, under the heading **Electronic References**, and set out as follows:

ICES (2001). Report of the Northern Pelagic and Blue Whiting Fisheries Working Group. *ICES CM 2001/ACFM:17*. Available

at <http://www.ices.dk/reports/acfm/2001/wgnpbw/wgnpbw01.pdf> (last accessed 6 April 2010).

All articles on Wiley Online Library (<http://wileyonlinelibrary.com>) include full details on how to cite the article.

15. **Supporting Information.** As a service to authors and readers, the *Journal of Fish Biology* will host supporting information online. Supporting Information files are hosted by the Publisher in the format supplied by the author and are not copy-edited by the Publisher. **It is the responsibility of the author to supply Supporting Information in an appropriate file format and to ensure that it is accurate and correct. Authors should therefore prepare Supporting Information with the same rigour as their main paper, including adherence to journal style (e.g. formatting of references).** Supporting Information can be provided as separate files or as one combined file. Authors are discouraged from supplying very large files or files in non-standard file formats, both of which may reduce their use to the readership. Files should be prepared without line numbers or wide line spacing, and with all track-change edits accepted. Supporting Information files containing videos and animations are accepted.

16. **Ethics.** Contributors to the *Journal of Fish Biology* must read the Editorials on ethics in *Journal of Fish Biology* **68**, 1-2 (2006) (available [here](#)) and *Journal of Fish Biology* **78**, 393-394 (2011) (available [here](#)). They will be required to complete a questionnaire on submission of their paper, available for downloading [here](#).

17. **Reviews.** Reviews should be concise, critical and creative. They should seek to stimulate topical debate and new research initiatives. Prospective authors are asked to submit a synopsis (two pages maximum) of their paper to an Associate Editor. The Editor-in-Chief can be consulted to advise on the appropriate Associate Editor to be approached. The synopsis should outline why the review is topical, its main points and objectives, and how it will stimulate debate and research. When the proposal has been accepted by an Associate Editor, he or she will invite the author to submit a manuscript, following the Instructions for Authors, within an agreed time limit.

18. **Brief Communications.** A Brief Communication may be concerned with any subject within the scope of the *Journal of Fish Biology* but should be **confined to a single point or issue of progress**, such as an unusual occurrence, an interesting observation, or a topical and timely finding. The manuscript must, however, have some relevance beyond the species or locality under consideration. To qualify for inclusion as a Brief Communication a paper **must be short (five printed pages maximum; c. 2500 words)**. An abstract of not more than three

sentences is required. **No subheadings or subdivisions should be included.** In other respects submitted manuscripts should comply with the instructions given above.

19. **Letters.** These must be very short (one and a half printed pages maximum; c. 750 words) and deal with single significant finding or point for discussion that needs rapid publication. Include title page, key words (note no Abstract), main text and references (maximum four) (no tables or figures).

20. **Occasional Comments.** Comments concerning recent published papers in the *Journal* may be considered by the Editor-in-Chief. The comments will be sent to the original authors to provide an opportunity for reply. Publication of the Comment and Reply will end the debate.

21. **Acceptance of papers.** Papers will normally be critically reviewed by two or more independent experts in the relevant discipline and evaluated for publication by the Editors, but the Editors may return to authors without review any manuscripts deemed to be of inadequate quality or inappropriate for the *Journal of Fish Biology*. The final decision to accept a paper will be made by the Editor-in-Chief.

22. **Copyright and Online Open.** Authors submitting a manuscript do so on the understanding that, if it is accepted for publication, the licence to publish the article, including the right to reproduce the article in all forms and media, shall be assigned exclusively to the FSBI. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. **Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.**

For authors signing the copyright transfer agreement. If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA): Creative Commons Attribution License OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

24. Proofs and offprints. Proofs are downloaded as a PDF file from a designated web site. Full details will be sent to the corresponding author by email. Therefore, a working email address must be provided. Proofs should be returned to the Managing Editor within 3 days of receipt. Free access to the final PDF offprint of the article will be available *via* author services only. Authors must therefore sign up for author services to access the article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. In addition to this electronic offprint, paper offprints may be ordered online. Full instructions for ordering paper offprints will be sent with the proofs. Any queries regarding offprints should be emailed to: offprint@cosprinters.com. Paper offprints are normally dispatched within 3 weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the publishers if offprints do not arrive; however, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to 6 weeks to arrive.

25. Early View. *Journal of Fish Biology* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final, and no changes can be made after online publication. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Early View articles lack a volume, an issue and page numbers, and cannot be cited in the traditional way. Instead they have a DOI, which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

26. Author material archive policy. Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hard copy or electronic material 2 months after publication. If the return of any submitted material is required, the Managing Editor or Production Editor must be informed as soon as possible.

27. Queries. Contact the Managing Editor at journal.fishbiology@bopenworld.com.

CAPÍTULO 4

Evolução cariotípica divergente nas tribos de Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae)

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Journal of Evolutionary Biology*

RESUMO

Hypostominae é a maior subfamília de Loricariidae. Amplamente distribuídos pelo Neotrópico, estes peixes representam um grupo problemático para a sistemática e filogenia, devido à grande variabilidade intraespecífica na morfologia e padrões de cor. Muitas espécies de Hypostominae já foram citogeneticamente analisadas, porém poucos estudos amplos incluindo dados de um grande número de espécies foram realizados. No presente trabalho é feita uma revisão dos dados existentes para esta subfamília, e três espécies de Hypostominae de três tribos distintas são analisadas para discutir a evolução cromossômica neste grupo. *Rhinelepis aspera* apresentou $2n=54$ cromossomos ($20m+26sm+8st$), enquanto *Pterygoplichthys ambrosettii* e *Megalancistrus parananus* apresentaram $2n=52$ cromossomos, com $16m+24sm+8st+4a$ e $18m+24sm+10st$, respectivamente. Os dados cariotípicos foram comparados com hipóteses filogenéticas existentes, indicando um ancestral comum hipotético com $2n=52$ cromossomos para Pterygoplichthini e Ancistrini. Eventos recorrentes na evolução cromossômica observados nas tribos são discutidos, assim como peculiaridades de *Ancistrus* e *Hypostomus*. É proposto que a alta porcentagem de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos encontrada em espécies de *Ancistrus* com $2n=52$ ou mais cromossomos tenha facilitado a ocorrência de fusões cêntricas que diminuíram o número diploide em diversas espécies do gênero.

Palavras-chave: Ancistrini; DNAr; Hypostomini; Pterygoplichthini; Rhineleptini

ABSTRACT

Hypostominae is the largest subfamily of Loricariidae. Widely distributed throughout the Neotropic, these fishes represent a problematic group for systematics and phylogeny, due to the large intraspecific variability in morphology and color patterns. Many Hypostominae species were already cytogenetically analyzed, however few broad studies including data from many species were performed. On the present paper we review the existent data for this subfamily and analyze three Hypostominae species from three different tribes to discuss chromosome evolution on this fish group. *Rhinelepis aspera* had 54 chromosomes ($20m+26sm+8st$), while *Pterygoplichthys ambrosettii* and *Megalancistrus parananus* had 52 chromosomes, with $16m+24sm+8st+4a$ and $18m+24sm+10st$, respectively. The karyological data was compared to existent phylogenetic hypotheses, indicating a hypotetic common ancestor with $2n=52$ chromosomes for Pterygoplichthini and Ancistrini. Recurrent events on chromosomal evolution observed on the tribes are discussed, as well as peculiarities of *Ancistrus* and *Hypostomus*. We propose that the high percentage of subtelocentric and acrocentric chromosomes found in *Ancistrus* species with $2n=52$ or more chromosomes facilitated the occurrence of centric fusions that decreased the diploid number in many species from this genus.

Keywords: Ancistrini; Hypostomini; Pterygoplichthini; rDNA; Rhinelepini.

Introdução

Loricariidae é a maior família de Siluriformes, com mais de 870 espécies válidas e constantes descrições de novas espécies (Reis *et al.*, 2003; Eschemeyer & Fong, 2014). Com uma ampla distribuição pelo Neotrópico, da Costa Rica ao norte da Argentina, Loricariidae é dividida em seis subfamílias: Delturinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae e Neoplecostominae (Armbruster, 2004; Reis *et al.*, 2006). Uma subfamília adicional, Otothyrinae, foi proposta por Chiachio *et al.* (2008), porém invalidada por Cramer *et al.* (2011), que considerou a elevação da tribo Otothyriini à subfamília contraditória com as análises morfológicas e resultados obtidos pelos autores.

Entre os loricariídeos, Hypostominae destaca-se como a maior subfamília em número de espécies (Armbruster, 2004). São peixes principalmente de água doce, hábitos noturnos e que habitam o fundo de rios arenosos e pedregosos. Sua sistemática é complexa devido à grande variabilidade intraespecífica na morfologia e padrões de coloração, além do elevado número de espécies ainda não descritas constantemente encontradas (Weber, 2003). Embora as relações filogenéticas entre os Hypostominae ainda não estejam completamente definidas, existindo alguns pontos de conflito, a análise mais recente e bem aceita foi realizada por Armbruster (2004), que dividiu Hypostominae em cinco tribos: Ancistrini, Corymbophanini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Rhineleporini.

