

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RAISSA CAROLINE MAZETTO

**Marcadores citogenéticos e moleculares utilizados para
caracterização de espécies do gênero *Eigenmannia* (Pisces,
Gymnotiformes) pertencentes à bacia Paraná-Paraguai**

Maringá

2022

RAISSA CAROLINE MAZETTO

**Marcadores citogenéticos e moleculares utilizados para
caracterização de espécies do gênero *Eigenmannia* (Pisces,
Gymnotiformes) pertencentes à bacia Paraná-Paraguai**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Luiza de Brito Portela Castro.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes.

Maringá

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

M476m	<p>Mazetto, Raissa Caroline</p> <p>Marcadores citogenéticos e moleculares utilizados para caracterização de espécies do gênero <i>Eigenmannia</i> (Pisces, Gymnotiformes) pertencentes à bacia Paraná-Paraguai / Raissa Caroline Mazetto. -- Maringá, PR, 2022. 53 f.: il. color., figs., tabs.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza de Brito Portela Castro. Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2022.</p> <p>1. Citogenética. 2. DNA barcoding. 3. Peixes neotropicais. 4. DNA repetitivo. I. Castro, Ana Luiza de Brito Portela, orient. II. Fernandes, Carlos Alexandre, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 23.ed. 572.8</p>
-------	--

RAISSA CAROLINE MAZETTO

**Marcadores citogenéticos e moleculares utilizados para
caracterização de espécies do gênero *Eigenmannia* (Pisces,
Gymnotiformes) pertencentes à bacia Paraná-Paraguai**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 26/08/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Luiza de Brito Portela Castro
Universidade Estadual de Maringá

Prof.^a Dr.^a Eliane Papa Ambrósio Albuquerque
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi
Universidade Federal do Paraná

BIOGRAFIA

Raissa Caroline Mazetto, filha de Sueli Galan Mazetto e Moacir Umberto Mazetto, nasceu em 22 de maio de 1996, na cidade de Apucarana, Paraná.

Concluiu o ensino médio em 2013, no Colégio Estadual Nilo Cairo, Apucarana, Paraná.

Em 2014, ingressou no curso Tecnologia em Biotecnologia, na Universidade Estadual de Maringá, onde em março de 2017 obteve o título de Tecnóloga em Biotecnologia.

No ano de 2020, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual de Maringá.

*À Deus e minha amada família, meus maiores e
melhores orientadores na vida,
sempre!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me proporcionado a oportunidade da vida, pela saúde, coragem, foco e força para alcançar meus objetivos e pelas conquistas que ainda virão.

À CAPES, por todo o suporte financeiro para a realização dessa pesquisa.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela estrutura oferecida para a realização desta pesquisa.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular e Molecular e do Departamento de Bioquímica, grandes áreas do conhecimento, agradeço por minha formação e conhecimento adquirido, e por todos ensinamentos durante esses anos.

À professora Dr.^a Ana Luiza de Brito Portela Castro, minha orientadora, e ao professor Dr. Carlos Alexandre Fernandes, meu coorientador, pelo conhecimento passado, pela confiança, disposição, e sobretudo pela oportunidade de desenvolver este trabalho no laboratório de Citogenética de Peixes.

À professora Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira, pelo acolhimento em seu laboratório, pelo suporte e orientação na parte das análises moleculares deste trabalho.

À Laura Ivana Ramos, do laboratório da professora Alessandra, pelo suporte e auxílio nas técnicas e análise moleculares, sempre sendo muito solícita e prestativa.

Aos amigos do laboratório, entre eles, Daniela, Laís, Lígia, Pablo, Brennda, Michele, pelas conversas, risadas e excelente convivência. Em especial ao Rafael, pela paciência e ajuda na realização das técnicas. Todos vocês fizeram com que esse processo, às vezes árduo, se tornasse mais leve e divertido.

Finalmente, agradeço imensamente à minha família, a quem eu devo minha educação e meu caráter, sem eles nada seria possível.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por dois artigos científicos completos, e seguindo as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, foram redigidos de acordo com as normas da revista a que serão submetidos.

O artigo I será submetido à revista *Zebrafish*.

Artigo I

Caracterização molecular de três espécies do gênero *Eigenmannia* (Gymnotiformes, Sternopygidae) pertencentes às bacias Paraná e Paraguai

O artigo II será submetido à revista *Comparative Cytogenetics*.

Artigo II

Mapeamento cromossômico de sequências repetitivas em *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes, Sternopygidae) da bacia do Alto rio Paraná

RESUMO GERAL

Gymnotiformes compreende peixes endêmicos da região Neotropical amplamente distribuídos pela América do Sul e Central. Esta ordem caracteriza-se por apresentar peixes elétricos que emitem descargas elétricas, as quais utilizam para sua localização, reprodução e defesa. Também são conhecidos por apresentarem morfologia distinta de outros peixes Neotropicais, como corpo alongado, ausência de nadadeiras dorsal e ventral e nadadeira anal alongada, responsável pela sua locomoção. Este grupo é constituído por cinco famílias: Apterontidae, Gymnotidae, Hypopomidae, Rhamphichthyidae e Sternopygidae. Em Sternopygidae, *Eigenmannia* destaca-se como o gênero mais rico em espécies, compreendendo atualmente 30 espécies válidas, distribuídas desde a Argentina até o Panamá, sendo que sua maior diversidade de espécies está situada na bacia Amazônica. *Eigenmannia* é considerado um gênero complexo taxonomicamente devido à similaridade morfológica entre as espécies, o que dificulta a correta delimitação e classificação das mesmas por métodos taxonômicos tradicionais. Além disso, é também um grupo complexo sob o ponto de vista da citogenética, com alta variabilidade cariotípica, cujos números variam de 28 a 46 cromossomos, intra e interespecíficos, e ainda possuem entre as espécies diversos sistemas sexuais (XY, ZW, Z0 e X₁X₂Y). Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar exemplares de *Eigenmannia* coletados e previamente identificados por caracteres morfológicos como sendo *E. virescens* (n=4), *E. trilineata* (n=3) e *E. correntes* (n=4), utilizando sequências do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase I (COI), contribuindo para uma melhor caracterização genética das espécies. *E. virescens* e *E. trilineata* foram coletadas no córrego Dourado, afluente do rio Iguatemi, região de Mundo Novo, MS (bacia do Alto rio Paraná) e *E. correntes* foi coletada no córrego Baixo, região de Sonora, MS (bacia do alto rio Paraguai). Adicionalmente, foi realizada uma análise citogenética de indivíduos de *E. virescens* do córrego Dourado utilizando FISH com sondas dos microssatélites, (GATA)₈ e (CGC)₁₀ complementando informações sobre a estrutura cromossômica desta espécie. Dentre os quatro indivíduos identificados como *E. virescens*, um deles apresentou um alto valor percentual de identidade com a sequência disponível no Genbank para a espécie *E. virescens* (99,67%), enquanto que os demais revelaram porcentagens variáveis de identidade (99,83% a 100%) com a espécie *E. trilineata* do banco de dados. Essa divergência também ocorreu com indivíduos identificados morfológicamente como *E. trilineata*, dois indivíduos apresentaram percentual de identidade de 99,67% com a espécie *E. virescens*. Não há registro de sequências do gene COI referentes à *E. correntes* no banco de dados, sendo este um estudo inédito para a espécie, portanto, as sequências COI obtidas para *E. correntes* apresentaram percentuais de identidade de 94,13% e 96,51% com as espécies *E. trilineata* e *E. vicentespelaea*, respectivamente. Os resultados citogenéticos para *E. virescens* revelaram 2n=38 cromossomos e sistema sexual ZZ/ZW corroborando estudos prévios para esta espécie. Os dados de FISH com a sonda microssatélite (GATA)₈ revelou marcações ao longo de todos os cromossomos, destacando-se blocos em

posições terminais e/ou subterminais e intersticiais em alguns pares, incluindo os cromossomos sexuais. A sonda microssatélite (CGC)₁₀ apresentou uma marcação conspícua em posição terminal do braço curto no par 15, definido em estudos prévios como par nucleolar. O padrão de distribuição destes microssatélites no genoma de *E. virescens* representa uma referência para futuros estudos comparativos entre espécies e/ou populações do gênero. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o marcador molecular *COI* foi eficiente na identificação das espécies de *Eigenmannia* confirmando ainda a complexidade taxonômica do grupo, o qual requer uma taxonomia integrativa para possíveis delimitações de espécies.

Palavras-chave: citogenética, *COI*, microssatélites, cromossomo sexual, peixes elétricos.

ABSTRACT

Gymnotiformes comprises endemic fish from the Neotropical region, distributed throughout South and Central America. This is characterized by electrical systems that emit electrical discharges, which they use for their location, reproduction and defense. They are also known to have a distinct morphology from other Neotropical fish, such as elongated bodies, absence of dorsal and ventral fins and elongated anal fin, responsible for their locomotion. This group consists of five families: Apterontidae, Gymnotidae, Hypopomidae, Rhamphichthyidae and Sternopygidae. In Sternopygidae, *Eigenmannia* ranks as the most species-rich genus, currently comprising 30 specific species, distributed from Argentina to Panama, the largest of which is located in the Amazon basin. *Eigenmannia* is genus considered taxonomically complex due to the morphological similarity between the species, which makes it difficult to correctly define and classify them by traditional taxonomic methods. In addition, it is also a complex group from the cytogenetic point of view, with high karyotypic variability, whose numbers vary from 28 to 46 chromosomes, inter and intraspecific, and also have different sexual systems among the species (XY, ZW, Z0 and X₁X₂Y). Thus, the present study aimed to analyze specimens of *Eigenmannia* collected and previously identified by morphological characters (traditional taxonomy) as *E. virescens*, *E. trilineata* and *E. correntes*, using sequences from the mitochondrial gene Cytochrome c Oxidase I (COI), contributing to a better genetic characterization of the species. *E. virescens* and *E. trilineata* were collected in the Dourado stream, a tributary of the Iguatemi river, in the Mundo Novo region, MS (upper Paraná river basin) and *E. correntes* was collected in the Baixo stream, in the Sonora region, MS (upper Paraná basin Paraguay River). Additionally, a cytogenetic analysis of *E. virescens* from Córrego Dourado was performed using FISH, (GATA)₈ and (CGC)₁₀ probes complementing information about

the chromosomal structure of this species. Among the four individuals identified as *E. virescens*, one of them showed a high percentage of identity with the sequence available in Genbank for the species *E. virescens* (99.67%), while the others showed variable percentages of identity (99.83% at 100%) with the species *E. trilineata* from the database. This divergence also occurred with individuals morphologically identified as *E. trilineata*, two individuals presented a percentage of identity of 99.67% with the species *E. virescens*. There is no record of COI gene sequences referring to *E. correntes* in the database, this being an unprecedented study for the species, therefore, the COI sequences obtained for *E. correntes* showed percentages of identity from 94.13% and 96.51 % with the species *E. trilineata* and *E. vicentespelaea*, respectively. The cytogenetic results for *E. virescens* revealed $2n=38$ chromosomes and ZZ/ZW sexual system, corroborating previous studies for this species. FISH data with the microsatellite probe (GATA)₈ revealed markings along all chromosomes, being blocks at highlighted points and/or subterminal and interstitial in some pairs, including the sex chromosomes. The microsatellite probe (CGC)₁₀ showed a conspicuous labeling at the terminal position of the short arm in pair 15, defined in previous studies as a nucleolar pair. The distribution pattern of these microsatellites in the genome of *E. virescens* represents a reference for future comparative studies between species and/or populations of the genus. The results obtained in this study showed that the COI molecular marker was efficient in the identification of *Eigenmannia* species, further confirming the taxonomic complexity of the group, which requires an integrative taxonomy for possible species delimitation.

Keywords: cytogenetics, COI, electric fish, microsatellites, sexual chromosome.

SUMÁRIO

ARTIGO I

Caracterização molecular de três espécies do gênero *Eigenmannia* (Gymnotiformes, Sternopygidae) pertencentes às bacias Paraná e Paraguai

Resumo	12
Introdução	14
Materiais e Métodos	16
Resultados	17
Discussão.....	19
Conclusões.....	21
Legendas Figuras.....	22
Legendas Material Suplementar.....	22
Agradecimentos	22
Referências	23
Figuras	27
Material Suplementar	29

ARTIGO II

Mapeamento cromossômico de sequências repetitivas em *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes, Sternopygidae) da bacia do Alto rio Paraná

Resumo	35
Introdução	37
Materiais e Métodos	39
Resultados	41
Discussão.....	43
Conclusões.....	46
Agradecimentos	46
Referências	47

Lista de Figuras

Figura 1. Cariótipo de <i>Eigenmannia virescens</i> após coloração convencional de Giemsa.....	41
---	----

Figura 2. Cariótipo de <i>Eigenmannia virescens</i> após FISH usando sondas de DNA microsatélite (GATA) ₈	42
Figura 3. Cariótipo de <i>Eigenmannia virescens</i> após FISH usando sondas de DNA microsatélite (CGC) ₁₀	42

ARTIGO I

Caracterização molecular de três espécies do gênero *Eigenmannia* (Gymnotiformes, Sternopygidae) pertencentes às bacias dos rios Paraná e Paraguai

Raissa Caroline Mazetto, Laura Ivana Ramos, Alessandra Valéria de Oliveira, Luciana Andréia Borin de Carvalho, Carlos Alexandre Fernandes e Ana Luiza de Brito Portela Castro

Resumo

Eigenmannia é considerado um dos gêneros mais diversificados e complexos taxonomicamente da família Sternopygidae (Gymnotiformes), o que dificulta a compreensão das relações filogenéticas, pois sua identificação é dificultada devido a similaridade morfológica entre as espécies. Métodos moleculares como o DNA *barcoding* têm se mostrado de extrema importância para resolução de incertezas taxonômicas, contribuindo assim para a identificação de espécies. Neste estudo, analisamos três espécies de *Eigenmannia* identificadas morfológicamente como *E. virescens* (n=4), *E. trilineata* (n=3) e *E. correntes* (n=4), provenientes das bacias hidrográficas do Brasil, Paraná e Paraguai, usando o marcador mitocondrial Citocromo c Oxidase I (*COI*). Os dados moleculares confirmaram a ocorrência das espécies *E. virescens* e *E. trilineata* na bacia do alto rio Paraná e *E. correntes* na bacia do alto rio Paraguai. Assim, considerando os onze espécimes analisados, três revelaram altos valores percentuais de identidade com sequências da espécie *E. trilineata* depositadas no Genbank (99,33%, 99,93% e 100%), e dois espécimes com 99,67% de identidade com sequências da espécie *E. virescens* do banco de dados. Dentre os quatro indivíduos de *E. corrente* analisados, dois apresentaram 94,13% e 95,67% de identidades com sequências de *E. trilineata* e outros dois espécimes revelaram 96,51% e 95,67% com *E. vicentespelaea*. Uma rede de haplotipos é apresentada para melhor compreensão dos agrupamentos das espécies.