Um número elevado de estudos citogenéticos já foi realizado em Hypostominae, concentrando-se em Hypostomini e Ancistrini, mais especificamente nos gêneros *Hypostomus* e *Ancistrus*. Estes gêneros atraem a atenção pela variação do número diploide em relação ao proposto como basal para Loricariidae, 54 cromossomos (Artoni & Bertollo, 2001), com números diploides de 64 a 84 cromossomos para *Hypostomus*, considerando *Squaliforma* como um gênero válido (Bueno *et al.*, 2012), e de 34 a 54 cromossomos para *Ancistrus* (de Oliveira *et al.*, 2009; Mariotto *et al.*, 2013). Análises amplas sobre a evolução dos loricariídeos, comentando a evolução de Hypostominae, foram realizadas por alguns autores, iniciando com o trabalho de Artoni & Bertollo (2001), que descreve as principais características de cada subfamília de Loricariidae e as tendências evolutivas percebidas com os dados disponíveis naquele momento. Trabalhos posteriores como os de Kavalco *et al.* (2005), Alves *et al.* (2006) utilizaram novos dados principalmente referentes ao maior número de espécies analisadas para refinar a análise. Os novos dados obtidos concordam com diversas hipóteses propostas por Artoni & Bertollo (2001), como o aumento do número diploide em

Hypostomus através de fissões, os números diploides relativamente conservados para espécies de Pterygoplichthini e a manutenção de características mais ancestrais em alguns membros de Ancistrini, com algumas complementações relatando a importância de outros rearranjos para a diversificação cromossômica das espécies e inclusão de dados e discussões sobre DNA ribossomais (Kavalco *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006; 2012a/b).

Considerando o constante aumento no número de estudos citogenéticos em peixes, este trabalho visa reunir os novos dados apresentados com as informações já existentes para Hypostominae para realizar uma análise ampla identificando possíveis tendências evolutivas para esta subfamília.

Material e Métodos

Espécies de três tribos de Hypostominae foram analisadas: *Rhinelepis aspera* (Spix & Agassiz, 1829) (Rhinelepini, três fêmeas e um macho), coletados no rio Paraná, Santa Helena - Paraná, *Pterygoplichthys ambrosettii* (Holmberg, 1893) (Pterygoplichthini, uma fêmea), coletado no rio Paraná, Guaira - Paraná e *Megalancistrus parananus* (Peters, 1881) (Ancistrini, dois machos), coletados no rio Piquiri, Nova Laranjeiras - Paraná. Exemplares foram depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia – Universidade Estadual de Maringá, Brasil (*P. ambrosettii* NUP14681 e *M. parananus* NUP14680).

Os animais foram anestesiados e sacrificados através de overdose de óleo de cravo (Griffiths, 2000). Células metafásicas foram obtidas a partir do rim e preparadas de acordo com a técnica de suspensão celular (Bertollo *et al.*, 1978). O material foi corado com Giemsa para a determinação do número diploide e montagem dos cariótipos, onde os cromossomos foram classificados em metacêntricos (*m*), submetacêntricos (*sm*), subtelocêntricos (*st*) e acrocêntricos (*a*) de acordo com Levan *et al.* (1964).

A hibridização *in situ* por fluorescência foi realizada para a localização dos sítios de DNAs ribossomais 5S e 18S (Pinkel *et al.*, 1986, com modificações sugeridas por Margarido & Moreira-Filho, 2008). As sondas de DNAr 5S e 18S foram obtidas de acordo com Martins & Galetti (1999) e Hatanaka & Galetti (2004), respectivamente. As sondas foram marcadas através de *nick translation*, com biotina-16-dUTP (DNAr 18S) e digoxigenina-11-dUTP (DNAr 5S) (Roche). A detecção e amplificação dos sinais de hibridização foram realizadas com avidina-FITC e anti-avidina biotina (Sigma) (sondas de DNAr 18S), e anti-digoxigenina

rodamina (Roche) (sondas de DNAr 5S). As lâminas foram contra-coradas com DAPI e analisadas no microscópio de epifluorescência Olympus BX 61.

A tabela formulada através da revisão bibliográfica dos dados existentes para Hypostominae (Tab. 1) considerou somente artigos publicados em periódicos. As espécies foram organizadas em ordem crescente de número diploide, e em ordem alfabética para espécies com o mesmo número diploide, priorizando espécies válidas. Dados provenientes de artigos separados que se referiam a uma mesma população e espécie foram mesclados, sendo que todos os artigos utilizados para cada população constam nas referências.

Resultados

Rhinelepis aspera apresentou $2n=54$ cromossomos, com $20m+26sm+8st$. Os sítios de DNAr foram localizados na região pericentromérica do braço longo do par 1. Os sítios de DNAr 18S também foram localizados no braço longo do par 1, em posição intersticial, em posição distal aos sítios de DNAr 5S (Fig. 1a e 1b)

Pterygoplichthys ambrosettii apresentou $2n=52$ cromossomos, sendo $16m+24sm+8st+4a$. Os DNAs ribossomais 5S e 18S foram localizados no mesmo par cromossômico, com o DNAr 5S na região intersticial do braço curto e o DNAr 18S na região intersticial do braço longo do par submetacêntrico 14 (Fig. 1c e 1d).

Megalancistrus parananus apresentou $2n=52$ cromossomos, sendo $18m+24sm+10st$. Os DNAs ribossomais 5S e 18S foram localizados na região pericentromérica do braço curto do par 17 e na região intersticial do braço curto do par 22, respectivamente (Fig. 1e e 1f)

Os dados da literatura indicaram a existência de números diploides de 34 a 84 cromossomos em Hypostominae, com os números mais elevados encontrados no gênero *Hypostomus* e os menores no gênero *Ancistrus*. *Hypostomus* também representa o gênero mais estudado, seguido por *Ancistrus*. Embora o número de espécies de Pterygoplichthini e Rhinelepidini analisadas seja baixo, o número total de espécies dessas tribos também não é elevado, o que faz com que uma proporção maior do total de espécies destas tribos tenha sido analisada. Existe somente uma análise de *Corymbophanes* (Alves *et al.*, 2005), porém em Alves *et al.* (2006) os autores informaram que trata-se de um exemplar de *Pareiorhina* identificado incorretamente. Segundo Roxo *et al.* (2012), *Pareiorhina* é um representante de Neoplecostominae, portanto estes dados não foram incluídos na revisão.

Discussão

Rhinelepini

Composta pelos gêneros *Pogonopoma*, *Pseudorinelepis* e *Rhinelepis* (Armbruster, 2004), com um total de seis espécies válidas segundo Ferraris (2007). Destas, duas foram citogeneticamente analisadas: *Pogonopoma wertheimeri* e *Rhinelepis aspera* (Tab. 1). O número diploide observado para ambas é de 54 cromossomos, com diferenças na fórmula cariotípica. As populações analisadas por Artoni & Bertollo (2001) apresentam uma semelhança notável entre as fórmulas cariotípicas das duas espécies analisadas (*P. wertheimeri* e *R. aspera*), com cariótipos aparentando muitas homologias, o que pode indicar que o cariótipo nesse grupo tenda a ser conservado. A existência de uma descrição para *R. aspera* com uma fórmula cariotípica distinta (Endo *et al.*, 2012), proveniente da mesma bacia e de localidades próximas, é contraditória considerando a natureza migratória desta espécie. O espaço entre os dois pontos de coleta consiste na área de inundação do rio Paraná, e não apresenta barragens e grandes obstáculos ao movimento dos peixes (Agostinho *et al.*, 2008). De fato, embora estejam classificados em categorias diferentes, os cromossomos em ambos os estudos são muito semelhantes. Assim, é provável que os cariótipos diferentes descritos para esta espécie sejam um resultado de percepções diferentes dos pesquisadores sobre a morfologia dos cromossomos. A população analisada no presente estudo apresentou o mesmo número diploide e estrutura cromossômica que os estudos anteriores. De forma geral, os cariótipos de muitos Hypostominae são semelhantes (Fig. 3). Os principais grupos diferentes são *Ancistrus* e *Hypostomus*, enquanto outros gêneros apresentam cariótipos mais conservados. Enquanto a maior parte dos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos é muito semelhante, dificultando a identificação de pares específicos através de coloração por Giemsa, existem dois pares meta-submetacêntricos que são consideravelmente maiores que os outros cromossomos e facilmente identificáveis. Estes pares, além de dois pares subtelocêntricos relativamente grandes, parecem estar frequentemente presentes nos Hypostominae (Fig. 3).

Rhinelepini é o grupo irmão de um clado contendo Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini, e é considerado um dos grupos melhor diagnosticados de Loricariidae (Armbruster, 2004). O número diploide que ocorre para a tribo, 54 cromossomos, é considerado ancestral para a família (Artoni & Bertollo, 2001), sendo assim, a tribo

Rhinelepini ainda manteria esta característica plesiomórfica. O presente estudo é a primeira descrição da localização de DNAr para esta tribo. A ocorrência de sintenia, como observado para *R. aspera* já foi descrita para outros loricariídeos, como Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae e para Ancistrini, Hypostomini e Pterygoplichthini em Hypostominae (Kavalco *et al.*, 2004; Mariotto *et al.*, 2011; Ziemniczak *et al.*, 2012; Traldi *et al.*, 2013; presente estudo). É possível que a sintenia dos DNAr 5S e 18S seja uma característica primitiva para Loricariidae (Ziemniczak *et al.*, 2012), hipótese fortalecida pela presença desta característica em mais um grupo desta família, com posição consideravelmente basal dentro de Hypostominae.

Hypostomini

Armbruster (2004) considerou somente o *Hypostomus* como válido para Hypostomini, com *Aphanotorulus*, *Cheiridodus*, *Cochliodon*, *Isorineloricaria*, *Squaliforma* e *Watawata* como sinônimos, ressaltando, porém, a necessidade de dividir *Hypostomus* em subgêneros (Armbruster, 2004). Esta decisão, porém, não é consensual, e alguns autores ainda mantêm *Aphanotorulus*, *Isorineloricaria* e *Squaliforma* (Ferraris, 2007). No presente trabalho, utilizamos o gênero *Squaliforma* com a intenção de destacar que se trata de um subgrupo particular dentro de Hypostomini. *Squaliforma emarginata* apresenta características citogenéticas consideravelmente distintas de *Hypostomus*, com número diploide excepcionalmente baixo para a tribo (52 cromossomos) e RONS simples na região telomérica de um par metacêntrico. Já o gênero *Hypostomus* apresenta números diploides de 64 a 84 cromossomos, com RONS predominantemente em cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos na região terminal (Bueno *et al.*, 2012). Foi realizada uma descrição de *H. plecostomus* com $2n=54$ cromossomos por Muramoto *et al.* (1968), porém a localidade de coleta não foi identificada. Alves *et al.* (2012) analisaram uma população de *Hypostomus* prope *plecostomus* do rio Orinoco, encontrando $2n=68$ cromossomos. A discrepância entre os dados e a falta de identificação da localidade de coleta por Muramoto *et al.* (1968) indicam que o espécime trabalhado por este possivelmente tenha sido incorretamente identificado, hipótese já levantada em Bueno *et al.* (2013), o que torna $2n=64$ cromossomos o menor número diploide para *Hypostomus*.

A evolução cromossômica em *Hypostomus* já foi amplamente discutida, sendo marcada por fissões cromossômicas que aumentaram o número diploide e rearranjos

cromossômicos que geraram uma grande diversidade de fórmulas cariotípicas (Artoni *et al.* 1996, 2001; Alves *et al.*, 2005; Kavalco *et al.*, 2005; Bueno *et al.*, 2012). Além disso, já foi verificado que as espécies com números diploides menores, portanto mais próximos do valor considerado basal, 54 cromossomos segundo Artoni & Bertollo (2001), parecem estar presentes principalmente nas bacias do norte da América do Sul (Bueno *et al.*, 2013). Porém, tendo em vista o elevado número de espécies do gênero, cerca de 130 (Froese & Pauly, 2014), e a proporção relativamente baixa de espécies já analisadas, é possível que o entendimento da evolução do gênero ainda passe por muitas modificações. Outro fator que impede o desenvolvimento de hipóteses mais completas e robustas sobre a evolução cromossômica de *Hypostomus* é a inexistência de análises filogenéticas de grande proporção para o gênero, sendo que as existentes incluem um número de espécies novas ou não identificadas deixando de incluir inúmeras espécies válidas, possivelmente pela dificuldade de aquisição de espécimes, já que o gênero apresenta uma distribuição muito ampla (Montoya-Burgos, 2003).

Os estudos referentes à localização dos genes ribossomais 5S e 18S ainda são escassos para Hypostomini, porém algumas tendências já são percebidas, como a ampla variação no número de sítios de DNAr 18S e a observação constante de um sítio de DNAr 5S em posição pericentromérica de um par metacêntrico/submetacêntrico. Casos de sintenia já foram observados em algumas espécies (Traldi *et al.*, 2013).

Pterygoplichthini

Somente *Pterygoplichthys* e um novo gênero contendo as espécies do grupo *Hemiancistrus annectens* são considerados válidos para a Pterygoplichthini (Armbruster, 2004). *Pterygoplichthys* contém 16 espécies (Froese & Pauly, 2013), das quais quatro foram descritas, todas apresentando $2n=52$ cromossomos e RONS simples em cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos. Com exceção de uma população de *P. ambrosettii* proveniente do rio Miranda (MS), analisada por Alves *et al.* (2006), as populações analisadas apresentam proporções maiores de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Tab. 1). As espécies analisadas são provenientes de diversas bacias, compreendendo as bacias do Orinoco, Araguaia, Paraná e Paraguai.

A presença de $2n=52$ cromossomos em todas as espécies, diferindo de $2n=54$ cromossomos considerado ancestral para Loricariidae, sugere que 52 cromossomos seja basal para esta tribo. Correlacionando a filogenia proposta por (Armbruster, 2004) com os números

diploides encontrados para os gêneros de Hypostominae, pode-se observar que em Pterygoplichthini e Ancistrini um grande número de gêneros apresenta o número diploide de 52 cromossomos (Tab. 1, Fig. 2), com variações somente em *Ancistrus*, que serão comentadas adiante. A presença de $2n=52$ cromossomos em diversos gêneros de Ancistrini já levaram à hipótese de que este número diploide seja basal para a tribo (de Oliveira *et al.*, 2009). Porém, considerando que esta situação também é observada para Pterygoplichthini, é mais provável que a alteração cromossômica que levou à queda do número diploide de 54 para 52 cromossomos tenha ocorrido em um ancestral hipotético entre Pterygoplichthini e Ancistrini (Fig. 2). É possível que esta alteração tenha ocorrido ainda antes, em um ancestral comum de Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini, considerando que $2n=52$ cromossomos já é observado em *S. emarginata* e este apresenta um cariótipo relativamente semelhante ao de alguns Pterygoplichthini.

O único dado sobre a localização de sítios ribossomais através de FISH em Pterygoplichthini refere-se a *P. multiradiatus*, onde a hibridização *in situ* com sondas de DNAr 18S confirma a existência de um único par portador destas sequências. O presente trabalho apresenta um resultado semelhante para *P. ambrosettii*, com a hibridização *in situ* confirmando os resultados obtidos pela impregnação por prata. Em relação ao DNAr 5S, sua única localização em Pterygoplichthini ocorre no presente estudo, demonstrando a ocorrência de sintenia, com os sítios de DNAr 5S localizados no mesmo par cromossômico que o DNAr 18S, porém em braços diferentes.

Ancistrini

Junto com Hypostomini, Ancistrini está entre as tribos com maior diversidade cromossômica em Hypostominae. Ao contrário de Hypostomini, porém, os números diploides em Ancistrini variam de 34 a 54 cromossomos, com a redução do número diploide. Esta variação encontra-se somente em *Ancistrus*, sendo que os outros gêneros analisados apresentam $2n=52$ cromossomos. A presença de 52 cromossomos em diversas espécies de Ancistrini já foi notada por alguns autores, como Artoni & Bertollo (2001), Alves *et al.* (2003) e de Oliveira *et al.* (2009), culminando com a sugestão do último de que $2n=52$ cromossomos represente condição basal para Ancistrini. A revisão apresentada no presente estudo identificou $2n=52$ cromossomos para os seguintes gêneros de Ancistrini: *Ancistrus*, *Baryancistrus*, *Megalancistrus*, *Hemiancistrus*, *Hypancistrus*, *Panaque*, *Peckoltia* e

Scobinancistrus, que é considerado sinônimo de *Panaque* por Armbruster (2004), porém válido para Ferraris (2007). Alguns autores buscaram a presença de sequências teloméricas intersticiais em algumas espécies com $2n=52$ cromossomos, porém não encontraram marcações, indicando a perda dessas sequências caso tenha ocorrido fusão entre cromossomos (de Souza *et al.*, 2004; Ocalewicz, 2012; Cardoso *et al.*, 2013).

Até o presente momento somente espécies de *Ancistrus* apresentam números diploides diferentes de 52 cromossomos, com a evolução do gênero sendo associada à tendência de diminuição do número diploide através de fusões cêntricas (Alves *et al.*, 2003), com outros rearranjos originando variação nas fórmulas cromossômicas (de Oliveira *et al.*, 2009). De Oliveira (2009) destaca a ocorrência de inversões pericêntricas e translocações como uma possível explicação para a predominância de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos em espécies de *Ancistrus* que mantêm $2n=52$ cromossomos. Os gêneros de Ancistrini com espécies com $2n=52$ cromossomos em geral mantêm uma proporção baixa de cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos, que representam de 7,59% da totalidade de cromossomos em *B. aff. niveatus* a 38,46% em *Peckoltia* sp. 2. Já as espécies de *Ancistrus* com o mesmo número diploide apresentam de 38,46% em *Ancistrus* n. sp. 2 a 53,85% em *Ancistrus* sp. "Barcelos", *Ancistrus* sp. "Dimona", *Ancistrus* sp. "Piagaçu" e *Ancistrus* sp. 4, chegando a até 59,26% em espécies com $2n=54$ cromossomos (Tab. 2). Esta diferença nas proporções de tipos cromossômicos denota a evolução cromossômica distinta de *Ancistrus* frente a outros Ancistrini. É possível que o aumento no número de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos em *Ancistrus* tenha facilitado a ocorrência posterior de fusões cromossômicas que diminuiriam o número diploide em algumas espécies.

Análises filogenéticas existentes podem ser usadas para clarificar a evolução cromossômica em grupos complexos. Embora não existam análises filogenéticas amplas em *Ancistrus*, existem duas análises realizadas por Montoya-Burgos *et al.* (1997; 1998) que incluem cinco espécies de *Ancistrus*: *A. cirrhosus*, *A. multispinis*, *A. dolichopterus*, *A. pirareta* e *A. raununculus*. Destes, somente *A. multispinis* e *A. raununculus* foram citogeneticamente analisados, além de três populações de *A. aff. cirrhosus* com $2n=50$ cromossomos descritas por Borin *et al.* (2010). Porém, *A. multispinis* e *A. cirrhosus* estão filogeneticamente em uma posição mais derivada, enquanto *A. raununculus* está em posição mais basal, o que deixa espécies com $2n=50$ e $2n=52$ cromossomos em uma posição derivada e uma espécie com $2n=48$ cromossomos em uma posição mais basal, o oposto do esperado para o gênero (Fig. 4). Além disso, existe uma variação considerável entre cariótipos de espécies descritas com $2n=52$ cromossomos, nenhum dos quais é realmente semelhante aos

outros gêneros de Hypostominae (Fig. 3). Já que o número de espécies analisadas tanto citogeneticamente quanto filogeneticamente é pequeno, não é possível definir se um número diploide mais baixo pode ser basal para ramos particulares do gênero ou se consiste em uma apomorfia de algumas espécies.