Palavras-chave: *COI*, DNA *barcoding*, peixes elétricos, região Neotropical.

Molecular characterization of three species of the genus *Eigenmannia* (Gymnotiformes, Sternopygidae) belonging to the Paraná and Paraguay river basins

Abstract

Eigenmannia is considered one of the most diverse and taxonomically complex genera of the family Sternopygidae (Gymnotiformes), which makes it difficult to understand the phylogenetic relationships, as its identification is difficult due to the morphological similarity between the species. Molecular methods such as DNA barcoding have been shown to be extremely important for resolving taxonomic uncertainties, thus contributing to the identification of species. In this study, we analyzed three *Eigenmannia* species morphologically identified as *E. virescens* (n=4), *E. trilineata* (n=3) and *E. correntes* (n=4), from the hydrographic basins of Brazil, Paraná and Paraguay, using the mitochondrial marker Cytochrome c Oxidase I (COI). Molecular data confirmed the occurrence of the species *E. virescens* and *E. trilineata* in the upper rio Paraná basin and *E. correntes* in the upper rio Paraguai basin. Thus, considering the eleven analyzed specimens, three showed high percentage values of identity with sequences of the species *E. trilineata* deposited in Genbank (99.33%, 99.93% and 100%), and two specimens with 99.67% identity with sequences of the species *E. virescens* from the database. Among the four individuals of *E. correntes* analyzed, 2 showed 94.13% and 95.67% of identities with *E. trilineata* sequences and two other specimens showed 96.51% and 95.67% with *E. vicentespelaea*. A network of haplotypes is presented for a better understanding of species groupings.

Keywords: COI, DNA barcoding, electric fish, Neotropical region.

Introdução

Gymnotiformes compreende um grupo natural de peixes elétricos, estritamente de água doce,¹ que são originários da América do Sul, e posteriormente se espalharam pela América Central. No entanto, sua maior diversidade é observada na super bacia Amazonas-Orinoco-Guianas, onde cerca de 77% dos peixes dessa ordem podem ser encontrados.²

Os peixes elétricos Neotropicais são conhecidos pela sua capacidade eletrogênica, pois produzem uma leve corrente elétrica ao redor do corpo por seu tecido especializado denominado órgão elétrico (DOE). Essa característica é fundamental para a sua comunicação com o ambiente, eletrolocalização, também sendo usada para sua reprodução e defesa.³⁻⁵ Por apresentar esse sistema de eletrolocalização e não precisar de iluminação para suas interações sociais, orientação ou alimentação, os Gymnotiformes têm hábitos noturnos, e durante o dia permanecem escondidos em locais protegidos, como buracos ou fendas.⁶ Além disso, suas características morfológicas são distintas das outras ordens de peixes neotropicais, possuem o corpo alongado, com nadadeiras dorsal e ventral ausentes, nadadeira caudal reduzida ou ausente e nadadeira anal bem alongada.⁶ Por sua extensão, a nadadeira anal é responsável pela locomoção do peixe, através de movimentos ondulatórios que fazem com que ele consiga se deslocar para frente e para trás.⁶

Gymnotiformes é composta por peixes endêmicos da região neotropical, e são classificados em cinco famílias: Apterontidae, Gymnotidae, Hypopomidae, Rhamphichthyidae e Sternopygidae.⁷⁻⁸ Em Sternopygidae, *Eigenmannia* Jordan & Evermann, 1896, destaca-se como o gênero mais rico em espécies, compreendendo atualmente 30 espécies conhecidas,⁹ e que são amplamente distribuídas pelas principais bacias hidrográficas da região Neotropical, que abrangem desde o rio de La Plata na Argentina, até o rio Tuíra situado no Panamá, no entanto, sua maior diversidade, tanto taxonômica como ecológica, é encontrada na bacia Amazônica.¹⁰⁻

11

Do ponto de vista taxonômico, estudos em *Eigenmannia* cada vez mais vem fornecendo contribuições na classificação e identificação de espécies ao passo que novas espécies desse gênero vêm sendo descritas, no entanto, ainda é considerado

complexo taxonomicamente devido à ausência de características morfológicas distintas, o que acaba dificultando a diferenciação entre uma espécie e outra, acarretando muitas vezes em uma inserção de espécies recém-descobertas e que nunca foram descritas em um grupo comum já existente.¹²⁻¹³

Para elucidar questões taxonômicas em que a identificação de espécies ainda é um tanto confusa, e também para a descoberta de espécies crípticas, métodos moleculares vêm se tornando muito eficazes, como é o caso da técnica denominada de DNA *barcoding*, proposta por Hebert,¹⁴ que consiste no sequenciamento de aproximadamente 650 pares de bases de uma região do gene mitocondrial Citocromo *c* Oxidase I (*COI*), que tem como finalidade identificar taxonomicamente e delimitar espécies com base nas diferenças presentes em suas sequências *COI*.

O DNA *barcoding* é um dos métodos moleculares que tem grande importância na identificação e compreensão evolutiva de espécies,¹⁴ assim como na resolução de questões taxonômicas ainda incertas em grupos de peixes mais complexos,¹⁵⁻¹⁶ tendo se mostrado uma ferramenta de análise muito válida, sendo evidenciada sua eficácia em diversos trabalhos.¹⁷⁻²⁴ O marcador mitocondrial *COI* é um dos marcadores mais utilizados na identificação de espécies e estudos populacionais,²⁵⁻²⁶ inclusive em espécies de peixes marinhos e de água doce tem se mostrado muito útil.²⁷⁻²⁸

Ademais, a classificação de organismos baseada unicamente pelas suas características morfológicas, pode ocasionar diversos erros em virtude da existência de espécies crípticas e complexas, com variações genotípicas e em diferentes estágios de vida.²⁹ Esses são alguns dos motivos de muitos gêneros e espécies da ordem Gymnotiformes ainda carecerem de revisões.³⁰

Em vista disso, e com base na complexidade taxonômica das espécies que estão inseridas em *Eigenmannia*, sendo que muitas delas ainda não foram descritas, analisamos o gene mitocondrial Citocromo *c* Oxidase I (*COI*) nas espécies previamente identificadas por taxonomia tradicional, *Eigenmannia correntes* Campos-da-Paz & Queiroz, 2017, *E. virescens* Valenciennes, 1836 e *E. trilineata* López & Castello, 1966, afim de caracterizá-las e identificá-las geneticamente de maneira precisa.

Materiais e Métodos

Amostras biológicas

Onze exemplares de *Eigenmannia* foram coletados e previamente identificados por caracteres morfológicos (taxonomia tradicional) como sendo *E. virescens* (n=4), *E. trilineata* (n=3) e *E. correntes* (n=4). *E. virescens* e *E. trilineata* foram capturados no córrego Dourado (23°51'04" S / 54°25'13,9" W), afluente do rio Iguatemi, região de Mundo Novo, pertencente a bacia do Alto rio Paraná, no estado do Mato Grosso do Sul. A coleta dos espécimes de *E. correntes* foi realizada no córrego de Baixo (17°42'46" S / 54°21'25" W), afluente do rio Correntes, região de Sonora, pertencente à bacia do Alto Paraguai, no estado do Mato Grosso do Sul.

As coletas foram autorizadas através do Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBIO) que concedeu as licenças de número 64619 e 74306. Os experimentos laboratoriais utilizados neste estudo foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, que aprovou os processos sob os números 023/2018 e 006/2018. O acesso ao patrimônio genético dessas espécies foi autorizado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) (código de acesso A08A671).

Extração do DNA genômico

O DNA de amostras de tecido do fígado e muscular dos espécimes foi extraído utilizando o kit de extração Promega Wizard® Genomics, seguindo as instruções do fabricante. Para a estimativa da concentração de DNA presente em cada amostra, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1.0% e a comparação com DNA de fago λ de concentração conhecida.

Amplificação do DNA

Nessa etapa a região mitocondrial *COI* foi parcialmente amplificada utilizando o par de *primers* L6448 e H7152.³¹ A PCR foi preparada em microtubos de 0,2 mL, sendo utilizado para a reação o DNA extraído (10 ng), Tris-KCl [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl]; MgCl₂ (1,5 mM); *primers* (2,5 μ M cada); dNTPs (0,1 mM cada); Taq

DNA Polymerase Platinum – Invitrogen (1 U), e Água Milli-Q para completar o volume de 25 µL de solução. A reação de amplificação para o *COI* se iniciou com um ciclo de desnaturação de 2 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30s de desnaturação (94 °C), 1min e 30s de anelamento (52 °C), 1min e 30s de extensão (72 °C) e 10 min de extensão final (72 °C). Após a amplificação, os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1% e o tamanho dos fragmentos obtidos foi estimado com base no marcador padrão Ladder 100pb. Os produtos do PCR foram purificados seguindo protocolo de Rosenthal *et al.*³² e para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit Big Dye Terminator. O sequenciamento foi realizado na ACTGene Análises Moleculares Ltda, utilizando o sequenciador automático AB-3500.

Análise de dados

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas utilizando os programas BioEdit 7 e MEGA 7, respectivamente.³³⁻³⁴ O algoritmo de alinhamento utilizado foi o software ClustalW.³⁵ O polimorfismo interpopulacional foi analisado pelo software DNA *Sequence Polymorphism* (DnaSP v6)³⁶ e as redes de haplótipos foram geradas utilizando o software PopArt.³⁷ A distância p entre os espécimes analisados foi calculada utilizando o MEGA 7. O programa MEGA 7 foi utilizado para a seleção do melhor modelo evolutivo e também para a construção da árvore gênica utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança com 1.000 reamostragens de *bootstrap*. Um total de 72 sequências da região *COI* pertencentes à *Eigenmannia*, disponíveis no *Bold Systems* foram adicionadas às análises (Material Suplementar - STab. 1). Sequências sem identificação de espécies e que comprometiam o tamanho do alinhamento final foram retiradas das análises. A sequência BSFFA651-07, referente à *Sternopygus macrurus* Bloch & Schneider, 1801 foi utilizada como grupo externo.

Resultados

Sequências parciais do gene *COI*, constituída de 641 pares de bases (pb), foram obtidas de 11 espécimes, sendo *E. virescens* (n=4), *E. trilineata* (n=3) e *E. correntes* (n=4). As sequências foram alinhadas com as sequências disponíveis no

banco de dados, editadas e cortadas, resultando em um fragmento de 559 pb. Cada sequência obtida foi analisada individualmente na ferramenta *BLASTn* e os resultados do percentual de identidade dos espécimes deste estudo com sequências do banco de dados, são apresentados na Tabela 1. Dos 4 indivíduos de *E. virescens* obtidos neste estudo, o indivíduo 194 apresentou valor expressivo de percentual de identidade com a sequência disponível no *Genbank* para a espécie *E. virescens* (99,67%, GU701791.1), os indivíduos 163, 167 e 170 revelaram porcentagens de identidade com variação de 99,83% a 100% para a espécie *E. trilineata* do banco de dados. Essa divergência também ocorre com indivíduos analisados de *E. trilineata*, as amostras 40 e 54 apresentaram percentual de identidade de 99,67% para a espécie *E. virescens* (GU701791.1). Não há registro de sequências do gene *COI* referentes à *E. correntes* no banco de dados, sendo este um estudo inédito para a espécie, portanto, os percentuais de identidade das sequências desta espécie com as sequências disponíveis no *Genbank* variaram de 94,13% a 96,51% para as espécies *E. trilineata* (MK464038.1) e *E. vicentespelaea* (KR491592.1), respectivamente.

Tabela 1 - Percentual de identidade de sequências *COI* das espécies de *Eigenmannia* utilizadas no presente estudo.

Indivíduo	Espécie	Espécie Alinhada	% de identidade	Nº de acesso
163	<i>E. virescens</i>	<i>E. trilineata</i>	99,83%	KU288902.1
167	<i>E. virescens</i>	<i>E. trilineata</i>	100,00%	KU288902.1
170	<i>E. virescens</i>	<i>E. trilineata</i>	99,33%	MK464069.1
194	<i>E. virescens</i>	<i>E. virescens</i>	99,67%	GU701791.1
12	<i>E. trilineata</i>	<i>E. trilineata</i>	99,83%	KU288900.1
40	<i>E. trilineata</i>	<i>E. virescens</i>	99,67%	GU701791.1
54	<i>E. trilineata</i>	<i>E. virescens</i>	99,67%	GU701791.1
1271	<i>E. correntes</i>	<i>E. trilineata</i>	95,67%	MK464038.1
1272	<i>E. correntes</i>	<i>E. vicentespelaea</i>	96,51%	KR491592.1
1273	<i>E. correntes</i>	<i>E. vicentespelaea</i>	95,67%	KR491592.1
1275	<i>E. correntes</i>	<i>E. trilineata</i>	94,13%	MK464038.1

Foram obtidos 53 haplótipos para as sequências analisadas, com 226 sítios polimórficos variáveis. Os índices de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) foram 0,958 e 0,09437, respectivamente. A rede de haplótipos evidencia que os haplótipos mais frequentes são H20 e H25, apresentando 5 exemplares cada, seguido

por H7 (n=4) e H21 (n=4). Dos 11 espécimes analisados neste estudo, foram obtidos 9 haplótipos (Material Suplementar - STab. 1).

Dos 4 espécimes de *E. virescens* analisados neste estudo, foram obtidos os haplótipos H39, H45, H46 e H47. O indivíduo 167 compartilhou o haplótipo H39 com *E. trilineata* (LARI031-12). Dentre os 3 indivíduos de *E. trilineata*, 40 e 54 compartilharam o haplótipo H45 com *E. virescens* 194. O exemplar 12 corresponde ao haplótipo H48. Os haplótipos H49, H50, H51 e H52, são correspondentes aos 4 indivíduos de *E. correntes* (Fig. 1).

Os valores de distância p obtidos para os haplótipos variaram de 0,2% para algumas sequências do banco de dados e do presente estudo a 18,8% entre os haplótipos H20 e H32 para o haplótipo H49. Em relação à distância genética dos haplótipos dos exemplares analisados neste estudo, os valores variaram de 0,7% a 16,8%. A menor distância refere-se aos haplótipos H47 para H48, e H50 para H51. A maior distância genética foi observada no haplótipo H45 para o haplótipo H49. Dentre os espécimes de *E. virescens* analisados, a menor distância p foi de 0,2% entre H39 e H47, e a maior distância de 11,2% do H45 para H47. Nos indivíduos de *E. trilineata*, o valor da distância genética foi 11,1% entre H45 e H48. Em *E. correntes*, a distância mais curta, com valor equivalente a 0,7%, se refere ao haplótipo H50 para o H51. O haplótipo H49 apresentou uma distância genética de 8,2% em relação ao haplótipo H52 (Material Suplementar - STab. 2).