A maior parte das espécies de Ancistrini analisadas quanto à localização do DNAr até o momento pertence a *Ancistrus*, sendo duas espécies de *Hypancistrus* analisadas por Silva *et al.* (2014) e *Megalancistrus parananus* as únicas exceções. Enquanto o DNAr 18S é encontrado em somente um par cromossômico em todas espécies analisadas menos *Hypancistrus* cf. *debilitera* que pode apresentar um cromossomo adicional com sítios de DNAr 18S, o DNAr 5S varia em número e posição em *Ancistrus*, sendo encontrado em dois pares cromossômicos em *Hypancistrus* (Mariotto *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014). De forma geral, a tribo parece manter um único par cromossômico com sítios de DNAr 18S, o que é considerado primitivo para Loricariidae (Artoni & Bertollo, 2001), enquanto o número e distribuição de sítios de DNAr varia entre os gêneros analisados.

Conclusões

A partir da análise do conjunto de dados disponíveis sobre a citogenética de Hypostominae foi possível verificar características de cada tribo e de gêneros com evolução cariotípica peculiar, com exceção de Corymbophanini que ainda não foi analisada. Rhinelepini apresenta o número diploide de 54 cromossomos, considerado basal para Loricariidae, e RONS na região terminal de um par metacêntrico em todas as espécies, com uma espécie apresentando sítios adicionais em um par subtelocêntrico.

Em Hypostomini destaca-se *S. emarginata*, com 52 cromossomos e o gênero *Hypostomus*, com números diploides de 64 a 84 cromossomos, sendo o aumento no número de cromossomos provavelmente causado por fissões (Artoni & Bertollo, 2001). Outros rearranjos, como inversões pericêntricas, causariam diversificação de fórmulas cariotípicas (Bueno *et al.*, 2012). Todas as espécies de Pterygoplichthini apresentam $2n=52$ cromossomos, e a maior parte das populações analisadas apresenta predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. O número diploide de 52 cromossomos também é verificado em todos os gêneros de Ancistrini analisados até o momento, sendo provável que uma fusão ocorrida em um ancestral com 54 cromossomos gerou um ancestral comum com 52 cromossomos para Pterygoplichthini e Ancistrini. Esta fusão pode ter ocorrido ainda em

um ancestral comum entre Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini. Finalmente, em Ancistrini podem ser observados dois padrões evolutivos distintos. Na maior parte dos gêneros analisados ocorre o número diploide de 52 cromossomos com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Estes gêneros provavelmente apresentam uma estrutura cariotípica mais conservada do que o observado em *Ancistrus*, onde existe a tendência de diminuição do número diploide e proporções relativamente altas de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos em espécies com números diploides próximos de 52 cromossomos. A predominância destes tipos de cromossomos pode ter facilitado a ocorrência posterior de fusões cêntricas que diminuiram o número diploide em algumas espécies. Porém, mesmo espécies com $2n=52$ cromossomos não apresentam cariótipos semelhantes aos das outras tribos, e a filogenia existente para este gênero indica que subgrupos dentro de *Ancistrus* podem compartilhar um ancestral comum com número diploide baixo. A presente análise destaca que diversos grupos em Hypostominae aparentam ser relativamente conservados, enquanto *Hypostomus* e *Ancistrus* detêm a maior diversidade da subfamília, demonstrando a importância de correlações entre análises filogenéticas e dados citogenéticos para o entendimento da evolução cromossômica deste grupo.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização para a captura dos peixes. Os autores agradecem Ângelo e Estanislau Przybitowicz, à Unioeste e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) pelo suporte logístico. Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências

- Agostinho, A.A., Pelicice, F.M. & Gomes, L.C. 2008. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Braz. J. Biol.* **68**: 1119–1132.
- Alves, A.L., Oliveira, C. & Foresti, F. 2003. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia* **56**: 57–63.
- Alves, A.L., Oliveira, C. & Foresti, F. 2005. Comparative cytogenetic analysis of eleven 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 X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica* **128**: 1–9.
- Alves, A.L., Borba, R.S., Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A. & Foresti, F. 2012a. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comp. Cytogenet.* **6**: 443–452.
- Alves, A.L., Borba, R.S., Pozzobon, A.P.B., Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A. *et al.* (2012b) Localization of 18S ribosomal genes in suckermouth armoured catfishes Loricariidae (Teleostei, Siluriformes) with the discussion on the Ag-NOR evolution. *Comp. Cytogenet.* **6**: 315–321.
- Armbruster, J.W. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool. J. Linn. Soc.* **141**: 1–80.

- Artoni, R.F. & Bertollo, L.A.C. 1996. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* **49**: 81–90.
- Artoni, R.F. & Bertollo, L.A.C. 2001. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* **134**: 201–210.
- Artoni, R.F., Molina, W.F., Bertollo, L.A.C. & Galleti Jr, P.M. 1999. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genet. Mol. Biol.* **22**: 39–44.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz. J. Genet.* **1**: 103–120.
- Bueno, V., Zawadzki, C.H. & Margarido, V.P. 2012. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Rev. Fish Biol. Fisher.* **22**: 241–250.
- Bueno, V., Venere, P.C., Zawadzki, C.H. & Margarido V.P. 2013. Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* **23**: 103–112.
- Cardoso, A.L., Sales, K.A.H., Namagashi, C.Y., Pieckzarka, J.C. & Noronha, R.C.R. 2013. Comparative cytogenetics of two species of genus *Scobinancistrus* (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) from the Xingu River, Brazil. *Comp. Cytogenet.* **7**: 43–51.
- 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**: 583–591.
- Chiachio, M.C., Oliveira, C. & Montoya-Burgos, J.I. 2008. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**: 606–617.

- Cramer, C.A., Bonatto, S.L. & Reis, R.E. 2011. Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **59**: 43–52.
- Endo, K.S., Martinez, E.R.M., Zawadzki, C.H., Paiva, L.R.S. & Júlio Jr, H.F. 2012. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. *Acta Scientiarum* **34**: 181–189.
- Eschmeyer, W.N. & Fong, J.D. 2014. Species by family/subfamily. See <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>
- Ferraris, C.J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes) and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* **1418**: 1–628.
- Froese, R. & Pauly, D. 2014. Fishbase. World Wide Web electronic publication. See <http://www.fishbase.org>
- Griffiths, S.P. 2000. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J. Fish. Biol.* **57**: 1453–1464.
- Hatanaka, T. & Galetti Jr., P.M. 2004. Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* **122**: 239–244.
- Kavalco, K.F., Pazza, R., Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. 2004. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenet. Genome Res.* **106**: 107–110.
- Kavalco, K.F., Pazza, R., Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* **94**: 180–186.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**: 201–220.

- Margarido, V.P. & Moreira-Filho, O. 2008. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Osteariophysi, Heptapteridae). *Genet. Mol. Biol.* **31**: 235–238.
- Mariotto, S. & Miyazawa, C.S. 2006. *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of sexual chromosomes of type XX/XY, in the pantanal basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia* **59**: 299–304.
- Mariotto, S., Artoni, R.F. & Miyazawa, C.S. 2004. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia* **57**: 327–331.
- Mariotto, S., Centofante, L., Vicari, M.R., Artoni, R.F. & Moreira-filho O. 2011. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comp. Cytogenet.* **5**: 289–300.
- Mariotto, S., Centofante, L. & Moreira-Filho, O. 2013. Diversity and chromosomal evolution in the genus *Ancistrus* Knew, 1854 (Loricariidae: Ancistrini) from three hydrographis basins of Mato Grosso State, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* **11**: 125–131.
- Martins, C. & Galetti Jr., P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chrom. Res.* **7**: 363–367.
- Montoya-Burgos, J.I., Muller, S., Weber, C. & Pawlowski, J. 1997. Phylogenetic relationships between Hypostominae and Ancistrinae (Siluroidei: Loricariidae): first results from mitochondrial 12S and 16S rRNA gene sequences. *Rev. Suisse Zool.* **104**: 185–198.
- Montoya-Burgos, J.I., Muller, S., Weber, C. & Pawlowski, J. 1998. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena, eds), pp. 363–374. Edipucrs, Porto Alegre.

- Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol. Ecol.* **12**: 1855–1857.
- Muramoto, J.I., Ohno, S. & Atkin, N.B. 1968. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. *Chromosoma* **24**: 59–66.
- Ocalewicz, K. 2012. Genomic Distribution of Telomeric DNA Sequences - What Do We Learn from Fish About Telomere Evolution?, In: *Reviews on Selected Topics of Telomere Biology* (L. Bibo, ed), pp. 271–294. InTech, Croatia.
- 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. *Neotrop. Ichthyol.* **4**: 93–97.
- Oliveira, R.R., Feldberg, E., Anjos, M.B. & Zuanon, J. 2007. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotrop. Ichthyol.* **5**: 301–306.
- Oliveira, R.R., Feldberg, E., Anjos, M.B. & Zuanon, J. 2008. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica* **134**: 243–249.
- Oliveira, R.R., Feldberg, E., Anjos, M.B. & Zuanon, J. 2009. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *J. Fish. Biol.* **75**: 2209–2225.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 2934–2938.
- Reis, R.E., Kullander, S.O. & Ferraris, C.J. 2003. *Checklist of the freshwater fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre.