O melhor modelo evolutivo selecionado foi Tamura-Nei (TrN) e a árvore genética obtida com o marcador *COI* revelou diferentes agrupamentos. Um deles é constituído por *E. virescens*, no entanto, *E. cf. virescens* e *E. macrops* também foram alocados neste agrupamento. Destaca-se que alguns espécimes de *E. virescens* obtidos neste estudo e no banco de dados ficaram posicionados e/ou formaram diferentes agrupamentos envolvendo outras espécies, como *E. humboldtii* e *E. limbata*. *E. correntes* constituiu um outro grupo, irmão de *E. vicentespelaea* e de um espécime de *E. trilineata*. O outro grupo formado é composto por *E. trilineata* e alguns espécimes identificados morfologicamente como *E. virescens*, incluindo os indivíduos 163 e 170 (Fig. 2).

Discussão

Apesar das várias análises filogenéticas e de diversas novas espécies que vêm sendo descritas nos últimos anos, auxiliando na delimitação de espécies já existentes,^{12,38-43} o gênero *Eigenmannia* ainda é considerado complexo.⁴⁴ O agrupamento genético observado nos indivíduos *E. virescens* 163, 167 e 170, que apresentaram similaridade com espécimes de *E. trilineata*, assim como os exemplares *E. trilineata* 40 e 54, que na árvore genética se alocaram com *E. virescens*, além do compartilhamento de haplótipos interespecíficos, corroboram uma dificuldade na taxonomia de indivíduos desse gênero.

Dentre os espécimes identificados morfologicamente como *E. correntes*, presume-se que 1271,1272 e 1273 pertençam à essa mesma espécie, pois apresentam distância genética menor que 2%. No entanto, a distância *p* do exemplar 1275 em relação aos indivíduos de seu grupo, variou de 6,5% a 8,2%, sugerindo que esse indivíduo seja representante de outra espécie (Material Suplementar - STab. 2). Segundo Campos-da-Paz e Queiroz,⁴⁵ *E. correntes* é incluída no grupo de espécies *E. trilineata* por compartilharem caracteres morfológicos semelhantes, como a presença de uma faixa lateral superior conspícua. Segundo os autores, *E. correntes* se assemelha de *E. vicentespelaea*, *E. waiwai* e *E. besouro* devido a posição subterminal da boca. Essa paridade nas características pode explicar o fato de *E. correntes* ter constituído um grupo irmão com *E. vicentespelaea* na árvore genética, porém, ainda segundo os autores, essas duas espécies diferem, como no número de dentes pré-maxilares, séries longitudinais de escamas acima da linha lateral, número total de raios da nadadeira anal, largura do corpo e largura oral maior, além de outras características.⁴⁵

Em relação aos espécimes coletados no banco de dados, alguns indivíduos classificados como *E. virescens*, apresentaram valores de distâncias superiores a 8% se comparados com outros indivíduos da mesma espécie, reforçando que esses exemplares sejam representantes de outra espécie. A sequência *E. vicentespelaea* (GBMIN94539-17) agrupou-se na árvore genética com um exemplar de *E. trilineata* (ANGBF56488-19), com uma distância menor que 1%, sugerindo que esse indivíduo de *E. trilineata* pertença à espécie *E. vicentespelaea*. Um estudo que analisou 1088 espécies de peixes utilizando sequências *COI*, constatou que pares de sequências que apresentam divergência menor que 2% possuem uma alta probabilidade de pertencerem a indivíduos de mesma espécie,¹⁷ assim como proposto por Hebert et al.¹⁴

Alguns pesquisadores questionam se o valor de divergência de 2% é válido para todas as espécies. Em uma análise com 190 espécies de peixes da região do Canadá, Hubert et al.²⁸ obtiveram valores de distância genética de 2,7% para indivíduos que pertenciam à mesma espécie. Pereira et al.¹⁸ verificaram em seu estudo que nem todas as espécies de peixes Neotropicais seguem o valor de 2% como referência limite para separação de espécies, sendo que, em alguns gêneros, esse limite pode camuflar a real diversidade de espécies existentes, corroborando a ideia de que o valor de 2% não deve ser considerado regra para todas as espécies de peixes Neotropicais.

Devido a pouca diferenciação morfológica, grande diversidade de espécies e ampla distribuição geográfica,¹⁰ *Eigenmannia* tem sua taxonomia baseada em grupos de espécies, levando-se em conta evidências moleculares e características morfológicas.^{39,46-47} Esse tipo de classificação é característica em espécies de peixes Neotropicais problemáticos e que ainda possuem poucos estudos taxonômicos.¹² Recentemente, Peixoto e Ohara¹² classificaram *Eigenmannia* em dois grupos, *Eigenmannia humboldtii* e *Eigenmannia trilineata*, a qual abrange a maior diversidade de espécies, e onde *E. trilineata*, *E. correntes* e *E. vicentespelaea* estão inseridas. Esta classificação poderia explicar a similaridade de espécimes de *E. correntes* com *E. trilineata* e *E. vicentespelaea* como encontrado neste estudo. Por outro lado, a espécie *E. virescens*, não está incluída em nenhum grupo, pois segundo os autores, ainda necessita de uma revisão taxonômica para esclarecimento de suas relações filogenéticas.

Dessa forma, os resultados desse estudo, obtidos através das análises moleculares das sequências *COI*, corroboram a complexidade dentro do gênero *Eigenmannia*, ressaltando a necessidade de uma revisão taxonômica para reformulação de algumas espécies previamente descritas, utilizando múltiplas ferramentas com base em dados morfológicos, genéticos e citogenéticos, fornecendo assim uma descrição mais assertiva na identificação e delimitação das espécies.

Conclusões

A complexidade em *Eigenmannia* e a pouca diferenciação morfológica é reforçada nos resultados observados nesse trabalho, visto que alguns indivíduos

identificados com a morfologia clássica como *E. virescens* e *E. trilineata* apresentaram incongruências nas análises moleculares. Além disso, espécimes do banco de dados apresentaram distâncias variáveis superiores a 2% para indivíduos aparentados da mesma espécie. Ademais, esse estudo trouxe pela primeira vez sequências de *COI* para uma população de *E. correntes*, o que irá corroborar de forma relevante acerca de pesquisas futuras sobre a espécie.

Legendas Figuras

Fig. 1: Rede de haplótipos de sequências de *Eigenmannia* com o marcador *COI*. Os haplótipos a seguir são referentes aos espécimes analisados neste estudo: **H39** (167), **H45** (40, 54 e 194), **H46** (170) e **H47** (163), **H48** (12), **H49** (1275), **H50** (1273), **H51** (1272) e **H52** (1271).

Fig. 2: Árvore genética construída pelo modelo Tamura-Nei (TrN) utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança com 1.000 reamostragens de *bootstrap*, a partir de sequências parciais do gene *COI* de *Eigenmannia*. *Sternopygus macrurus* (BSFFA651-07) foi utilizado como grupo externo. Os espécimes analisados neste estudo são representados pelas formas preenchidas.

Legendas Material Suplementar

STab. 1: Espécimes de *Eigenmannia* disponíveis no *Bold Systems* adicionadas às análises, com suas respectivas identificações (voucher), localidade e haplótipos correspondentes.

STab. 2: Distâncias *p* obtidas a partir de sequências parciais do gene *COI*, entre amostras de *Eigenmannia* e do grupo externo *Sternopygus macrurus*.

Agradecimentos

À agência brasileira CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) pelo apoio financeiro da pesquisa - Código de Financiamento 001, à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelo suporte logístico e experimental,

ao Dr. Weferson Junior da Graça da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela identificação taxonômica dos espécimes de *E. virescens* e *E. trilineata*, e ao Dr. Fernando Carvalho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela identificação taxonômica dos espécimes de *E. correntes*.

Referências

1. Ferraris CJ, de Santana CD, Vari RP. Checklist of Gymnotiformes (Osteichthyes: Ostariophysi) and catalogue of primary types. *Neotropical Ichthyology* 2017;15.
2. Albert JS, Crampton WGR. Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). In: *Electroreception*. Springer, New York 2005;360-409.
3. Bennett MVL. Electroreception. In: *Fish physiology*. Academic Press 1971;493-574.
4. Chagas C, Chagas Filho C, De Carvalho AP. (Ed.). *Bioelectrogenesis: A Comparative Survey of Its Mechanisms with Particular Emphasis on Electric Fishes*; Proceedings. Elsevier Publishing Company 1961.
5. Mago-Leccia F. Los peces de la familia Sternopygidae de Venezuela. *Acta científica venezolana* 1978;29:1-89.
6. Mago-Leccia F. Electric fishes of the continental waters of America. *Biblioteca de la Academia de Ciencias Fisicas, Matematicas y Naturales, Caracas* 1994;29:1-206.
7. Albert JS, Campos-Da-Paz R. Phylogenetic systematics of Gymnotiformes with diagnoses of 58 clades: a review of available data. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, Edipucrs, Porto Alegre 1998;419-443.
8. Graça WJ, Pavanelli CS. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes, Eduem, Maringá 2007;114.
9. Fricke R, Eschmeyer W, Van Der Laan R. Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references. California Academy of Sciences (versão eletrônica). <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>, acessado em: 17/05/2022.
10. Albert JS. Family Sternopygidae. In: Reis RE, Kullander SO.; Ferraris CJJr. (editors). *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*, Edipucrs, Porto Alegre 2003;487-491.
11. Waltz BT, Albert JS. Family Sternopygidae: Glass knifefishes, rattail knifefishes. In: Van Der Sleen P, Albert JS. (editors). *Field guide to the fishes of the Amazon, Orinoco & Guianas*. Princeton University Press, Princeton 2017;341-345.
12. Peixoto LAW, Ohara WM. A new species of *Eigenmannia* Jordan & Evermann (Gymnotiformes: Sternopygidae) from rio Tapajós, Brazil, with discussion on its species group and the myology within Eigenmanniinae. *Plos one* 2019;14(8).
13. Dutra GM, Peixoto LAW, Abrahão VP, et al. Morphology-based phylogeny of Eigenmanniinae Mago-Leccia, 1978 (Teleostei: Gymnotiformes: Sternopygidae), with a new classification. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 2021;59(8):2010-2059.
14. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 2003;270(1512):313-321.

15. Melo BF, Ochoa LE, Vari RP, et al. Cryptic species in the Neotropical fish genus *Curimatopsis* (Teleostei, Characiformes). *Zool Scr* 2016;45:650-658.
16. Morais-Silva JP, Oliveira AVD, Fabrin TMC, et al. Geomorphology influencing the diversification of fish in small-order rivers of neighboring basins. *Zebrafish* 2018;15(4):389-397.
17. Ward RD. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular ecology resources* 2009;9(4):1077-1085.
18. Pereira LH, Hanner R, Foresti F, et al. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC genetics* 2013;14(1):1-14.
19. Shimabukuro-Dias CK, Costa Silva GJD, Ashikaga FY, et al. Molecular identification of the fish fauna from the pantanal flood plain area in Brazil. *Mitochondrial Dna Part A* 2017;28(4):588-592.
20. Costa-Silva GJD, Yuldi Ashikaga F, Kioko Shimabukuro Dias C, et al. DNA barcoding techniques used to identify the shared ichthyofauna between the Pantanal floodplain and Upper Parana River. *Mitochondrial DNA part A* 2017;29(7):1063-1072.
21. Ahmed MS, Chowdhury MMK, Nahar L. Molecular characterization of small indigenous fish species (SIS) of Bangladesh through DNA barcodes. *Gene* 2019;684:53-57.
22. Bagley JC, de Aquino PDU, Breitman MF, et al. DNA barcode and minibarcode identification of freshwater fishes from Cerrado headwater streams in Central Brazil. *Journal of Fish Biology* 2019;95(4):1046-1060.
23. Pereira LHG, Castro JRC, Vargas PMH, et al. The use of an integrative approach to improve accuracy of species identification and detection of new species in studies of stream fish diversity. *Genetica* 2021;149(2):103-116.
24. Popoola MO, Schedel FDB, Hebert PD, et al. First DNA barcode library for the ichthyofauna of the Jos Plateau (Nigeria) with comments on potential undescribed fish species. *PeerJ* 2022;10, e13049.
25. Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B* 2003;270:313-321.
26. Waugh J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays* 2007;29:188-197.
27. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, et al. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 2005;360(1462):1847-1857.
28. Hubert N, Hanner R, Holm E, et al. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS One* 2008;3(6).<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002490>
29. Rosso JJ, Mabrugaña E, Gonzalez Castro M, et al. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology Resources* 2012;12(6):999-1011.
30. Campos-da-Paz R. New species of *Megadontognathus* from the Amazon basin, with phylogenetic and taxonomic discussions on the genus (Gymnotiformes: Apterontidae). *Copeia* 1999;1041-1049.
31. Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1994;3(5):294-299.
32. Rosenthal A, Coutelle O, Craxton M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research* 1993;21:173-174.

33. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999;41:95-98. 10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29.
34. Kumar S, Stecher G, Tamur K. Mega 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 2016;33:1870-1874. 10.1093/molbev/msw054
35. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 1994;22(1):4673-4680. 10.1093/nar/22.22.4673.
36. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-Delbarrio JC, et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution* 2017;34:3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.
37. Leigh JW, Bryant D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 2015; 6(9):1110-1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>.
38. Dutra GM, Peixoto LAW, Abrahão VP, et al. Morphology-based phylogeny of Eigenmanniinae Mago-Leccia, 1978 (Teleostei: Gymnotiformes: Sternopygidae), with a new classification. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 2021;59(8):2010-2059.
39. Herrera-Collazos EE, Galindo-Cuervo AM, Maldonado-Ocampo JA, et al. Three new species of the *Eigenmannia trilineata* species group (Gymnotiformes: Sternopygidae) from northwestern South America. *Neotropical Ichthyology* 2020;18.
40. Peixoto LAW, Dutra GM, Wosiacki WB. The electric glass knifefishes of the *Eigenmannia trilineata* species-group (Gymnotiformes: Sternopygidae): monophyly and description of seven new species. *Zoological Journal of the Linnean Society* 2015;175(2):384-414.
41. Tagliacollo VA, Bernt MJ, Craig JM, et al. Model-based total evidence phylogeny of Neotropical electric knifefishes (Teleostei, Gymnotiformes). *Molecular phylogenetics and Evolution* 2016;95:20-33.
42. Peixoto LA, Pastana MN, Ballen GA. New species of glass knifefish genus *Eigenmannia* (Gymnotiformes: Sternopygidae) with comments on the morphology and function of the enlarged cephalic lateral-line canals of Sternopygidae. *Journal of Fish Biology* 2021;98(1):142-153.
43. Peixoto LAW, Wosiacki WB. *Eigenmannia besouro*, a new species of the *Eigenmannia trilineata* species-group (Gymnotiformes: Sternopygidae) from the rio São Francisco basin, northeastern Brazil. *Zootaxa* 2016;4126(2):262-270.
44. Dutra GM. Sistemática de Eigenmanniinae (Teleostei: Gymnotiformes: Sternopygidae). [PhD Thesis]. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2015.
45. Campos-Da-Paz R, Queiroz IR. A new species of *Eigenmannia* Jordan and Evermann (Gymnotiformes: Sternopygidae) from the upper rio Paraguai basin. *Zootaxa* 2017;4216(1).
46. Alves-Gomes JA. The phylogenetic position of the South American electric fish genera *Sternopygus* and *Archolaemus* (Ostariophysi: Gymnotiformes) according to 12s and 16s mitochondrial DNA sequences. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, et al. (eds.), Porto Alegre: Museu de Ciências e Tecnologia—PUC/RS 1998:447-460.

47. Albert JS. Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei) Museum of Zoology, University of Michigan, Miscellaneous Publications 2001;190.

Fig. 1. Rede de haplótipos de seqüências de *Eigenmannia* com o marcador *COI*. Os haplótipos a seguir são referentes aos espécimes analisados neste estudo: **H39** (167), **H45** (40, 54 e 194), **H46** (170), **H47** (163), H48 (12), **H49** (1275), **H50** (1273), **H51** (1272) e **H52** (1271).,

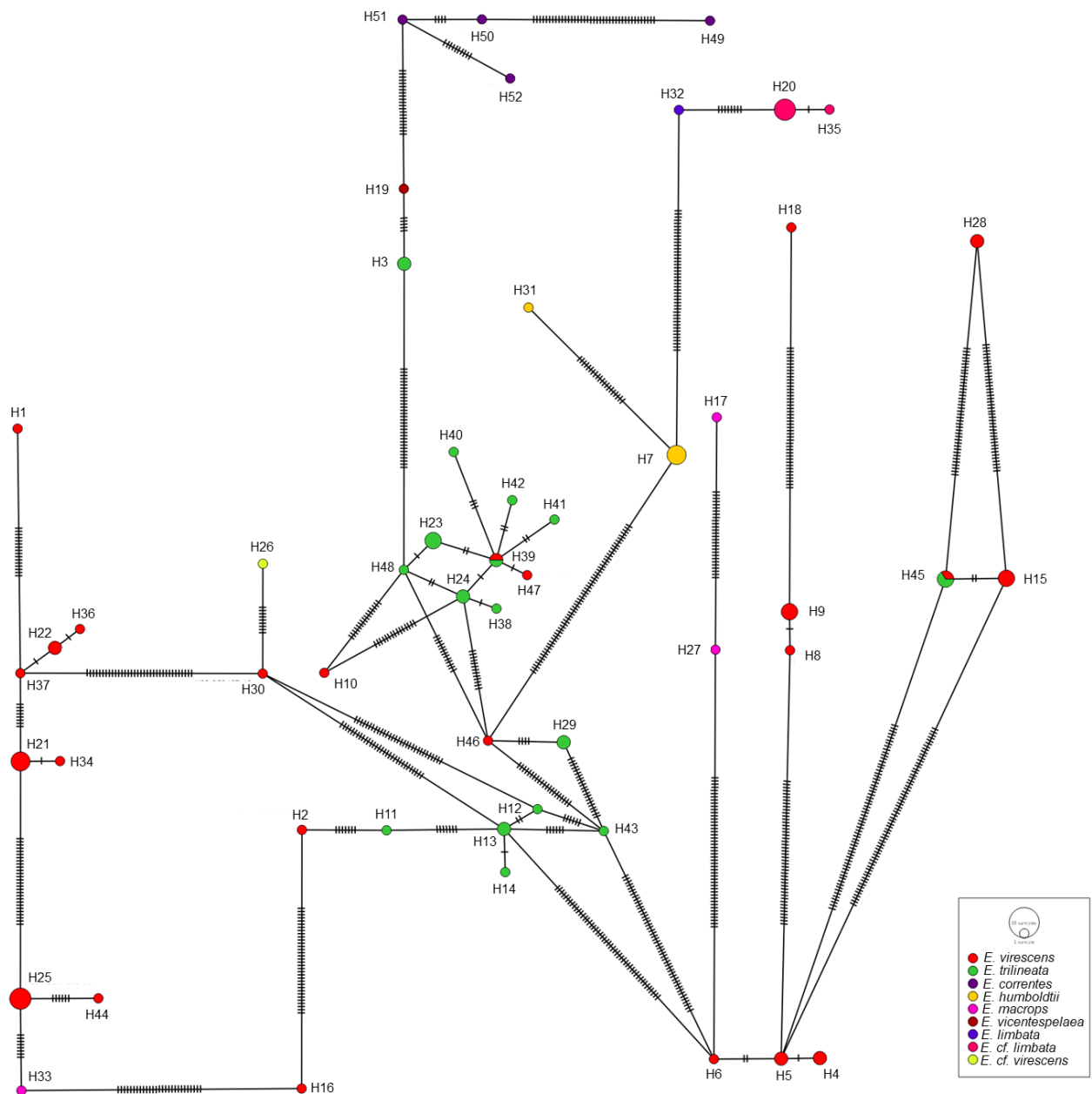
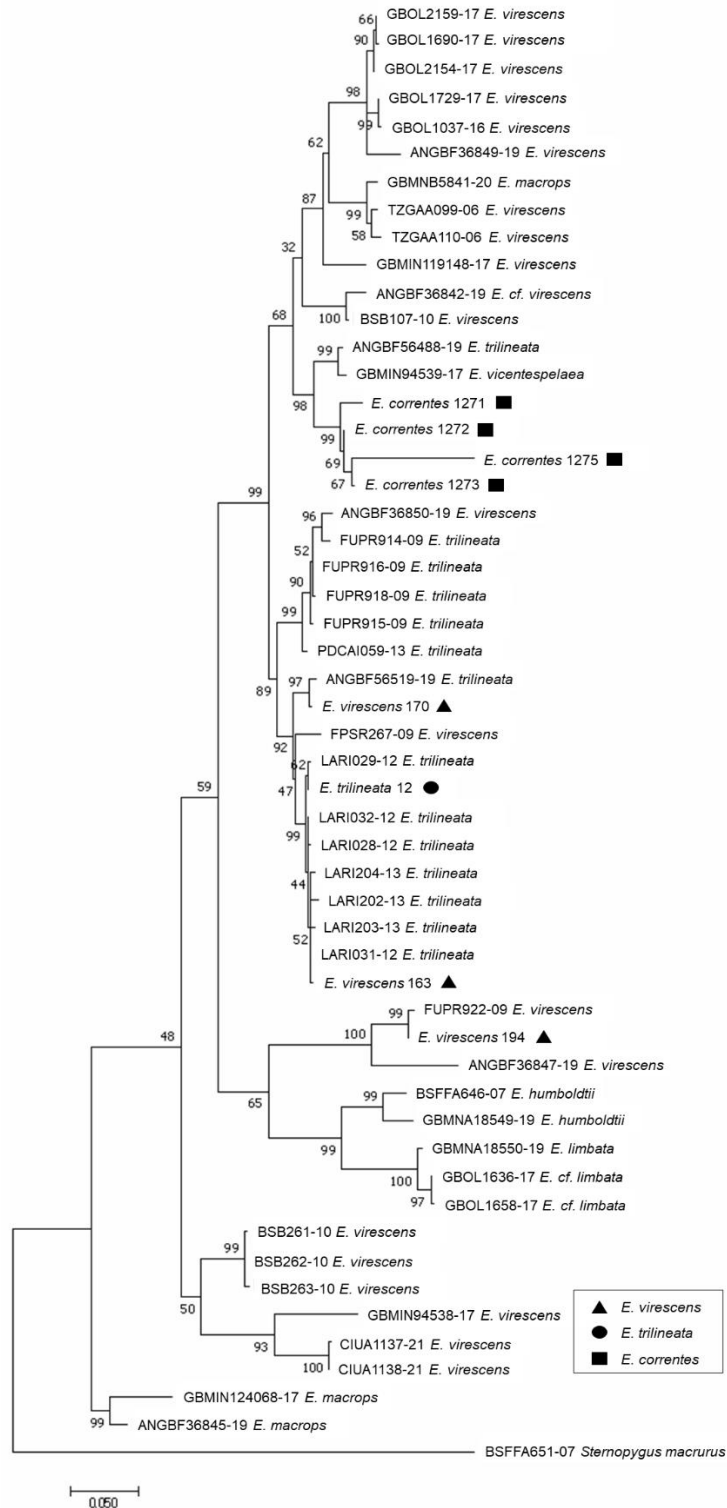


Fig. 2. Árvore genética construída pelo modelo Tamura-Nei (TrN) utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança com 1.000 reamostragens de *bootstrap*, a partir de sequências parciais do gene *COI* de *Eigenmannia*. *Sternopygus macrurus* (BSFFA651-07) foi utilizado como grupo externo. Os espécimes analisados neste estudo são representados pelas formas preenchidas.



STab. 1 - Material Suplementar. Espécimes de *Eigenmannia* disponíveis no *Bold Systems* adicionadas às análises, com suas respectivas identificações (voucher), localidade e haplótipos correspondentes.

Espécie	Acesso Bold	Localização	Haplótipos
<i>Eigenmannia virescens</i>	ANGBF36849-19	-	H1
<i>Eigenmannia virescens</i>	ANGBF36850-19	-	H2
<i>Eigenmannia trilineata</i>	ANGBF56488-19	Brasil	H3
<i>Eigenmannia trilineata</i>	BFFDF015-19	Brasil	H3
<i>Eigenmannia virescens</i>	BSB261-10	Brasil	H4
<i>Eigenmannia virescens</i>	BSB262-10	Brasil	H5
<i>Eigenmannia virescens</i>	BSB263-10	Brasil	H6
<i>Eigenmannia humboldtii</i>	BSFFA646-07	Panamá	H7
<i>Eigenmannia humboldtii</i>	BSFFA647-07	Panamá	H7
<i>Eigenmannia virescens</i>	CIUA1137-21	Colômbia	H8
<i>Eigenmannia virescens</i>	CIUA1138-21	Colômbia	H9
<i>Eigenmannia virescens</i>	FPSR267-09	Brasil	H10
<i>Eigenmannia trilineata</i>	FUPR914-09	Brasil	H11
<i>Eigenmannia trilineata</i>	FUPR915-09	Brasil	H12
<i>Eigenmannia trilineata</i>	FUPR916-09	Brasil	H13
<i>Eigenmannia trilineata</i>	FUPR917-09	Brasil	H13
<i>Eigenmannia trilineata</i>	FUPR918-09	Brasil	H14
<i>Eigenmannia virescens</i>	FUPR922-09	Brasil	H15
<i>Eigenmannia virescens</i>	FUPR924-09	Brasil	H15
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBMIN119148-17	-	H16
<i>Eigenmannia macrops</i>	GBMIN124068-17	-	H17
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBMIN94538-17	-	H18
<i>Eigenmannia vicentespelaea</i>	GBMIN94539-17	-	H19
<i>Eigenmannia cf. limbata</i>	GBOL1636-17	Guiana Francesa	H20
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBOL1729-17	Guiana Francesa	H21
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBOL2159-17	Guiana Francesa	H22
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBOL3597-18	Suriname	H21
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBOL949-16	Guiana Francesa	H22
<i>Eigenmannia trilineata</i>	LARI029-12	Argentina	H23
<i>Eigenmannia trilineata</i>	LARI030-12	Argentina	H23
<i>Eigenmannia trilineata</i>	LARI032-12	Argentina	H24
<i>Eigenmannia trilineata</i>	PEDII135-22	Brasil	H23
<i>Eigenmannia virescens</i>	TZGAA099-06	Guiana	H25
<i>Eigenmannia virescens</i>	TZGAA133-06	Guiana	H25

<i>Eigenmannia virescens</i>	TZGAA145-06	Guiana	H25
<i>Eigenmannia cf. virescens</i>	ANGBF36842-19	-	H26
<i>Eigenmannia humboldtii</i>	ANGBF36843-19	Panamá	H7
<i>Eigenmannia humboldtii</i>	ANGBF36844-19	Panamá	H7
<i>Eigenmannia macrops</i>	ANGBF36845-19	-	H27
<i>Eigenmannia virescens</i>	ANGBF36847-19	Peru	H28
<i>Eigenmannia virescens</i>	ANGBF36848-19	Peru	H28
<i>Eigenmannia trilineata</i>	ANGBF56519-19	Brasil	H29
<i>Eigenmannia trilineata</i>	BFFDF046-19	Brasil	H29
<i>Eigenmannia virescens</i>	BSB107-10	Brasil	H30
<i>Eigenmannia virescens</i>	BSB260-10	Brasil	H5
<i>Eigenmannia virescens</i>	BSB264-10	Brasil	H4
<i>Eigenmannia virescens</i>	CIUA1136-21	Colômbia	H9
<i>Eigenmannia virescens</i>	CIUA1139-21	Colômbia	H9
<i>Eigenmannia virescens</i>	FUPR919-09	Brasil	H15
<i>Eigenmannia humboldtii</i>	GBMNA18549-19	Colômbia	H31
<i>Eigenmannia limbata</i>	GBMNA18550-19	Suriname	H32
<i>Eigenmannia macrops</i>	GBMNB5841-20	-	H33
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBOL1037-16	Suriname	H34
<i>Eigenmannia cf. limbata</i>	GBOL1113-16	Guiana Francesa	H20
<i>Eigenmannia cf. limbata</i>	GBOL1657-17	Guiana Francesa	H20
<i>Eigenmannia cf. limbata</i>	GBOL1658-17	Guiana Francesa	H35
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBOL1690-17	Guiana Francesa	H36
<i>Eigenmannia cf. limbata</i>	GBOL1719-17	Guiana Francesa	H20
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBOL1728-17	Guiana Francesa	H21
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBOL2154-17	Guiana Francesa	H37
<i>Eigenmannia cf. limbata</i>	GBOL2165-17	Guiana Francesa	H20
<i>Eigenmannia virescens</i>	GBOL3596-18	Suriname	H21
<i>Eigenmannia trilineata</i>	LARI028-12	Argentina	H38
<i>Eigenmannia trilineata</i>	LARI031-12	Argentina	H39
<i>Eigenmannia trilineata</i>	LARI202-13	Argentina	H40
<i>Eigenmannia trilineata</i>	LARI203-13	Argentina	H41
<i>Eigenmannia trilineata</i>	LARI204-13	Argentina	H42
<i>Eigenmannia trilineata</i>	LARI205-13	Argentina	H24
<i>Eigenmannia trilineata</i>	PDCAI059-13	Brasil	H43
<i>Eigenmannia virescens</i>	TZGAA110-06	Guiana	H44