- Reis, R.E., Pereira, E.H.L. & Armbruster, J.W. 2006. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zool. J. Linn. Soc.* **147**: 277–299.
- Roxo, F.F., Zawadzki, C.H., Alexandrou, M.A., Silva, G.J.C., Chiachio, M.C., Foresti, F. *et al.* 2012. Evolutionary and biogeographic history of the subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Ecol. Evol.* **2**: 2438–2449.
- Silva, M., Ribeiro, E. D., Matoso, D. A., Sousa, L. M., Hrbek, T., Py-Daniel, L. R. *et al.* 2014. Chromosomal polymorphism in two species of *Hypancistrus* (Siluriformes: Loricariidae): an integrative approach for understanding their biodiversity. *Genetica*, doi: 10.1007/s10709-014-9760-y.
- Souza, A.C.P., Nascimento, A.L., Carvalho Jr, J.R., Barros, R.M.S., Feldberg, E., Namagashi, C.Y., *et al.* 2004. Karyotypic analysis of *Baryancistrus* aff. *niveatus* (Ancistrinae, Loricariidae) by c-banding, Ag-NOR, CMA₃, DAPI and FISH. *Caryologia* **57**: 219–223.
- Souza, A.C.P., Namagashi, C.Y., Milhomem, S.S.R., Feldberg, E. & Pieckzarka, J.C. 2009. Cytogenetic analysis in catfish species of the genus *Peckoltia* Miranda Ribeiro, 1912 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). *Comp. Cytogenet.* **3**: 103–109.
- Traldi, J.B., Blanco, D.R., Vicari, M.R., Martinez, J.F., Lui, R.L., Barros, A.V. *et al.* 2013. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. *Genet. Mol. Res.* **12**: 463–471.
- Weber, C. 2003. Hypostominae. In: *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (R. E. Reis, S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr., eds), pp. 351–372. Edipucrs, Porto Alegre.
- Ziemniczak, K., Barros, A.V., Rosa, K.O., Nogaroto, V., Almeida, M.C., Cestari, M.M. *et al.* 2012. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): Emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Ital. J. Zool.* **79**: 492–501.

Tabela 1 Relação dos dados citogenéticos existentes para Hypostominae, organizados por tribo e em ordem crescente de número diploide.

Espécie	2n	Fórmula cromossômica	DNAr 18S	DNAr 5S	Sistema sexual	Localidade	Referência
Rhinelepini							
<i>Pogonopoma wertheimeri</i>	54	20m+30sm+4st-a	Múltiplas*; 1m;1st-a	-	-	Rio Mucuí	Artoni & Bertollo (2001)
<i>Rhinelepis aspera</i>	54	20m+26sm+8st-a	Simples*; 1m	-	-	Rio Paraná	Artoni & Bertollo (2001)
<i>Rhinelepis aspera</i>	54	24m+18sm+12st	Simples*; 1m	-	-	Rio Paraná	Endo <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhinelepis aspera</i>	54	20m+26sm+8st	Simples*; 1m	1m	-	Rio Paraná	Presente estudo
Hypostomini							
<i>Squaliforma emarginata</i>	52	16m+30sm+6st	-	-	-	Rio Araguaia	Artoni & Bertollo (2001)
Pterygoplichthini							
<i>Glyptoperichthys gibbiceps</i>	52	20m+24sm+8st	Simples*; 1sm	-	-	Rio Orinoco	Alves <i>et al.</i> (2006)
<i>Liposarcus anisitsi</i>	52	16m+24sm+8st+4a	Simples*; 1sm	-	-	Rio Preto	Artoni <i>et al.</i> (1999)
<i>Liposarcus anisitsi</i>	52	28m+12sm+8st+4a	Simples*;1sm	-	-	Rio Tietê	Alves <i>et al.</i> (2006)
<i>Liposarcus anisitsi</i>	52	8m+14sm+14st+16a	Simples*;1sm	-	-	Rio Miranda	Alves <i>et al.</i> (2006)
<i>Pterygoplichthys ambrosettii</i>	52	16m+24sm+8st+4a	Simples, 1sm	-	-	Rio Paraná	Presente estudo
<i>Liposarcus multiradiatus</i>	52	22m+18sm+12st	Simples; 1m	-	-	Rio Orinoco	Alves <i>et al.</i> (2006; 2012b)
<i>Pterygoplichthys joselimaianus</i>	52	28m+16sm+8st-a	Simples*; 1m	-	-	Lagoa Quatro Bocas	Oliveira <i>et al.</i> (2006)
Ancistrini							
<i>Ancistrus cuiabae</i>	34	20m+8sm+6st	Simples; 1m	3m	-	Baía do Arrombado	Mariotto <i>et al.</i> (2011)
<i>Ancistrus</i> sp. Purus	34	20m+12sm+2st 21m+11sm+2st	Simples*; 1m	-	XX/XY	Rio Purus	Oliveira <i>et al.</i> (2009)
<i>Ancistrus</i> n.sp.1	38	30m-sm+8st	Simples*; 1m	-	-	Rio São Francisco	Alves <i>et al.</i> (2003)
<i>Ancistrus</i> sp.1 "Balbina"	38	26m+10sm+2st	Simples*;1m	-	XX/XY ₁ Y ₂	Córrego Barretinho	Oliveira <i>et al.</i> (2008)
	39	27m+10sm+2st					

Espécie	2n	Fórmula cromossômica	DNAr 18S	DNAr 5S	Sistema sexual	Localidade	Referência
<i>Ancistrus</i> sp. Trombetas	38	22m+8sm+5st+3a	Simples*; 1m	-	?	Rio Trombetas	Oliveira <i>et al.</i> (2009)
<i>Ancistrus</i> n sp. 1	40	34m+6sm	Simples*; 1sm	-	XX/X0	Rio Vermelho	Alves <i>et al.</i> (2006)
	39	33m+6sm					
<i>Ancistrus</i> sp.13	40	26m+10sm+4st / 30m+6sm+4st	Simples; 1sm	1m; 1sm	-	Córrego Salgadinho	Mariotto <i>et al.</i> (2011; 2013)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	42	24m+10sm+8st	Simples*; 1sm	-	-	Rio Coxipó	Mariotto & Miyazawa (2006)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	42	24m+10sm+8st	Simples; 1sm	1m; 2sm	XX/XY	Córrego Pari	Mariotto & Miyazawa (2006); Mariotto <i>et al.</i> (2011)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	42	24m+10sm+8st	Simples; 1sm	1m; 2sm	XX/XY	Córrego Flechas	
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	42	24m+10sm+8st	Simples; 1sm	1m; 2sm	XX/XY	Córrego Fundo	
<i>Ancistrus</i> sp. Vermelho	42	26m+6sm+4st+6a	Simples*; 1a	-	-	Rio Demeni	Oliveira <i>et al.</i> (2009)
<i>Ancistrus</i> sp.8	44	18m+10sm+8st+8a	Simples; 1sm	1m; 2sm	ZZ/ZW	Rio Curupira	Mariotto <i>et al.</i> (2011)
<i>Ancistrus</i> cf. <i>dubius</i>	44	18m+10sm+16st-a	Simples*; 1sm	-	ZZ/ZW	Córregos da Serra das Araras	Mariotto <i>et al.</i> (2004)
		18m+12sm+6st+10a					
<i>Ancistrus</i> sp. Macoari	46	18m+11sm+6st+11a	Simples*; 1a	-	XX/XY	Rio Branco	Oliveira <i>et al.</i> (2009)
		20m+8sm+6st+14a					
<i>Ancistrus ranunculus</i>	48	19m+9sm+6st+14a	Simples*; 1st	-	ZZ/ZW	Rio Xingu	Oliveira <i>et al.</i> (2007)
		18m+10sm+8st+14a					
<i>Ancistrus</i> sp.6	50	18m+10sm+8st+14a	Simples; 1a	1a	-	Rio Matrixã	Mariotto <i>et al.</i> (2011; 2013)
<i>Ancistrus tombador</i>	50	14m+12sm+8st+16a	Simples*; 1a	-	-	Rio Preto	Mariotto <i>et al.</i> (2013)
<i>Ancistrus multispinnis</i>	52	28m-sm+24st-a	Simples*; 1st	-	-	Rio Itapocu	Alves <i>et al.</i> (2003)
<i>Ancistrus</i> n.sp.2	52	32m-sm+20st-a	Simples*; 1st	-	-	Rio Betari	Alves <i>et al.</i> (2003)
		12m+12sm+4st+24a					
<i>Ancistrus</i> sp. 2 "Barcelos"	52	11m+12sm+4st+25a	Simples*; 1a	-	Z ₁ Z ₁ Z ₂ Z ₂ / Z ₁ Z ₂ W ₁ W ₂	Rio Demeni	Oliveira <i>et al.</i> (2008)
		16m+8sm+2st+26a					
<i>Ancistrus</i> sp. Dimona	52	16m+8sm+2st+26a	Simples*; 1st	-	-	Rio Dimona	Oliveira <i>et al.</i> (2009)
<i>Ancistrus</i> sp. Piagaçu	52	16m+8sm+2st+26a	Simples*; 1a	-	ZZ/ZW	Rio Purus	Oliveira <i>et al.</i> (2007)
		16m+9sm+2st+25a					
<i>Ancistrus</i> n sp. 2	52	10m+16sm+12st+14a	Simples*; 1st	-	-	Rio Garuva	Alves <i>et al.</i> (2006)
<i>Ancistrus</i> sp.4	52	16m+8sm+6st+22a	Simples; 1a	3a	-	Rio Sepotuba	Mariotto <i>et al.</i> (2011; 2013)