<i>Eigenmannia virescens</i>	TZGAA121-06	Guiana	H25
<i>Eigenmannia virescens</i>	TZGAA182-06	Guiana	H25
<i>Espécie</i>	Voucher	Localização	Haplótipos
<i>Eigenmannia correntes</i>	1271	Brasil	H52
<i>Eigenmannia correntes</i>	1272	Brasil	H51
<i>Eigenmannia correntes</i>	1273	Brasil	H50
<i>Eigenmannia correntes</i>	1275	Brasil	H49
<i>Eigenmannia trilineata</i>	12	Brasil	H48
<i>Eigenmannia trilineata</i>	40	Brasil	H45
<i>Eigenmannia trilineata</i>	54	Brasil	H45
<i>Eigenmannia virescens</i>	163	Brasil	H47
<i>Eigenmannia virescens</i>	167	Brasil	H39
<i>Eigenmannia virescens</i>	170	Brasil	H46
<i>Eigenmannia virescens</i>	194	Brasil	H45

STab. 2 - Material Suplementar. Distâncias p obtidas a partir de sequências parciais do gene *COI*, entre amostras de *Eigenmannia* e do grupo externo *Sternopygus macrurus*.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27
H1. ANGBF36849-19																											
H2. ANGBF36850-19	0,082																										
H3. ANGBF56488-19	0,082	0,079																									
H4. BSB261-10	0,097	0,096	0,091																								
H5. BSB262-10	0,096	0,094	0,089	0,002																							
H6. BSB263-10	0,096	0,091	0,089	0,005	0,003																						
H7. BSFFA646-07	0,129	0,112	0,111	0,122	0,121	0,122																					
H8. CIUA1137-21	0,124	0,126	0,107	0,079	0,077	0,081	0,133																				
H9. CIUA1138-21	0,122	0,124	0,106	0,081	0,079	0,082	0,131	0,002																			
H10. FPSR267-09	0,087	0,054	0,059	0,101	0,099	0,099	0,109	0,116	0,114																		
H11. FUPR914-09	0,092	0,012	0,076	0,094	0,092	0,089	0,107	0,124	0,122	0,052																	
H12. FUPR915-09	0,089	0,017	0,064	0,089	0,087	0,084	0,104	0,117	0,116	0,039	0,015																
H13. FUPR916-09	0,086	0,013	0,065	0,086	0,084	0,081	0,104	0,117	0,116	0,040	0,012	0,003															
H14. FUPR918-09	0,087	0,015	0,067	0,087	0,086	0,082	0,102	0,119	0,117	0,042	0,013	0,005	0,002														
H15. FUPR922-09	0,136	0,126	0,107	0,106	0,104	0,107	0,124	0,126	0,126	0,121	0,126	0,119	0,119	0,121													
H16. GBMIN119148-17	0,059	0,057	0,069	0,091	0,092	0,092	0,133	0,116	0,114	0,076	0,067	0,065	0,064	0,065	0,129												
H17. GBMIN124068-17	0,117	0,106	0,119	0,102	0,101	0,097	0,139	0,129	0,131	0,119	0,116	0,109	0,109	0,111	0,133	0,111											
H18. GBMIN94538-17	0,121	0,106	0,126	0,097	0,096	0,099	0,141	0,077	0,076	0,128	0,116	0,112	0,112	0,114	0,129	0,104	0,112										
H19. GBMIN94539-17	0,077	0,070	0,008	0,099	0,097	0,097	0,116	0,116	0,114	0,064	0,081	0,069	0,070	0,072	0,109	0,060	0,111	0,117									
H20. GBOL1636-17	0,146	0,129	0,126	0,131	0,129	0,133	0,082	0,134	0,136	0,128	0,124	0,124	0,124	0,126	0,129	0,136	0,139	0,139	0,131								
H21. GBOL1729-17	0,030	0,081	0,065	0,086	0,084	0,084	0,128	0,114	0,112	0,076	0,081	0,074	0,070	0,072	0,124	0,055	0,124	0,122	0,070	0,148							
H22. GBOL2159-17	0,029	0,077	0,060	0,089	0,087	0,087	0,122	0,116	0,114	0,067	0,074	0,067	0,064	0,065	0,121	0,055	0,117	0,122	0,065	0,136	0,015						
H23. LARI029-12	0,079	0,057	0,055	0,092	0,091	0,091	0,107	0,112	0,111	0,027	0,055	0,045	0,044	0,045	0,114	0,069	0,109	0,116	0,060	0,122	0,069	0,060					
H24. LARI032-12	0,081	0,052	0,057	0,091	0,089	0,089	0,106	0,114	0,112	0,025	0,050	0,040	0,039	0,040	0,114	0,067	0,104	0,114	0,062	0,121	0,069	0,062	0,005				
H25. TZGAA099-06	0,060	0,072	0,064	0,089	0,087	0,087	0,117	0,121	0,119	0,070	0,069	0,060	0,059	0,060	0,124	0,055	0,117	0,126	0,069	0,131	0,047	0,049	0,065	0,064			
H26. ANGBF36842-19	0,076	0,060	0,064	0,101	0,099	0,099	0,121	0,126	0,124	0,070	0,070	0,060	0,060	0,062	0,128	0,060	0,117	0,116	0,059	0,129	0,070	0,067	0,065	0,060	0,077		
H27. ANGBF36845-19	0,117	0,099	0,112	0,082	0,084	0,081	0,131	0,122	0,121	0,114	0,109	0,102	0,102	0,104	0,121	0,101	0,047	0,102	0,104	0,139	0,119	0,114	0,101	0,097	0,119	0,116	

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27
H28. ANGBF36847-19	0,131	0,131	0,116	0,129	0,128	0,129	0,117	0,134	0,134	0,121	0,128	0,121	0,121	0,122	0,069	0,139	0,129	0,143	0,121	0,126	0,133	0,122	0,112	0,112	0,122	0,131	0,131
H29. ANGBF56519-19	0,081	0,054	0,062	0,091	0,089	0,089	0,101	0,114	0,112	0,027	0,050	0,045	0,044	0,045	0,112	0,069	0,116	0,119	0,067	0,122	0,067	0,062	0,027	0,025	0,070	0,067	0,106
H30. BSB107-10	0,074	0,062	0,055	0,092	0,091	0,091	0,112	0,119	0,117	0,065	0,062	0,052	0,052	0,054	0,116	0,059	0,122	0,124	0,060	0,126	0,059	0,059	0,064	0,059	0,065	0,015	0,121
H31. GBMNA18549-19	0,128	0,116	0,119	0,131	0,129	0,129	0,034	0,136	0,134	0,111	0,114	0,107	0,107	0,106	0,122	0,143	0,133	0,136	0,124	0,079	0,129	0,124	0,106	0,104	0,129	0,126	0,131
H32. GBMNA18550-19	0,143	0,129	0,126	0,128	0,126	0,129	0,076	0,138	0,139	0,128	0,124	0,124	0,124	0,122	0,128	0,139	0,139	0,139	0,131	0,013	0,144	0,133	0,122	0,121	0,133	0,129	0,139
H33. GBMNB5841-20	0,052	0,065	0,069	0,096	0,094	0,094	0,126	0,126	0,124	0,076	0,076	0,070	0,069	0,070	0,128	0,045	0,114	0,116	0,060	0,136	0,050	0,054	0,070	0,070	0,013	0,070	0,114
H34. GBOL1037-16	0,030	0,082	0,067	0,087	0,086	0,086	0,126	0,114	0,112	0,074	0,082	0,076	0,072	0,074	0,126	0,057	0,122	0,122	0,072	0,146	0,002	0,017	0,070	0,070	0,049	0,072	0,121
H35. GBOL1658-17	0,148	0,128	0,124	0,129	0,128	0,131	0,081	0,134	0,136	0,126	0,122	0,122	0,122	0,124	0,128	0,134	0,139	0,139	0,129	0,002	0,149	0,138	0,121	0,119	0,129	0,128	0,139
H36. GBOL1690-17	0,030	0,079	0,062	0,091	0,089	0,089	0,124	0,117	0,116	0,069	0,076	0,069	0,065	0,067	0,122	0,057	0,119	0,121	0,067	0,138	0,017	0,002	0,062	0,064	0,050	0,069	0,116
H37. GBOL2154-17	0,027	0,079	0,059	0,087	0,086	0,086	0,124	0,114	0,112	0,069	0,076	0,069	0,065	0,067	0,122	0,057	0,119	0,124	0,067	0,138	0,013	0,002	0,062	0,064	0,050	0,065	0,116
H38. LARI028-12	0,079	0,054	0,059	0,092	0,091	0,091	0,107	0,116	0,114	0,027	0,052	0,042	0,040	0,042	0,116	0,069	0,106	0,116	0,064	0,122	0,067	0,060	0,007	0,002	0,065	0,059	0,099
H39. LARI031-12	0,082	0,054	0,059	0,092	0,091	0,091	0,107	0,116	0,114	0,027	0,052	0,042	0,040	0,042	0,116	0,069	0,106	0,116	0,064	0,122	0,070	0,064	0,003	0,002	0,065	0,062	0,099
H40. LARI202-13	0,086	0,059	0,064	0,091	0,089	0,089	0,112	0,117	0,116	0,032	0,057	0,047	0,045	0,047	0,117	0,074	0,107	0,117	0,069	0,124	0,074	0,067	0,008	0,007	0,067	0,067	0,101
H41. LARI203-13	0,086	0,057	0,062	0,096	0,094	0,094	0,107	0,117	0,116	0,030	0,055	0,045	0,044	0,045	0,116	0,072	0,106	0,117	0,067	0,119	0,074	0,067	0,007	0,005	0,065	0,065	0,102
H42. LARI204-13	0,079	0,054	0,059	0,092	0,091	0,091	0,109	0,112	0,111	0,027	0,052	0,044	0,040	0,042	0,117	0,069	0,107	0,116	0,064	0,124	0,067	0,060	0,007	0,005	0,067	0,060	0,101
H43. PDCAI059-13	0,086	0,023	0,064	0,086	0,084	0,081	0,099	0,114	0,112	0,039	0,022	0,010	0,010	0,012	0,117	0,065	0,109	0,112	0,069	0,119	0,069	0,064	0,042	0,040	0,059	0,062	0,101
H44. TZGAA110-06	0,060	0,074	0,067	0,094	0,092	0,089	0,121	0,121	0,119	0,072	0,070	0,065	0,064	0,065	0,128	0,059	0,122	0,124	0,072	0,129	0,049	0,049	0,067	0,069	0,010	0,084	0,119
H45. <i>E. virescens</i> 194	0,133	0,122	0,107	0,106	0,104	0,107	0,121	0,122	0,122	0,119	0,122	0,116	0,116	0,117	0,003	0,128	0,129	0,126	0,109	0,128	0,121	0,117	0,112	0,112	0,121	0,124	0,119
H46. <i>E. virescens</i> 170	0,077	0,054	0,059	0,089	0,087	0,087	0,094	0,111	0,109	0,030	0,052	0,045	0,044	0,045	0,112	0,070	0,116	0,117	0,064	0,116	0,067	0,059	0,023	0,022	0,070	0,064	0,104
H47. <i>E. virescens</i> 163	0,084	0,055	0,060	0,091	0,089	0,089	0,109	0,114	0,112	0,029	0,054	0,044	0,042	0,044	0,114	0,070	0,107	0,117	0,065	0,124	0,072	0,065	0,005	0,003	0,067	0,064	0,101
H48. <i>E. trilineata</i> 12	0,077	0,055	0,054	0,091	0,089	0,089	0,106	0,111	0,109	0,025	0,054	0,044	0,042	0,044	0,112	0,067	0,107	0,114	0,059	0,121	0,067	0,059	0,002	0,003	0,064	0,064	0,099
H49. <i>E. correntes</i> 1275	0,143	0,128	0,101	0,164	0,163	0,163	0,176	0,183	0,181	0,128	0,129	0,124	0,122	0,124	0,171	0,128	0,178	0,185	0,101	0,188	0,131	0,122	0,122	0,124	0,131	0,126	0,180
H50. <i>E. correntes</i> 1273	0,084	0,070	0,044	0,109	0,107	0,107	0,131	0,129	0,128	0,072	0,074	0,069	0,067	0,069	0,122	0,069	0,126	0,131	0,042	0,143	0,074	0,065	0,067	0,069	0,074	0,065	0,124
H51. <i>E. correntes</i> 1272	0,077	0,064	0,037	0,102	0,101	0,101	0,124	0,122	0,121	0,065	0,067	0,062	0,060	0,062	0,116	0,062	0,119	0,124	0,035	0,136	0,067	0,059	0,060	0,062	0,067	0,059	0,117
H52. <i>E. correntes</i> 1271	0,087	0,074	0,044	0,112	0,111	0,111	0,121	0,129	0,128	0,072	0,074	0,069	0,067	0,065	0,129	0,076	0,131	0,138	0,045	0,143	0,077	0,069	0,067	0,069	0,074	0,072	0,128
BSFFA651-07 <i>S. macrurus</i>	0,186	0,191	0,195	0,173	0,174	0,174	0,191	0,169	0,171	0,186	0,191	0,180	0,183	0,181	0,191	0,186	0,169	0,193	0,198	0,196	0,185	0,186	0,191	0,191	0,180	0,205	0,171

Continuação

	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43	H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H53
H28. ANGBF36847-19																										
H29. ANGBF56519-19	0,117																									
H30. BSB107-10	0,119	0,062																								
H31. GBMNA18549-19	0,119	0,102	0,121																							
H32. GBMNA18550-19	0,128	0,119	0,122	0,079																						
H33. GBMNB5841-20	0,131	0,076	0,069	0,138	0,138																					
H34. GBOL1037-16	0,134	0,069	0,060	0,128	0,143	0,052																				
H35. GBOL1658-17	0,124	0,121	0,124	0,081	0,015	0,134	0,148																			
H36. GBOL1690-17	0,124	0,064	0,060	0,126	0,134	0,055	0,018	0,139																		
H37. GBOL2154-17	0,124	0,064	0,057	0,126	0,134	0,055	0,015	0,139	0,003																	
H38. LARI028-12	0,114	0,027	0,057	0,106	0,122	0,072	0,069	0,121	0,062	0,062																
H39. LARI031-12	0,114	0,027	0,060	0,106	0,122	0,072	0,072	0,121	0,065	0,065	0,003															
H40. LARI202-13	0,112	0,032	0,065	0,111	0,124	0,074	0,076	0,122	0,069	0,069	0,008	0,005														
H41. LARI203-13	0,114	0,030	0,064	0,106	0,119	0,072	0,076	0,117	0,069	0,069	0,007	0,003	0,008													
H42. LARI204-13	0,116	0,030	0,059	0,107	0,124	0,074	0,069	0,122	0,062	0,062	0,007	0,003	0,008	0,007												
H43. PDCAI059-13	0,119	0,035	0,054	0,102	0,119	0,067	0,070	0,117	0,065	0,065	0,042	0,042	0,047	0,045	0,044											
H44. TZGAA110-06	0,124	0,074	0,072	0,128	0,131	0,015	0,050	0,131	0,050	0,050	0,070	0,070	0,072	0,070	0,072	0,060										
H45. <i>E. virescens</i> 194	0,069	0,111	0,112	0,119	0,126	0,124	0,122	0,126	0,119	0,119	0,114	0,114	0,116	0,114	0,116	0,114	0,124									
H46. <i>E. virescens</i> 170	0,112	0,007	0,059	0,096	0,112	0,076	0,069	0,114	0,060	0,060	0,023	0,023	0,029	0,027	0,027	0,035	0,072	0,111								
H47. <i>E. virescens</i> 163	0,116	0,029	0,062	0,107	0,124	0,074	0,074	0,122	0,067	0,067	0,005	0,002	0,007	0,005	0,005	0,044	0,072	0,112	0,025							
H48. <i>E. trilineata</i> 12	0,111	0,025	0,062	0,104	0,121	0,069	0,069	0,119	0,060	0,060	0,005	0,005	0,010	0,008	0,008	0,040	0,065	0,111	0,022	0,007						
H49. <i>E. correntes</i> 1275	0,186	0,124	0,122	0,185	0,188	0,128	0,133	0,186	0,124	0,124	0,126	0,126	0,129	0,128	0,126	0,121	0,131	0,168	0,124	0,128	0,121					
H50. <i>E. correntes</i> 1273	0,139	0,069	0,064	0,139	0,143	0,069	0,076	0,141	0,067	0,067	0,070	0,070	0,076	0,072	0,070	0,065	0,074	0,119	0,069	0,072	0,065	0,065				
H51. <i>E. correntes</i> 1272	0,133	0,062	0,057	0,133	0,136	0,062	0,069	0,134	0,060	0,060	0,064	0,064	0,069	0,065	0,064	0,059	0,067	0,112	0,062	0,065	0,059	0,069	0,007			
H52. <i>E. correntes</i> 1271	0,139	0,069	0,067	0,129	0,139	0,072	0,079	0,141	0,070	0,070	0,070	0,070	0,076	0,072	0,070	0,065	0,074	0,126	0,069	0,072	0,065	0,082	0,020	0,017		
BSFFA651-07 <i>S. macrurus</i>	0,195	0,193	0,195	0,188	0,188	0,185	0,183	0,195	0,185	0,186	0,190	0,193	0,191	0,193	0,193	0,181	0,181	0,188	0,191	0,191	0,190	0,245	0,196	0,190	0,195	

ARTIGO II

Mapeamento cromossômico de sequências repetitivas em *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes, Sternopygidae) da bacia do Alto rio Paraná

Raissa Caroline Mazetto, Luciana Andréia borin de Carvalho, Carlos Alexandre Fernandes e Ana Luiza de Brito Portela Castro

Resumo

Sequências de DNA repetitivo compreendem grande parte do genoma de eucariotos, apresentando papel fundamental em rearranjos cromossômicos e diferenciação cariotípica desses organismos. O gênero *Eigenmannia* possui uma alta diversidade cromossômica, seus números cariotípicos variam de 28 a 46 cromossomos, e diversos sistemas sexuais como XY, ZW, ZO e X_1X_2Y . No presente estudo, realizamos o mapeamento cromossômico utilizando sequências microssatélites (GATA)₈ e (CGC)₁₀ por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) de espécimes de *E. virescens* coletados no córrego Dourado, MS, da bacia do Alto rio Paraná para melhor compreensão da estrutura e organização do genoma desta espécie. A sequência (GATA)₈ hibridizou as regiões terminais na maioria dos cromossomos, e ainda, marcações intersticiais dispersas também foram observadas. O cromossomo sexual W apresentou um acúmulo deste microssatélite nas regiões terminal (braço curto) e no braço longo, enquanto que no cromossomo Z observou-se um padrão de distribuição disperso. A sonda (CGC)₁₀ hibridizou na região terminal do braço curto do par 15 (acrocêntricos), coincidindo com a região detectada por DNAr 18S como determinado em estudos prévios com esta espécie. Os dados apresentados complementam informações sobre a estrutura cromossômica de *E. virescens* quanto a presença e organização de sequências microssatélites (GATA)₈ e (CGC)₁₀ em seu genoma, considerando que a evolução cariotípica neste grupo tem sido altamente divergente e marcada por rearranjos cromossômicos, mecanismos de heterocromatinização, nos quais as sequências repetitivas possam estar envolvidas.

Palavras-chave: citogenética, cromossomos sexuais, DNA repetitivo, FISH, microssatélites

Chromosomal mapping of repetitive sequences in *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes, Sternopygidae) from the Upper Paraná river basin

Abstract

Repetitive DNA sequences comprise a large part of the genome of eukaryotes, playing a fundamental role in chromosomal rearrangements and karyotypic differentiation of these organisms. The genus *Eigenmannia* has a high chromosomal diversity, its karyotypic numbers range from 28 to 46 chromosomes, and several sexual systems such as XY, ZW, Z0 and X₁X₂Y. In the present study, we performed chromosomal mapping using microsatellite sequences (GATA)₈ and (CGC)₁₀ by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of *E. virescens* specimens collected in the Dourado stream, MS, in the Upper Paraná River basin for a better understanding of the structure and organization of the genome of this species. The sequence (GATA)₈ hybridized the terminal regions on most chromosomes, scattered interstitial markings were also observed. The W sex chromosome showed an accumulation of this microsatellite in the terminal regions (short arm) and in the long arm, while in the Z chromosome there was a dispersed distribution pattern. The (CGC)₁₀ probe hybridized in the terminal region of the short arm of the pair 15 (acrocentric), coinciding with the region detected by 18S rDNA as determined in previous studies with this species. The data presented complement information about the chromosomal structure of *E. virescens* regarding the presence and organization of microsatellite sequences (GATA)₈ and (CGC)₁₀ in its genome, considering that the karyotypic evolution in this group has been highly divergent and marked by chromosomal rearrangements, heterochromatinization mechanisms, in which repetitive sequences may be involved.

Keywords: cytogenetics, FISH, microsatellites, repetitive DNA, sex chromosome

Introdução

Gymnotiformes é um grupo de peixes nativos de água doce que fazem parte da região Neotropical, e consiste em espécies que têm a capacidade de emitir fracas descargas elétricas (Alves-Gomes 2001; Lavoué et al. 2012). De acordo com a lista de todas as espécies de peixes elétricos da ordem registrada por Ferraris et al. (2017), até 2016, foram incluídas 240 espécies válidas, entre os 34 gêneros e cinco famílias, Apterontidae, Gymnotidae, Hypopomidae, Rhamphichthyidae e Sternopygidae; e um gênero monotípico conhecido apenas por registros fósseis. As cinco famílias de Gymnotiformes possuem representantes na ecorregião da bacia do Alto rio Paraná, PR (Graça e Pavanelli 2007). Além disso, nessa localização Reis et al. (2020) encontraram cinco espécies pertencentes à Sternopygidae: *Eigenmannia guairaca* Peixoto, Dutra & Wosiacki, 2015, *E. trilineata* López & Castello, 1966, *E. virescens* Valenciennes, 1836, *Eigenmannia* sp. e *Sternopygus macrurus* Bloch & Schneider, 1801. Dentre as espécies de Sternopygidae, destacamos *E. virescens*, que apresenta uma ampla distribuição geográfica, se estendendo do oeste dos Andes na bacia do rio Orinoco até o rio de La Plata, abrangendo os países: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela (Silva et al. 2009).

Estudos citogenéticos mostram uma grande diversidade cromossômica em muitas espécies de Gymnotiformes, que varia de $2n=24$ cromossomos (*Apterontus albifrons*) (Almeida-Toledo et al. 1981; Mendes et al. 2012) a $2n=54$ cromossomos (*Gymnotus carapo*) (Foresti et al. 1984). *Eigenmannia* Jordan & Evermann, 1896 também apresenta uma extensa variabilidade cromossômica entre espécies e/ou populações de diferentes bacias hidrográficas distribuídas pelo Brasil. Neste grupo, os números diploides variam desde $2n=28$, 31/32, 34, 36 a 38 cromossomos (Almeida-Toledo et al. 1984, 1985, 1996, 2000, 2001, 2002; Silva et al. 2009, 2015; Fernandes et al. 2010, 2019; Sene et al. 2014; Araya-Jaime et al. 2017, 2022) bem como a ocorrência de triploidia natural em um indivíduo de *Eigenmannia* sp. da bacia amazônica analisado por Almeida-Toledo et al. (1985) que apresentou $3n=46$.

Além da variação cariotípica numérica e estrutural registrada em espécies de *Eigenmannia*, este gênero destaca-se pela ocorrência de diferentes sistemas sexuais, incluindo os sistemas XY, ZW, Z0 e X_1X_2Y (Silva et al. 2009; Fernandes et al. 2019). A maioria dos dados de ocorrência de cromossomos sexuais tem sido registrada em populações de *E. virescens*, que, apesar de apresentar número diploide relativamente constante de $2n=38$, as fórmulas cariotípicas possuem algumas divergências entre os autossomos, incluindo sistemas cromossômicos sexuais distintos quanto a heterogametia, como XX/XY e ZZ/ZW (Almeida-Toledo et al. 2001, 2002; Silva et al. 2009; Fernandes et al. 2019). Em espécies não descritas (*Eigenmannia sp.*) e em uma população de *E. trilineata*, foram descritos números diploides de $2n=31$ para machos e $2n=32$ para fêmeas, isso se deve à presença de um sistema sexual múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Almeida-Toledo et al. 1984, 2000; Fernandes et al. 2010; Sene et al. 2014). Recentemente, Araya-Jaime et al. (2017) descreveram uma população de *Eigenmannia aff. trilineata* que apresentava número diploide de $2n=32$ para machos e $2n=31$ para fêmeas e sistema sexual do tipo ZZ/Z0, caracterizado pela ausência de um elemento de um par cromossômico no cariótipo das fêmeas. Há também algumas espécies sem diferenciação cromossômica sexual, como é o caso das espécies *E. limbata* e *E. microstoma*, onde Araya-Jaime et al. (2022) descreveram número diploide de $2n=38$ para ambas espécies.

Em espécies de peixes com alta variabilidade cromossômica, o mapeamento cromossômico de diferentes sequências de DNAs, regiões heterocromáticas, genes ribossômicos e DNA repetitivos são de grande importância para a compreensão evolutiva do genoma e melhor diferenciação cariotípica. As sequências de DNA repetitivo compõem uma grande porção do genoma de eucariotos (Charlesworth et al. 1994; Richard et al. 2008) e diferem em relação ao comprimento e sequência nucleotídica. Podem ser classificadas como repetições em tandem, onde estão incluídos os satélites (DNA altamente repetitivo), minissatélites e microssatélites (DNA moderadamente repetitivo) (Charlesworth et al. 1994; Rao et al. 2010), e algumas famílias multigênicas (Nei e Rooney 2005; Farah 2007). E repetições dispersas, com a capacidade de se replicar e inserir em diferentes locais no genoma. Essas repetições dispersas são compostas por transposons, em que a transposição é mediada por moléculas de DNA ou transposons de DNA, e retrotransposons, que se movem através de intermediários de RNA (Kidwell 2002; Jurka 2008).

Os DNAs satélites são sequências repetitivas que apresentam grandes arranjos e são o principal componente da heterocromatina, que é encontrada geralmente nas regiões centroméricas, pericentroméricas e subteloméricas dos cromossomos. Essas regiões heterocromáticas também podem ser encontradas em cromossomos diferenciados, como os cromossomos sexuais heteromórficos, supranumerários ou em regiões específicas de um determinado cromossomo (Garrido-Ramos 2017; Crepaldi e Parise-Maltempo 2020). Vicari et al. (2010) trouxeram um compilado de análises de DNA satélites em peixes neotropicais demonstrando o papel fundamental que essas sequências tem na diferenciação e evolução cariotípica dos organismos. Também já foram relatados a presença de sequências repetitivas em regiões eucromáticas do genoma, porém esses arranjos são mais curtos, denominados de micro ou minissatélites (Kuhn 2015; Garrido-Ramos 2017; Utsunomia et al. 2019). Os microssatélites são marcadores muito importantes e têm sido amplamente utilizados para demonstrar as diversificações cromossômicas em vários grupos de animais, como répteis, aves, peixes e plantas (Cioffi et al. 2011^a; Terencio et al. 2013; Yano et al. 2014; Scacchetti et al. 2015; Schneider et al. 2015; Piscor e Parise-Maltempo 2016), assim como para analisar características evolutivas dos cromossomos sexuais em diversas espécies (Cioffi et al. 2011^a; Pokorná et al. 2011; Poltronieri et al. 2014; Hobza et al. 2015; Matsubara et al. 2016).

Além da complexidade taxonômica, as divergências cromossômicas interpopulacionais denotam que *Eigenmannia* constitui um excelente modelo para estudos citogenéticos, cujos dados podem auxiliar na delimitação das espécies e/ou populações. Assim, o presente estudo tem por objetivo ampliar os dados cariotípicos em uma população de *E. virescens* da bacia do rio Paraná, previamente analisada por Fernandes et al. (2019), através do mapeamento de sequências repetitivas como os microssatélites fornecendo subsídios sobre a organização do genoma desta espécie.

Materiais e Métodos

Amostras biológicas

Um total de 4 indivíduos (2 machos e 2 fêmeas) de *Eigenmannia virescens* foram coletados no córrego Dourado (23°51'04,9"S / 54°25'13,9"W), afluente do rio Iguatemi, pertencente a bacia do Alto rio Paraná, no extremo sul do estado do Mato Grosso do Sul, região de Mundo Novo-MS. A coleta foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, através do Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBIO) que concedeu a licença número 64619. Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (número 023/2018). Os espécimes foram depositados na coleção de peixes do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA) da Universidade Estadual de Maringá - PR, sob o número NUP 19916.

Obtenção das preparações cromossômicas

As preparações cromossômicas foram realizadas na Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul pelo Dr. Carlos Alexandre Fernandes utilizando a metodologia descrita em Bertollo et al. (2015), e as suspensões celulares foram gentilmente cedidas para mapeamento das sequências repetitivas neste estudo.

Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Para o mapeamento físico com sondas de DNA microssatélite (GATA)₈ e (CGC)₁₀, foram utilizadas sondas oligonucleotídicas adquiridas comercialmente e marcadas diretamente com fluorocromo Cy5 na extremidade 5' durante a síntese (Sigma Aldrich), foi realizado pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) de acordo com o protocolo de Kubat et al. (2008). A captura das imagens foi realizada através do microscópio de fluorescência modelo Olympus BX-51. Para a montagem dos cariótipos, os cromossomos foram pareados em grupos de: metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntrico (a) conforme Levan et al. (1964).