Espécie	2n	Fórmula cromossômica	DNAr 18S	DNAr 5S	Sistema sexual	Localidade	Referência
<i>Baryancistrus</i> aff. <i>niveatus</i>	52	16m+32m+4st	Simples*; 1m	-	-	Rio Xingu	Souza <i>et al.</i> (2004)
<i>Hemiancistrus spilomma</i>	52	24m+22sm+6st 25m+21sm+6st	Múltiplas*; 2m; 1sm	-	ZZ/ZW	Rio Araguaia	Oliveira <i>et al.</i> (2006)
<i>Hemiancistrus spinosissimus</i>	52	26m+22sm+4st	Simples*; 1sm	-	-	Rio Araguaia	Oliveira <i>et al.</i> (2006)
<i>Hemiancistrus</i> sp.	52	20m+20sm+12st-a	Simples*; 1sm	-	-	Rio Araguaia	Artoni & Bertollo (2001)
<i>Hypancistrus zebra</i>	52	38m-sm+14st-a	Simples; 1m-sm	2m-sm	-	Rio Xingu	Silva <i>et al.</i> (2014)
<i>Hypancistrus</i> cf. <i>debilitera</i>	52	34m-sm+18st-a	Varies	2m-sm	-	Rio Uatamã	Silva <i>et al.</i> (2014)
<i>Megalancistrus parananus</i>	52	18m+24sm+10st	Simples; 1st	1sm	-	Rio Piquiri	Presente estudo
<i>Panaque</i> cf. <i>nigrolineatus</i>	52	26m+20sm+6st-a	Simples*; 1a	-	-	Rio Araguaia	Artoni & Bertollo (2001)
<i>Peckoltia vittata</i>	52	36m-sm+14st+2a	Simples*; 1sm	-	-	Rio Xingu	Souza <i>et al.</i> (2009)
<i>Peckoltia</i> sp.1	52+B	44m-sm+6st+2a	Múltiplas*; 1m-sm; 1st	-	-	Rio Jari	Souza <i>et al.</i> (2009)
<i>Peckoltia</i> sp.2	52	32m-sm+18st+2a	Múltiplas*; 2st	-	-	Rio Jari	Souza <i>et al.</i> (2009)
<i>Scabinancistrus aureatus</i>	52	22m+20sm+10st	Simples; 1m	-	-	Rio Xingu	Cardoso <i>et al.</i> (2013)
<i>Scabinancistrus pariolispos</i>	52	24m+18sm+10st	Simples; 1m	-	-	Rio Xingu	Cardoso <i>et al.</i> (2013)
<i>Ancistrus claro</i>	54	14m+8sm+8st+24a	Simples; 1a	1m; 2a	-	Rio Coxipó	Mariotto <i>et al.</i> (2011; 2013)
<i>Ancistrus</i> sp.3	54	14m+8sm+8st+24a	Simples*; 1a	-	-	Córrego Pari	Mariotto <i>et al.</i> (2013)
<i>Ancistrus</i> sp.1	54	14m+8sm+8st+24a	Simples*; 1a	-	-	Córrego Pipa	Mariotto <i>et al.</i> (2013)

*Sítios identificados somente através de impregnação por prata.

Tabela 2 Porcentagem de cromossomos subtelocêntricos de acordo com o número diploide para *Ancistrus* e outros gêneros de Ancistrini (*Baryancistrus*, *Hemiancistrus*, *Hypancistrus*, *Megalancistrus*, *Panaque*, *Peckoltia* e *Scabinancistrus*).

Gênero	2n	Cromossomos <i>st-a</i> %	
		Min - Max	Média
Outros	52	7,69% - 38,46%	20,41%
	34	5,88% - 17,65%	11,76%
	38	5,26% - 21,05%	15,79%
	40	0% - 10,00%	5%
	42	19,05% - 23,81%	20%
<i>Ancistrus</i>	44	36,36%	36,36%
	46	34,78%	34,78%
	48	41,67%	41,67%
	50	44,00% - 48,00%	46%
	52	38,46% - 53,85%	50,72%
	54	59,26%	59,26%



Fig. 1 Cariótipos de *Rhinelepis aspera* (a, b) *Pterygoplichthys ambrosettii* (c, d) e *Megalancistrus parananus* (e, f) corados com Giemsa (a, c, e) e hibridizados com sondas de DNAr 5S probes (vermelho) e 18S (verde), contracorados com DAPI (b, d, f). A barra representa 5µm.

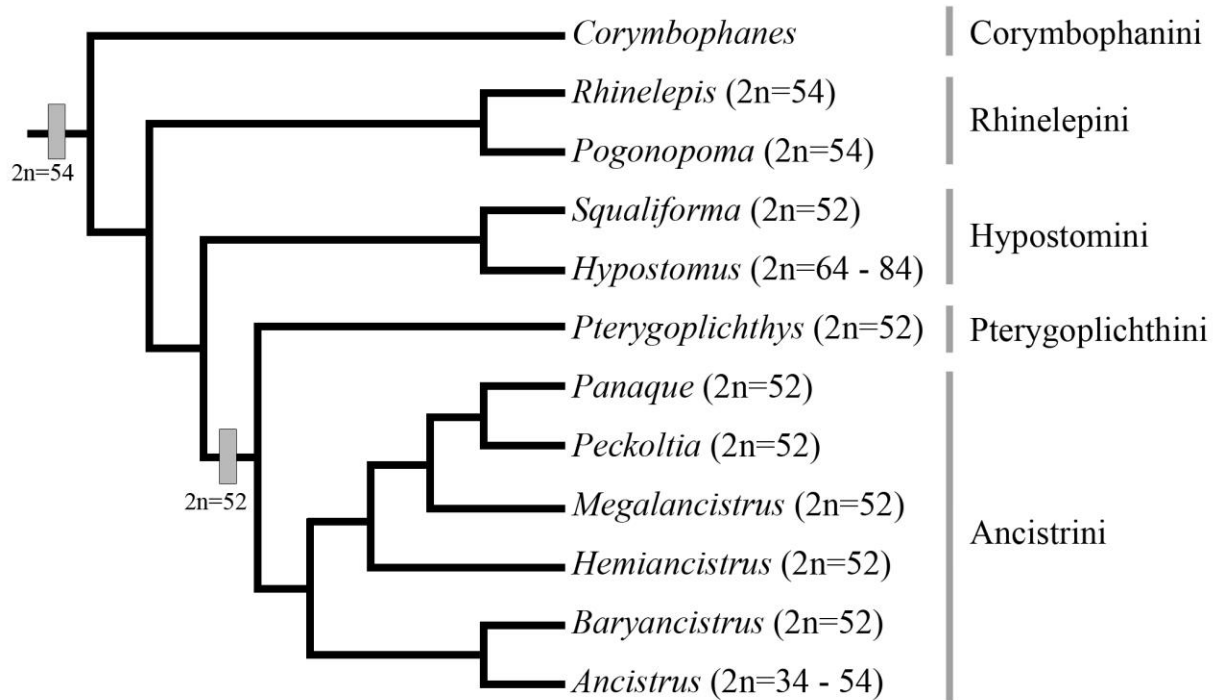


Fig. 2 Cladograma adaptado de Armbruster (2004), com a adição do gênero *Squaliforma*, indicando a variação do número diploide para cada gênero e provável número diploide ancestral para cada grupo.

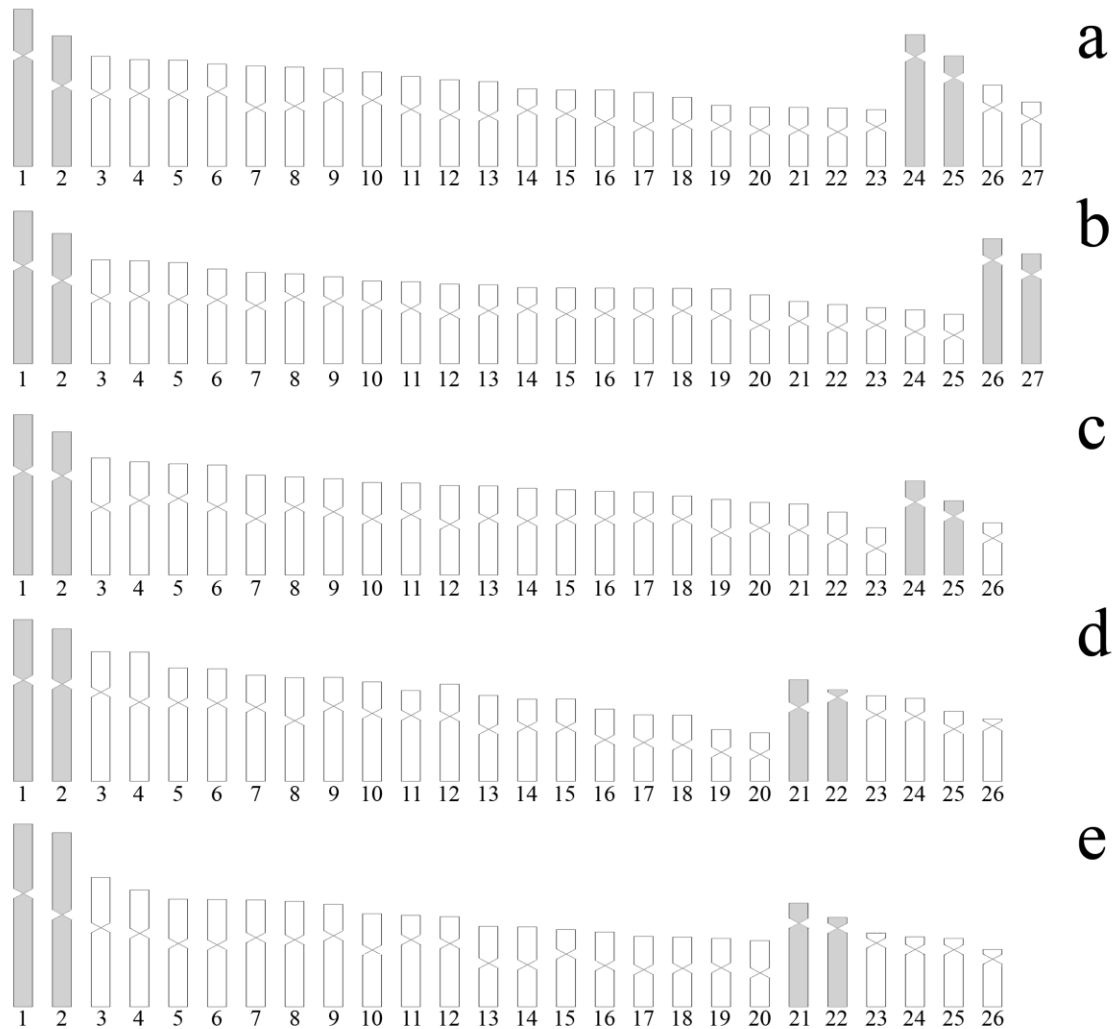


Fig. 3 Idiogramas representando cariótipos de (a) *Rhinelepis aspera*, (b) *Pogonopoma wertheimeri*, (c) *Squaliforma emarginata*, (d) *Pterygoplichthys ambrosettii* e (e) *Hemiancistrus* sp., publicados por Artoni & Bertollo (2001) (a, b, c, e) e Artoni *et al.* (1999) (d).