Resultados

Eigenmannia virescens apresentou $2n=38$ cromossomos compostos de $6m+10sm+4st+18a$ (machos) e $5m+11sm+4st+18a$ (fêmeas), esta diferença se deve a presença de cromossomos sexuais, sistema ZZ/ZW como descrito por Fernandes et al. (2019) (Fig. 1).

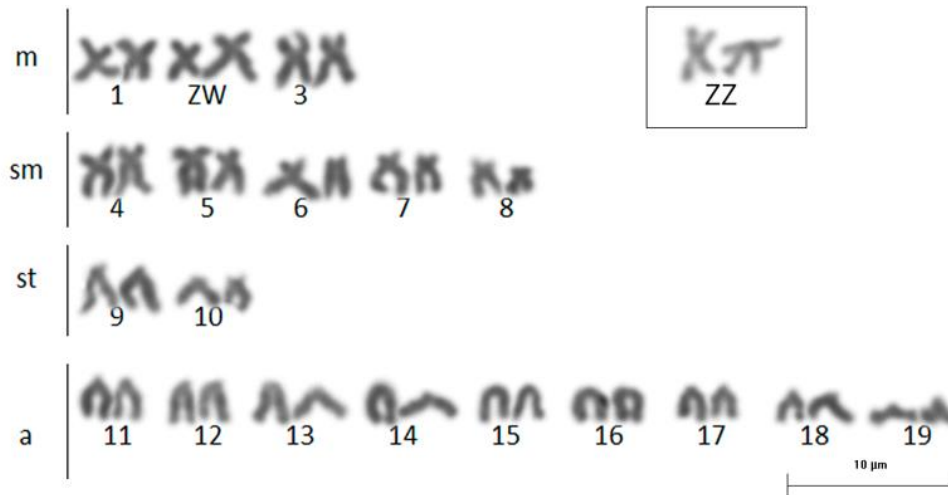


Figura 1. Cariótipo de *Eigenmannia virescens* (fêmea) após coloração convencional com Giemsa, *in box* cromossomo sexual macho (ZZ).

O padrão de distribuição do microssatélite (GATA)₈ para os indivíduos de *Eigenmannia virescens*, demonstra marcações ao longo de todos os cromossomos, destacando-se blocos em posições terminais e/ou subterminais e intersticiais nos pares 4, 5, 9, 11, 14, 17, 19 e nos cromossomos sexuais Z e W. Não foram evidenciadas marcações (GATA)₈ nas regiões centroméricas. As marcações para este microssatélite coincidiram com a heterocromatina identificada pela técnica de banda-C (Fernandes et al. 2019) em alguns cromossomos como nos pares 3, 8, 11, 17 e 19 e o cromossomo sexual W. Algumas regiões eucromáticas também apresentaram marcações positivas para o microssatélite (Fig. 2).

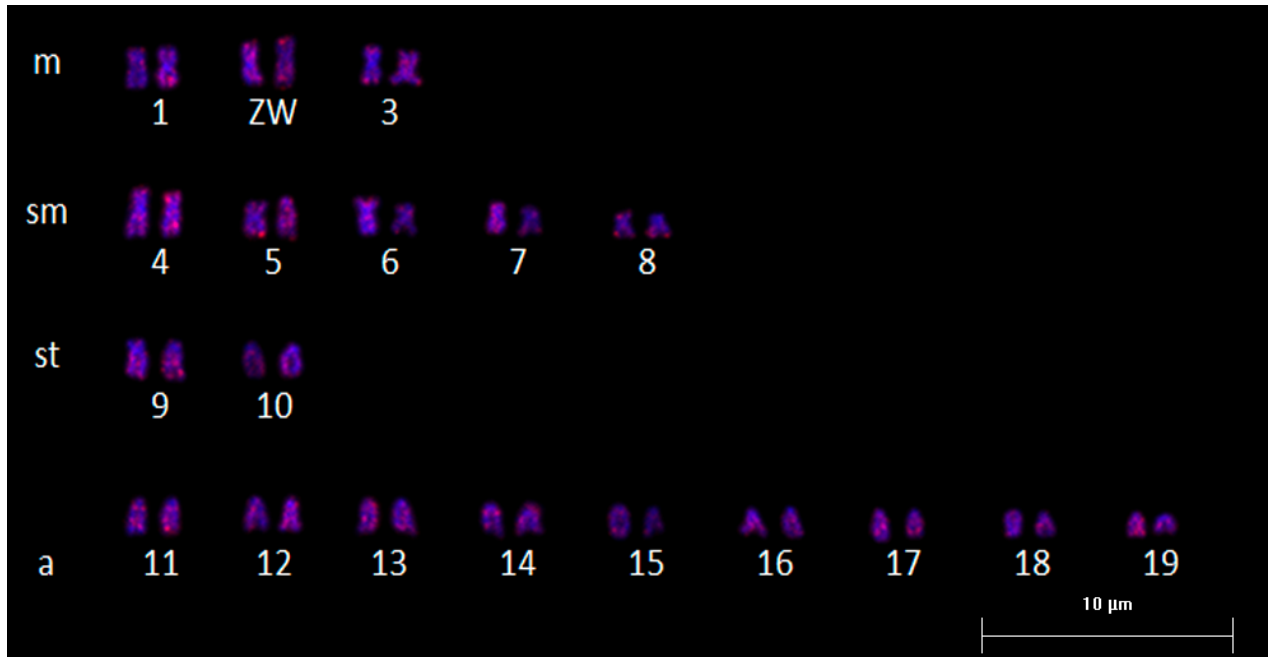


Figura 2. Hibridização fluorescente *in situ* com sonda de DNA microssatélite (GATA)₈ (sinais vermelhos) em *Eigenmannia virescens* do córrego Dourado (bacia do Alto rio Paraná,MS). Os cromossomos foram contrastados com DAPI.

O sinal de hibridização da sequência (CGC)₁₀ foi evidenciado como uma marcação conspícua em posição terminal do braço curto no par 15 (Fig. 3). Este par apresenta uma constrição secundária ao longo do braço curto coincidente com as regiões positivas para Ag-NOR/FISH 18S (Fernandes et al. 2019). Os demais cromossomos, incluindo os sexuais, não apresentaram marcações.

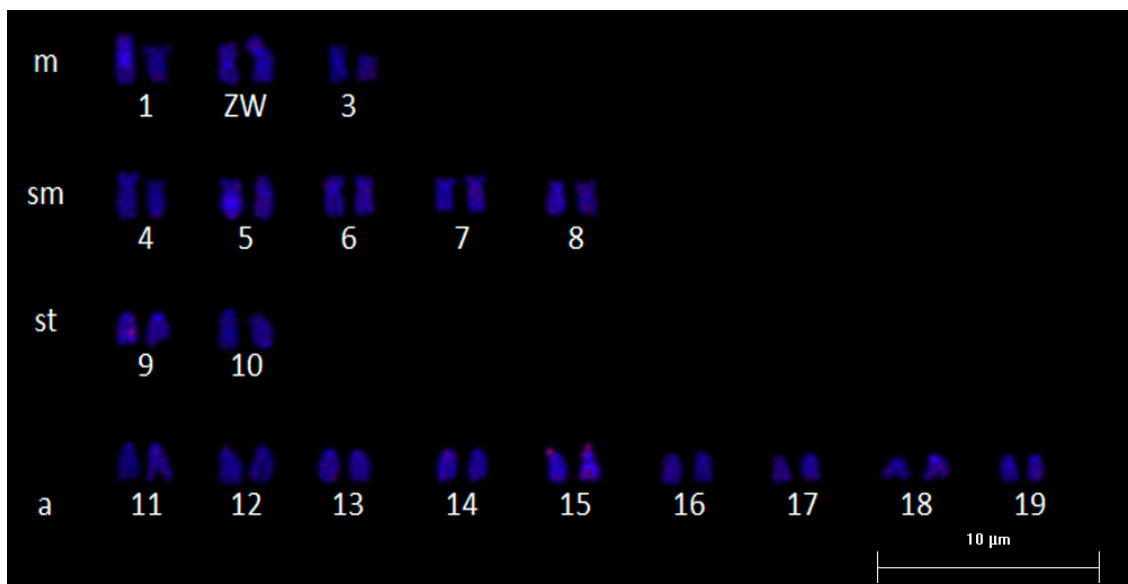


Figura 3. Hibridização fluorescente *in situ* usando sondas de DNA microssatélite (CGC)₁₀ (sinais vermelhos) em *Eigenmannia virescens* do córrego Dourado (bacia do Alto rio Paraná,MS). Os cromossomos foram contrastados com DAPI.

Discussão

Em *Eigenmannia virescens*, a heterocromatina é encontrada preferencialmente em regiões pericentroméricas (Almeida-Toledo et al. 2001, 2002; Silva et al. 2009; Sene et al. 2014), contudo, as marcações do microssatélite (GATA)₈ não foram coincidentes com essas regiões, mas foram evidenciadas em regiões terminais, subterminais e intersticiais em alguns autossomos e no cromossomo sexual W, sendo consistentes com estudos anteriormente realizados, que demonstram que as sequências microssatélites geralmente ficam localizadas em regiões que são compostas por porções significativas de heterocromatina no genoma de peixes, como os telômeros, centrômeros e cromossomos sexuais (Martins 2007; Cioffi e Bertollo 2012; Garrido-Ramos 2017; Crepaldi e Parise-Maltempi 2020).

As marcações dispersas pelo genoma são padrões de distribuição recorrentes ao se tratar da sequência (GATA)_n e podem ocorrer devido à rearranjos cromossômicos como translocações, inversões, fusões, fissões, duplicações ou deleções (Traldi et al. 2013). Nossos dados coincidem com diversos estudos realizados com diferentes espécies de peixes, considerando que as marcações se apresentam como vários blocos ao longo das cromátides. Barbosa et al. (2017) em um estudo com populações de *Astyanax scabripinnis*, verificaram um padrão de microssatélites discretamente disperso no genoma, além de um acúmulo de (GATA)_n em regiões terminais e intersticiais dos cromossomos. Em espécies de *Hypostomus*, Traldi et al. (2013) encontraram também um padrão disperso com pequenos acúmulos nas porções intersticiais e terminais dos cromossomos. Úbeda-Manzanaro et al. (2010) relataram o padrão disperso em quatro espécies da família Batrachoididae (*Amphichthys cryptocentrus*, *Batrachoides manglae*, *Porichthys plectrodon* e *Thalassophryne maculosa*), sendo sugerido, segundo os autores, que essa sequência não seria apropriada para utilização como marcador cromossômico por apresentar essa ampla distribuição pelo genoma. Em contraste, em uma espécie também da família Batrachoididae (*Halobatrachus didactylus*), a hibridização desse microssatélite foi claramente visualizada em apenas um par de cromossomos (Merlo et al. 2007). Ainda, Piscor e Parise-Maltempi (2016) observaram marcações conspícuas de (GATA)₈ em quatro espécies do gênero *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. marionae*, *A. fasciatus* e *A. schubarti*) em associação com regiões de DNAr 5S. Essa divergência

no padrão de distribuição demonstra que as repetições (GATA)_n podem atuar como bons marcadores cromossômicos para determinadas espécies. Embora para a espécie analisada no presente estudo a distribuição dispersa destas sequências não constituam bons marcadores cromossômicos, elas podem apresentar alguma função importante no genoma da espécie sendo uma referência para futuros estudos comparativos neste grupo.

As sequências (GATA)_n compõem um DNA satélite denominado *Bkm* (*Banded krait minor*) isolado do cromossomo sexual W do réptil *Elaphe radiata* (Eppelen et al. 1982). Estudos apontam uma ligação entre essas sequências que são altamente conservadas em eucariotos, com a evolução e diferenciação dos cromossomos sexuais, segundo Jones e Singh (1985), as sequências *Bkm* têm a característica de se acumular em cromossomos sexuais Y e W (Singh et al. 1984; Subramanian et al. 2003). No presente estudo, os cromossomos Z e W mostraram um acúmulo da sequência (GATA)₈. Uma hipótese para essa distribuição no genoma de peixes, tanto em autossomos como em cromossomos sexuais, seria de que com a evolução, as sequências (GATA)_n estariam se acumulando cada vez mais no genoma dos organismos e atuando na regulação de genes através da reorganização da cromatina e também em rearranjos cromossômicos (Subramanian et al. 2003). O cromossomo W de *E. virescens* apresentou uma heterocromatina terminal no braço curto (Fernandes et al. 2019) que coincide com a sequência do microssatélite (GATA)₈ nas regiões teloméricas, isso denota que na composição da heterocromatina presente nestas regiões, ocorre a presença desse microssatélite, dentre outras sequências que também possam estar presentes nessas posições. Em diferentes populações de *E. virescens*, portadoras de sistemas ZZ/ZW (onde o cromossomo Z é acrocêntrico e o W submetacêntrico) pertencentes às bacias Amazônica e do rio São Francisco, a heterocromatina foi evidenciada predominantemente nas regiões centroméricas ou pericentroméricas de todos os cromossomos, mas grandes blocos heterocromáticos destacaram-se nos cromossomos W destas populações sugerindo que rearranjos cromossômicos, como por exemplo, inversões pericêntricas e adição de heterocromatina contribuíram para diferenciação dos cromossomos sexuais (Almeida-Toledo et al. 2002; Silva et al. 2009). Na população do presente estudo, os cromossomos sexuais ZW apresentaram heterocromatina localizada nas regiões centroméricas e uma fraca marcação na posição terminal do cromossomo W

(Fernandes et al. 2019) sugerindo possivelmente, uma origem mais recente deste mecanismo.

Vários estudos anteriores envolvendo outras espécies mostraram um maior acúmulo de microssatélites nas áreas heterocromáticas do cromossomo sexual (Cioffi et al. 2011b), como foram analisadas nas espécies de peixes do gênero *Leporinus*, em que os microssatélites utilizados se acumularam principalmente no cromossomo W (Cioffi et al. 2012; Poltronieri et al. 2014). Em espécies do gênero *Characidium*, Scacchetti et al. (2015) observaram padrões distintos de distribuição de vários microssatélites nos cromossomos Z e W das espécies analisadas, entretanto, a espécie *C. gomesi* chamou atenção pela forte marcação no cromossomo sexual W pelo microssatélite (TTA)₁₀. Contudo, em algumas espécies que possuem cromossomos sexuais, como *Ephestia kuehniella* (Traut 1987), *Ictalurus punctatus* (Tiersch et al. 1992) e *Haemopsis sanguisuga* (Vitturi et al. 2002), não foi observada uma distribuição sexo-específica da sequência (GATA)_n, sugerindo que não há uma associação direta dos cromossomos sexuais com as repetições (GATA)_n em espécies de diferentes grupos.

A sequência (CGC)₁₀ identificada neste estudo em um par de cromossomos portador da região de DNAr 18S conforme analisada anteriormente (Fernandes et al. 2019), apresenta similaridade com alguns trabalhos que identificaram a colocação de diferentes tipos de microssatélites com famílias multigênicas, e que são bastante comuns em diversos organismos. Ruiz-Ruano et al. (2014) observaram essa associação no genoma de duas espécies de gafanhotos (*Eyprepocnemis plorans* e *Locusta migratoria*) ao utilizar sondas de genes de histonas H3. Em peixes, Schneider et al. (2015) identificaram essa mesma relação entre o microssatélite (GT)₁₃ com a região de DNAr 18S na espécie *Pterophyllum scalare*. A sequência (CG)₁₅ também se mostrou coincidente com a região de DNAr 18S do cromossomo sexual W da espécie *Characidium timbuiense* (Scacchetti et al. 2015). Em espécies do gênero *Gymnotus*, Utsonomia et al. (2014, 2018) chegaram à conclusão que regiões ricas em sequências (A)₃₀ teriam associação com o snRNA U2, enquanto os motivos (GC)₁₅ apresentavam marcações conspícuas nas mesmas regiões de DNAr 45S. Os dados obtidos no presente estudo podem estar relacionados à associação entre repetições de microssatélites com espaçadores de famílias multigênicas. Merlo et al. (2010)

descreveram em espécies de peixes da família Moronidae (*Dicentrarchus labrax* e *Dicentrarchus punctatus*), um conteúdo de GC correspondente a aproximadamente 65,71% na região ITS1 (espaçador transcrito interno localizado entre os genes ribossômicos 18S e 5.8S). Em outro estudo realizado com uma grande variedade de animais marinhos, análises mostraram que o conteúdo de GC em vertebrados estaria em torno de 56,8% a 78% nas sequências ITS1 (Chow et al. 2009). A colocação de sinais de hibridização do microsatélite (CGC)₁₀ em posição telomérica do braço curto do par 15 de *E. virescens*, o qual é o portador de sítios DNAr 18S (Fernandes et al. 2019), corrobora a hipótese de associação de repetições microsatélites em famílias multigênicas como discutido acima.

Conclusões

Os microsatélites são um dos componentes mais dinâmicos presentes no genoma, e um melhor entendimento de sua organização cromossômica é importante para compreender o papel desses elementos repetitivos de DNA nos mecanismos da evolução cromossômica. Os resultados obtidos com a sequência repetitiva (GATA)₈ podem fornecer alguns dados úteis no estudo da filogenia no gênero *Eigenmannia*, e contribuir para um melhor entendimento da organização e distribuição dessas sequências. A organização compartimentada da sequência (CGC)₁₀ em um par de cromossomos denota uma possível ligação do microsatélite com famílias multigênicas, principalmente em genes ribossômicos e de histonas, revelando que algumas características ainda têm sido conservadas. Os resultados obtidos no presente estudo fornecem uma direção para futuras pesquisas e contribuem com informações relevantes a respeito desses marcadores cromossômicos na espécie *E. virescens*.

Agradecimentos

À agência brasileira CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) pelo apoio financeiro da pesquisa - Código de Financiamento 001, à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelo suporte logístico e experimental e ao Dr. Weferson Junior da Graça da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela identificação taxonômica dos espécimes.

Referências

- Almeida-Toledo LFD, Foresti F, Almeida-Toledo SD (1981) Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region in the knifefish, *Apteronotus albifrons* (Pisces, Apterontidae). *Experientia* 37(9): 953-954.
- Almeida-Toledo LF, Foresti H, Almeida-Toledo Filho S (1984) Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). *Genetica* 64(3): 165-169.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Almeida-Toledo Filho S (1985) Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Sternopygidae) from the Amazon basin. *Genetica* 66: 85-88.
- Almeida-Toledo LF, Stocker AJ, Foresti F, Almeida-Toledo Filho S (1996) Fluorescence in situ hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chromosome Research* 4(4): 301-305.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Almeida-Toledo Filho S (2000) Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma* 109(3): 197-200.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Péquignot EV, Daniel-Silva MFZ (2001) XX:XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the Neotropic electric eel *Eigenmannia virescens*. *Cytogenetic and Genome Research* 95(1-2): 73-78.
- Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MFZ, Moysés CB, Fonteles SBA, Lopes CE, Akama A, Foresti F (2002) Chromosome evolution in fish: sex chromosome variability in *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes: Sternopygidae). *Cytogenetic and genome research* 99(1-4): 164-169.
- Alves-Gomes J (2001) The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective. *Journal of Fish Biology* 58: 1489-1511. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2001.1625>
- Araya-Jaime C, Mateussi NTB, Utsonomia R, Costa-Silva GJ, Oliveira C, Foresti F (2017) ZZ/Z0: the new system of sex chromosomes in *Eigenmannia aff. trilineata* (Teleostei: Gymnotiformes: Sternopygidae) characterized by molecular cytogenetics and DNA barcoding. *Zebrafish* 14(5): 464-470.
- Araya-Jaime CA, Silva DMZDA, Da Silva LRR, Do Nascimento CN, Oliveira C, Foresti F (2022) Karyotype description and comparative chromosomal mapping of rDNA and U2 snDNA sequences in *Eigenmannia limbata* and *E. microstoma* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). *Comparative Cytogenetics* 16(2): 127-142.
- Barbosa P, Leal EV, Silva MD, Almeida MCD, Moreira-Filho O, Artoni RF (2017) Variability and evolutionary implications of repetitive DNA dynamics in genome of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Comp Cytogenet* 11(1): 143-162.

- Bertollo LAC, Cioffi M, Moreira Filho O (2015) Direct Chromosome Preparation From Freshwater Teleost Fishes; In: Fish Cytogenetic. Technique. Editors, Ozouf-Costa C, Pisano E, Foresti F and Almeida-Toledo LF. Taylor & Francis Group, LLC (e-book), <https://doi.org/10.1201/b18534-4>.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220. <https://doi.org/10.1038/371215a0>
- Chow S, Ueno Y, Toyokawa M, Oohara I, Takeyama H (2009) Preliminary analysis of length and GC content variation in the ribosomal first internal transcribed spacer (ITS1) of marine animals. *Marine Biotechnology* 11(3): 301-306.
- Cioffi MDB, Bertollo LAC (2012) Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. *Repetitive DNA* 7: 197-221.
- Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC (2011)a Repetitive DNAs and differentiation of sex chromosomes in neotropical fishes. *Cytogenetic and Genome Research* 132(3): 188-194.
- Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC (2011)b The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 132(4): 289-296.
- Cioffi MDB, Kejnovský E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D, Bertollo LAC (2012) The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Molecular cytogenetics* 5(1): 1-7.
- Crepaldi C, Parise-Maltempo PP (2020) Heteromorphic sex chromosomes and their DNA content in fish: an insight through satellite DNA accumulation in *Megaleporinus elongatus*. *Cytogenetic and Genome Research* 160(1): 38-46.
- Eppelen JT, McCarrey JR, Sutou S, Ohno S (1982) Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79(12): 3798-3802.
- Farah SB (2007) Decifrando o genoma humano. DNA Segredos e Mistérios. 2ª ed. Indianópolis: Sarvier 55-202.
- Fernandes CA, Bailly D, Da Silva VFB, Martins-Santos IC (2010) System of multiple sex chromosomes in *Eigenmannia trilineata* López & Castello, 1966 (Sternopygidae, Gymnotiformes) from Iguatemi River Basin, MS, Brazil. *Cytologia* 75(4): 463-466.
- Fernandes CA, Curiel MH, Paiz LM, Baumgärtner L, Piscor D, Margarido VP (2019) A novel ZZ/ZW chromosome morphology type in *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes: Sternopygidae) from upper Paraná River basin. *Biologia* 75(10): 1563-1569.
- Ferraris CJ, Santana CD, Vari RP (2017) Checklist of Gymnotiformes (Osteichthyes: Ostariophysi) and catalogue of primary types. *Neotropical Ichthyology* 15.

Foresti F, Almeida-Toledo LFD, Almeida-Toledo Filho S (1984) Chromosome studies in *Gymnotus carapo* and *Gymnotus sp.* (Pisces, Gymnotidae). *Caryologia* 37(1-2): 141-146.

Garrido-Ramos M (2017) Satellite DNA: An Evolving Topic. *Genes* 8(9): 230. doi:10.3390/genes8090230

Graça WJ, Pavanelli CS (2007) Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Eduem, Maringá, 114.

Hobza R, Kubat Z, Cegan R, Jesionek W, Vyskot B, Kejnovsky E (2015) Impact of repetitive DNA on sex chromosome evolution in plants. *Chromosome Research* 23(3): 561-570.

Jones KW, Singh L (1985) Snakes and evolution of sex chromosomes. *Trends Genet* 1: 55-61.

Jurka J (2008) Conserved eukaryotic transposable elements and the evolution of gene regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(2): 201.

Kidwell MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115(1): 49-63.

Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E (2008) Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome* 51: 350-356. doi: 10.1139/G08-024.

Kuhn G (2015) Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*. *Heredity* 115: 1-2. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.12>

Lavoué S, Miya M, Arnegard ME, Sullivan JP, Hopkins CD, Nishida M (2012) Comparable Ages for the Independent Origins of Electrogenesis in African and South American Weakly Electric Fishes. Murphy WJ (Ed.). *PLoS ONE* 7: e36287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036287>

Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52(2): 201-220. doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x

Martins C (2007) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Enfield, 421-453.

Matsubara K, O'Meally D, Azad B, Georges A, Sarre SD, Graves JAM, Ezaz T (2016) Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in *Sauropsida*. *Chromosoma* 125(1): 111-123. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0531-Z>

Mendes VP, Brito Portela-Castro ALD, Júlio-Júnior HF (2012) First record of supernumerary (B) chromosomes in electric fish (Gymnotiformes) and the karyotype structure of three species of the same order from the upper Paraná River basin. *Comparative Cytogenetics* 6(1): 1.

Merlo A, Cross I, Palazón JL, Sarasquete C, Rebordinos L (2007) Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes (GATA)_n and (TTAGGG)_n by one-color and double-color FISH in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Teleostei: Batrachoididae). *Genetica* 131(2): 195-200.

Merlo MA, Cross I, Chairi H, Manchado M, Rebordinos L (2010) Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. *Genes & Genetics Systems* 85: 341-349.

Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics* 39: 121-152.

Piscor D, Parise-Maltempi PP (2016) Microsatellite organization in the B chromosome and A chromosome complements in *Astyanax* (Characiformes, Characidae) species. *Cytogenetic and Genome Research* 148: 45-51.

Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E (2011) Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC genetics* 12(1): 1-7.

Poltronieri J, Marquioni V, Bertollo LAC, Kejnovsky E, Molina WF, Liehr T, Cioffi MB (2014) Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 142(1): 40-45.

Rao SR, Trivedi S, Emmanuel D, Merita K, Hynniewta M (2010) DNA repetitive sequences-types, distribution and function: a review. *J Cell Mol Biol* 7(2): 1-11.

Reis RBD, Frota A, Depra GDC, Ota RR, Graca WJD (2020) Freshwater fishes from Paraná State, Brazil: an annotated list, with comments on biogeographic patterns, threats, and future perspectives. *Zootaxa* 4868(4): 451-494.

Richard GF, Kerrest A, Dujon B (2008) Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews* 72(4): 686-727. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00011-08>

Ruiz-Ruano FJ, Cuadrado Á, Montiel EE, Camacho JPM, López-León MD (2014) Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma* 124(2): 221-234.

Scacchetti PC, Utsonomia R, Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira CG, Foresti F (2015) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei,

Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 146: 136-143.

Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, De Tavares ÉSGM, Martins C, Feldberg E (2015) Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genome (Pisces, Cichlidae). *Comp Cytogenet* 9: 595.

Sene V, Pansonato-Alves J, Utsonomia R, Oliveira C, Foresti F (2014) Karyotype diversity and patterns of chromosomal evolution in *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). *Comparative Cytogenetics* 8(4): 301-311.

Silva DS, Milhomem SS, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2009) Cytogenetic studies in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. *BMC genetics* 10(1): 1-8.

Silva DS, Peixoto LA, Pieczarka JC, Wosiacki WB, Ready JS, Nagamachi CY (2015) Karyotypic and morphological divergence between two cryptic species of *Eigenmannia* in the Amazon basin with a new occurrence of XX/XY sex chromosomes (Gymnotiformes: Sternopygidae). *Neotropical Ichthyology* 13: 297-308.

Singh L, Phillips C, Jones KW (1984) The conserved nucleotide sequences of Bkm, which define Sxr in the mouse, are transcribed. *Cell* 36: 111-120.

Subramanian S, Mishra RK, Singh L (2003) Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. *Bioinf Discov Note* 19: 681-685.

Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Vicari MR, Farias IP, Passos KB, Feldberg E (2013) Evolutionary dynamics of repetitive DNA and sex chromosomes: *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) as a model. *Sexual Development* 7: 325-333. doi: [10.1159/000356691](https://doi.org/10.1159/000356691)

Tiersch TR, Simco BA, Davis KB, Wachtel SS (1992) Molecular genetics of sex determination in a channel catfish: studies on SRY, XFY, Bkm and human telomeric repeats. *Biol Reprod* 47: 185-192.

Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JDF, Lui RL, Artoni RF, Moreira-Filho O (2013) Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). *Journal of genetics* 92(1): 127-130.

Traut W (1987) Hypervariable Bkm DNA loci in a moth *Ephesia kuehniella*: does transposition cause restriction fragment length polymorphism? *Genetics* 115: 112-118.

Úbeda-Manzanaro M, Merlo MA, Palazón JL, Cross I, Sarasquete C, Rebordinos L (2010) Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica* 138(7): 787-794.

Utsonomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2014) Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus*

species (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. *Cytogenetic and genome research* 142(4): 286-292.

Utsunomia R, Melo S, Scacchetti PC, Oliveira C, Machado MDA, Pieczarka JC, Foresti F (2018) Particular chromosomal distribution of microsatellites in five species of the genus *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes). *Zebrafish* 15(4): 398-403.

Utsunomia R, Silva DMZDA, Ruiz-Ruano FJ, Goes CAG, Melo S, Ramos LP, Hashimoto DT (2019) Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. *Scientific reports* 9(1): 1-10.

Vicari MR, Nogaroto V, Noletto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Artoni RF (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology* 76(5): 1094-1116.

Vitturi R, Libertini A, Armetta F, Sparacino L, Colomba MS (2002) Chromosome analysis and FISH mapping of ribosomal DNA (rDNA), telomeric/TTAGGG)n and (GATA)n repeats in the leech *Haemopsis sanguisuga* (L.) (Annelida: Hirudinea). *Genetica* 115: 189-194.

Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB (2014) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. *PLoS One* 9(3): e90946.