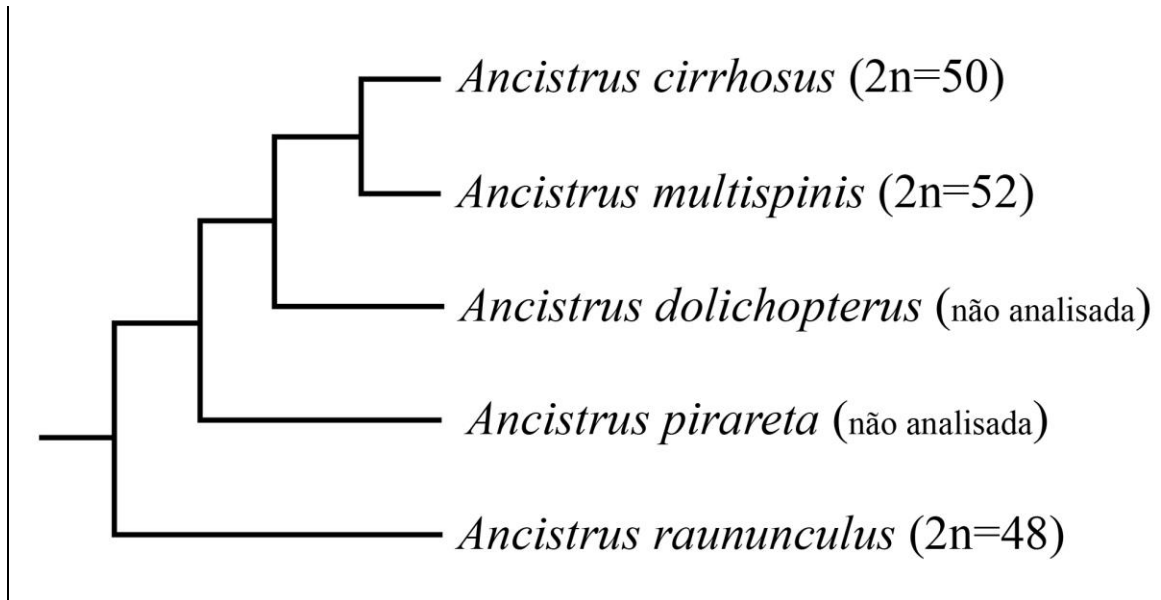


Fig. 04 Relações de *Ancistrus*, indicando os números diploides observados para as espécies analisadas. Adaptado de Montoya-Burgos *et al.* (1997; 1998).

ANEXO 2

Normas para publicação no periódico *Journal of Evolutionary Biology*

Scope: The Journal of Evolutionary Biology seeks to publish very good papers of broad interest to general evolutionary biologists. Papers that are of narrow interest, or are not original in scope are not suitable for JEB.

Publication charges: There are no page charges for the *Journal of Evolutionary Biology*. Charges apply for colour figures that are published in print (for details see 'Colour charges', below) and for open access publication of your article if you choose this (for details see 'Online Open', below).

Online submission and review: Full instructions for preparing and submitting manuscripts are provided at the submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jeb>. All submissions should be online through this site.

Manuscript categories: *Journal of Evolutionary Biology* publishes ordinary Research Articles (typically 6-10 printed pages), Short Communications (typically 3-5 pages; results and discussion may be combined), and Review Articles. Review Articles are in depth examinations of areas, rather than short commentaries or opinion pieces (see recent examples); in rare cases, typically commissioned, reviews are published with commentaries as a Target Review. Manuscripts in all categories (except commentaries on Target Reviews) to include an abstract.

Submission and handling of manuscripts: Manuscripts are allocated to the Editor-in-Chief, Reviews Editor or one of the Deciding Editors by the Managing Editor. Manuscripts are typically reviewed by two reviewers; however, manuscripts can be declined without review by an editor if their contribution to the journal's goals is deemed to be marginal or if it seems unlikely that they would fare well in the review process. Due to increasing number of submissions, these immediate rejections are becoming more frequent.

Manuscripts for the *Journal of Evolutionary Biology* are submitted online through ScholarOne at <http://mc.manuscriptcentral.com/jeb>. Submission online enables the quickest possible review and online manuscript tracking. Manuscripts can be uploaded as a Word

(.doc, .docx), Rich Text Format (.rtf) or LaTeX document. LATEX SUBMISSIONS: Author must also (1) upload a PDF file of the entire manuscript for the reviewers, and (2) compress your LaTeX files into a zip or tar file before uploading and select 'Not for review' when uploading the zip/tar file. Full upload instructions and support are available online from the submission site via the 'Get Help Now' button. You can also email for online Submission support.

All submitted manuscripts must be accompanied by a covering letter stating that the enclosed work is not under consideration for publication in another journal or book; that its submission for publication has been approved by all relevant authors and institutions; and that all persons entitled to authorship have been so named. Submitting authors should also assert that all authors have seen and agreed to the submitted version of the manuscript. The covering letter should give the word count of the full text, excluding abstract, references, tables and figure legends. Authors should always complete the preferred reviewers section when submitting manuscripts. Please identify up to four members of the Editorial Board as potential reviewers. You are welcome to specify non-Board reviewers as well, particularly if they are specialists in your subject area.

In order to expedite production, authors are required to submit their revised manuscripts online. It is in the interests both of the authors and of the journal that amended manuscripts are returned promptly. A revised paper will retain its original date of receipt only if it is received within 8 weeks of the date of return to the author. Revised papers submitted after this interval will be treated as a new submission. When resubmitting your manuscript please ensure you upload your response letter with your other files, so it will form part of the PDF. All final decisions will rest with the Editorial Office and authors will receive decision letters from the Editorial Office.

Artwork will be produced from electronic files if at all possible (see below). On request, authors should provide two sets of the original figures.

Online production tracking is now available for your article through **Author Services**. This enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they do not need to contact the production editor to check on progress. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Referrals to the Open Access Journal "Ecology and Evolution": This journal works together with Wiley's Open Access Journal, Ecology and Evolution, to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors will be offered the option of having the paper, along with any related reviews, automatically transferred for consideration by the Editor of Ecology and Evolution. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. The Editor of Ecology and Evolution will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. Accepted papers can be published rapidly: typically within 15 days of acceptance. Ecology and Evolution is a Wiley Open Access journal and article publication fees apply. For more information please go to www.ecolevol.org/info.

Presentation of manuscripts: Manuscripts should be written in clear, concise, and grammatically correct English; manuscripts that are inadequately prepared will be returned to the authors. Manuscripts submitted by non-native English speakers must be thoroughly corrected by a native English speaker prior to submission. Manuscripts should be typewritten in double-spacing on one side of 297 mm x 210 mm (11 inch x 8.5 inch) white paper, with 2.5 cm (1 inch) margins on all sides. All pages should be numbered consecutively, and line numbers should be printed on each page to facilitate ease of reference for reviewers.

Length of the manuscripts: Manuscripts should not typically exceed 10 printed pages (including figures and tables). In general, allow 900 words per printed page and subtract 160 words for each figure and table.

Title page: The title page should contain the article title, full name(s) of author(s), affiliation(s), a short running title (abbreviated form of title) less than 45 characters including spaces, and the name and complete mailing address, **including telephone and fax numbers and e-mail address** of the person to whom correspondence should be sent.

Abstract page: The abstract page should contain a short summary not exceeding 250 words and include at least 4 and up to 10 keywords.

Main text The organization of the main text should be chosen to fit the work reported. All papers should begin with an introduction that describes why the work is important and end with a discussion of the significance of the results and their relation to other work. The following format is recommended for empirical studies: (1) Introduction. The introduction should summarise briefly the background and aims, and end with a very brief statement of what has been achieved by the work. (2) Materials and methods. This section should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated (in conjunction with cited references). (3) Results. The Results section should present the experiments that support the conclusions to be drawn later in the Discussion. The Results Section should conform to a high standard of rigour. Extended lines of inference, arguments or speculations should not be placed in the Results. (4) Discussion. The Discussion section should be separate from the Results section. It allows authors to propose their interpretation of the results, and to suggest what they might mean in a wider context. It should end with a clear statement of the main conclusions of the research, and a clear explanation of their importance and relevance. (5) Acknowledgments. The acknowledgments (e.g. of financial support) should be brief. (6) References. Citation to papers by up to two authors in the text should be in full, e.g. (Able & Charles, 1986). If the number of authors exceeds two, the first author plus *et al.* should be used (e.g. Frank *et al.*, 1986). When different groups of authors with the same first author and date occur, they should be cited by using a,b,c, etc. after the date (e.g., James *et al.*, 1986a,b). References should be listed in chronological order in the text, e.g. (Lowe *et al.*, 1986; Able *et al.*, 1997). At the end of the paper, references should be listed in alphabetical order. Names and initials of authors (**up to six**), year of publication, the full titles of papers, chapters and books, **the abbreviated titles of journals** (manuscripts with full journal titles will be returned to the author for revision), volumes and inclusive pagination should be provided. Do not include the doi (digital object identifier) if the journal article is already published within an issue, instead simply state the volume and page range. Do not include the total number of pages of single volume works (e.g. entire books or reports). Multi-authored works should list the first six authors followed by *et al.* Examples of reference style are given below:

Briggs, C.W. 2012. Plumage polymorphism and fitness in Swainson's hawks. *J. Evol. Biol.*, in press.

Lynch, M. 1989. The gauge of speciation: on the frequencies of modes of speciation. In: *Speciation and its Consequences* (D. Otte & J.E. Endler, eds), pp. 527–553. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Ridley, M. 1996. *Evolution*, 2nd edn. Blackwell Science, Oxford.
- Simon, C. 1992. Molecular systematics. In: *Proceedings of First International Symposium on Molecular Techniques in Taxonomy* (J.C. Avise, ed.), pp. 23–34. Denton, Texas, 4–6 November 1992. Springer, Berlin.
- Smith, D.R., Crespi, B.J. & Bookstein, F.L. 1997. Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of ploidy and hybridization. *J. Evol. Biol.* **10**: 551-574.
- Werren, J.H., Richards, S., Desjardins, C.A., Niehuis, O., Gadau, J., Colbourne, J.K. *et al.* 2010. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science* **327**: 343-348.
- Wiens, J.J., Sparreboom, M. & Arntzen, J.W. 2011. Crest evolution in newts: implications for reconstruction methods, sexual selection, phenotypic plasticity and the origin of novelties. *J. Evol. Biol.*, doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02340.x.

References to a paper 'in press' are permissible provided that it has been accepted for publication (documentary evidence of acceptance must be provided). A reference to 'unpublished work' is rarely permissible and only with consent of the editor; it should be available from the cited authors on request, and the names of all persons involved should be cited (forename initial(s) followed by surname) in parentheses as 'unpublished data'; any person cited as the source of a 'personal communication' must have approved the reference; both of these types of citation are permitted in the text only, not in the list of references. The use of 'in preparation' or 'submitted for publication' is not permitted. References to material available on the World Wide Web can be given, but only if the information is available on an official site and without charge to readers. Authors may provide electronic copies of the cited material for inclusion on the Journal of Evolutionary Biology Homepage at the discretion of the Editors. The format for citations is as follows:
Beckleheimer, J. 1994. How do you cite URLs in a bibliography?
See <http://www.nrlsscnavy.mil/bibliography.html>

An EndNote style file is available ([Click here](#)). Right-click on the link and select 'save target as'. Navigate to your EndNote styles folder and save.

We have endeavoured to make this style file as comprehensive as possible, but complex or unusual reference types and variations in reference data quality in EndNote may result in missing information or formatting problems. If you have any comments or suggestions for improvement, please contact the journal Production Editor at: jeb@wiley.com

Specifications

Tables: Tables should be cited consecutively in the text and numbered with Arabic numerals (Table 1, Table 2, etc.). Each table should be titled and typed double-spaced on a separate sheet. Units must be clearly indicated for each of the entries in the table. Footnotes to tables should be identified by the symbols *, †, ‡, §, ¶ (in that order) and placed at the bottom of the table. No vertical rules should be used.

Figures: Figures should be cited consecutively in the text (e.g. Fig. 1, Fig. 2, etc.) and should be grouped together at the end of the paper or in a separate file(s). Legends should be grouped at the end of the paper. Line figures and combination figures should preferably be submitted in **vector graphics format** (e.g. either embedded as vector graphics in a Word document or saved separately in PDF or EPS format). If this is not possible, they should be saved separately as pixel-based graphics at 600 d.p.i. at the required print size, and they should be saved in tif (not jpg) format or embedded as such in Word. Note that **vector graphics is the preferred** format for line and combination figures because figure quality can then be maximized in the online PDF publication. Photographic figures should be saved at 300 d.p.i. in tif format, or jpg format with low compression. Figures should be drawn/submitted at their smallest practicable size to fit a single column (max. width 80 mm), two-thirds page width (max. width 110 mm), or a double column (max. width 166 mm). Over-sized figures will be reduced by the Production Editor. If figures are drawn larger than reproduction size, component parts such as symbols and text must be large enough to allow for the necessary reduction. For full instructions on preparing your figures, see our [Electronic Artwork Information for Authors](#) page. See section 'Publication (colour) charges', below, for information on colour costs.

Scientific names: Provide the Latin names of each species in full, together with the authority for its name, at first mention in the main text. If there are many species, cite a flora or checklist that may be consulted for authorities instead of listing them in the text. Do not give authorities for species cited from published references. Give priority to scientific names in the text (with colloquial names in parentheses if desired).

Units and symbols: Authors are requested to use the International System of Units (SI, *Système International d'Unités*) where possible for all measurements (see *Quantities, Units and Symbols*, 2nd edn., 1975, The Royal Society, London). Note that mathematical expressions

should contain symbols, not abbreviations. If the paper contains many symbols, it is recommended that they should be defined as early in the text as possible, or within a subsection of the Materials and Methods section. In-line equations should be typed as text. The use of graphics programs and 'equation editors' should be avoided. Displayed equations will normally be re-keyed by the typesetter.

Web materials: Supporting Information can be published online at the Editors' discretion. This may include information on, for example, sampling locations, data underlying analyses or figures, additional analyses not presented in the manuscript, or relevant multimedia files (e.g. mating song audio clips). Supporting Information must be formatted and supplied by the author in a ready-to-publish form (wide line spacing and line numbering is therefore not required). Please label Supporting Information S1, S2, S3, etc., for example Appendix S1, Appendix S2, Figure S1, Movie S1. Please compose the Supporting Information section at the end of your article using shortened titles of the Supporting Information if the full titles are long (more than a short sentence). Full titles should be supplied with the Supporting Information itself and will be published online. Further guidelines for authors are available at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>.

Statistical results: In-line statistical results should be presented as the test-statistic followed by degrees of freedom as subscript(s) to the test-statistic (e.g. $F_{1,12} = 1.74, P \leq 0.001$). Depending on the details of the analyses, results reported may include parameter estimates, test-statistics, degrees of freedom significance levels and error/residual model information (e.g. error MS and d.f. in ANOVA or regression models). Since exact P -values can be useful for meta-analyses, we recommend that these are quoted even when non-significant, e.g. $t_{23} = 0.25, P = 0.34$. However, non-significant tests (i.e. $P > 0.05$) should always be interpreted as such.

Cover image: Authors who have their paper accepted for publication are encouraged to submit a photograph(s) illustrating their work (please do not submit photographs until your paper has been accepted). These should be of publishable quality, both in terms of content and image quality. They should be approximately 300 d.p.i. when sized to 15 cm height (max.) by 21.2 cm width (fixed), and if saved in jpg format a low compression setting should be used. Please crop image to these stated dimensions if possible. Resolutions below about 200 d.p.i. will generally not be of high enough quality for publication.

You can email your images to the journal Production Editor at jeb@wiley.com with a brief caption (20 to 40 words). This should include a photo credit. If photographs are not the author's, permission for use must have been obtained prior to submission. The photographer of the cover image that is chosen will be required to sign a release form.

Colour charges: Except for authors of Review Articles, there is a charge for printed colour figures, as set out in the [Colour Work Agreement Form](#). If your figure would benefit from colour (and if it is not essential for scientific interpretation), and if you have no funds to cover colour printing costs, the journal offers free colour publication online (with black-and-white publication in print), known as Colour on the Web. Note that if you require this, **interpretation of your figure must be possible even when printed in black and white** (for the print edition of the journal), otherwise a separate black-and-white version of the figure must also be prepared. If you require Colour on the Web, you should write a single figure legend to accommodate both versions of the figure, and indicate the colour requirements on the [Colour Work Agreement Form](#). As this form is a prerequisite for publication, it should be completed and returned in all instances where authors require colour in their main article (it is not required for colour figures that form part of any online Supporting Information). Once completed, please return by post to the address on page 2 of the form (fax or scan is not acceptable).

Author material archive policy: Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Proofs: Authors will be sent an e-mail alerting them that their PDF proof is available for download. Your proofs should be marked-up electronically using Acrobat's PDF annotation tools. Instructions on using the annotation tools are given at the end of the proof. Please return your corrected proofs within 3 working days of receipt. If you registered with Author Services when you submitted your paper you will receive an e-mail within 48-hours to confirm that your proof corrections have been received.

Offprints: Free access to the final PDF offprint or your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services when your paper is accepted if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits that Author Service offers (see above). Paper offprints may also be purchased and should be

ordered when you return your proof corrections by following the instructions supplied at the time.

Early View: The Journal of Evolutionary Biology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of the publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Exclusive Licence: Authors will be required to sign an exclusive licence form (ELF) for all papers accepted for publication. Signature of the ELF is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless a signed form has been received. Please note that signature of the exclusive licence form does not affect ownership of copyright in the material. (Government employees need to complete the author warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned.) After submission authors will retain the right to publish their paper in various media/circumstances (please see the form for further details). To assist authors an appropriate form will be supplied by the editorial office. Alternatively, authors may like to download a copy of the form [here](#)

Online Open: OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. The charge for OnlineOpen publication is \$3,000 (discounted to \$1,500 for papers where the first or corresponding author is a current member of the European Society for Evolutionary Biology, www.eseb.org). For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to publish their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available on our website at:

https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Free access in the Developing World: Free online access to this journal is available within institutions in the developing world through the HINARI initiative with the World Health Organization (WHO), the AGORA initiative with the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the OARE Initiative (Online Access to Research in the Environment) with the United Nations Environment Programme (UNEP).

Data sharing: The *Journal of Evolutionary Biology* requires, as a condition for publication, that data supporting the results in the paper should be archived in an appropriate public archive, such as GenBank, TreeBASE, Dryad, the Knowledge Network for Biocomplexity or other suitable long-term and stable public repositories. Data are important products of the scientific enterprise, and they should be preserved and usable for decades in the future. Authors may elect to have the data publicly available at time of publication, or, if the technology of the archive allows, may opt to embargo access to the data for a period up to a year after publication. Longer embargoes or exceptions to depositing data may be granted at the discretion of the Editor-in-Chief, especially for sensitive information such as human subject data or the location of endangered species. All accepted papers should provide accession numbers or DOI for data underlying the work that have been deposited, so that these can appear in the final accepted article.