



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
E BIOLOGIA MOLECULAR

**Dinâmica cromossômica evolutiva no gênero *Gymnotus***

MILLA DE ANDRADE MACHADO

Belém - PA

Nov-2022

MILLA DE ANDRADE MACHADO

**Dinâmica cromossômica evolutiva no gênero *Gymnotus***

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi

Belém - PA

Nov-2022

Este trabalho foi desenvolvido no “Laboratório de Citogenética” do Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade (CEABIO), da Universidade Federal do Pará (UFPA), sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cleusa Yoshiko Nagamachi, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Pará (FAPESPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), o qual forneceu a bolsa.

Dedico este trabalho aos meus pais Regina e Samuel.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, que nunca mediram esforços para me dar todas as oportunidades de realizar meus sonhos, e me ensinaram a importância da educação e de trabalhar pelos meus sonhos, por todo o amor. Ao meu irmão que sempre foi meu amigo por toda uma vida, pela nossa eterna bagunça, pelos puxões de orelha mútuos, e pelo apoio e que aumentou a nossa família com os anjinhos que são minha paixão e que me trazem alegria. A toda minha família, cheia de amor e suporte e apoio.

Queria agradecer a minha orientadora, Cleusa Nagamachi, por me acompanhar em toda minha jornada acadêmica, por acreditar em mim, pela paciência e por nunca desistir mesmo quando estive em momentos difíceis. Ao professor Julio pelo apoio e dedicação ao laboratório, além de todas as risadas. A toda a equipe técnica do Labcito, com muito carinho pelo seu Jorge, Shirley e dona Conci, por tornarem possível o trabalho de todos no laboratório. A todos no Labcito por esses anos maravilhosos, e difíceis e turbulentos que passamos juntos. Um carinho muito especial à equipe de peixes pela colaboração e pelo trabalho em equipe em especial à Ananda: minha irmã para todas as horas, de trabalho, de aventuras, de diversão e de comida.

Todos os meus amigos, longe ou perto, que apoiaram das mais variadas formas.

A Universidade Federal do Pará e ao PPGBM pela formação acadêmica.

À Universidade de Cambridge pela contribuição científica.

Ao Laboratório de Citogenética Animal pela estrutura física.

Ao IBAMA pela licença para a coleta do material de estudo.

Aos órgãos financiadores: CNPq , FAPESPA, CAPES, FAPEAM

E, à todas as pessoas envolvidas nessa grande aventura: Obrigada.

"Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade." - Marie Curie

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	8
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
1- INTRODUÇÃO .....	11
1.1- Considerações gerais sobre a ordem Gymnotiformes.....	11
<b>1.2- A família Gymnotidae</b> .....	12
<b>1.2-1. Filogenia atual em Gymnotidae</b> .....	14
<b>1.3- Abordagens citogenéticas</b> .....	17
<b>1.3-1. Sequencias repetitivas</b> .....	18
<b>1.3-2. FISH e Pintura cromossômica</b> .....	18
<b>1.4- Citogenética na família Gymnotidae</b> .....	19
<b>1.4-1. Estudos de DNA repetitivo no gênero <i>Gymnotus</i></b> .....	21
<b>1.4-2. Pintura cromossômica na família Gymnotidae</b> .....	22
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	26
<b>2.1- Objetivo Geral</b> .....	26
<b>2.2- Objetivos Específicos</b> .....	26
<b>3- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>3.1- Capítulo 1 – <i>Gymnotus Catalão</i></b> .....	28
<b>3.2- Capítulo 2 – <i>Gymnotus pantanal</i></b> .....	38
<b>3.3- Capítulo 3 – Sequências repetitivas</b> .....	46
<b>4- CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	50
<b>5- REFERENCIAS</b> .....	54
ANEXO I .....	63

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 A- Figura representativa do campo eletrostático gerado pelos Gymnotiformes. (Fonte: Krahe, 2004. Nature Reviews Neuroscience.) B- Órgão elétrico na espécie <i>Gymnotus maumiraua</i> (Fonte: Crampton et al. 2006).....	11
Figura 2: Distribuição dos Gymnotiformes (Campos-da-Paz and Albert, 1998).....	12
Figura 3:Imagem adaptada de De Santana et al. (2019). A - Distribuição geográfica dos espécimes analisados. B- relação filogenética. ....	14
Figura 4: Hipótese filogenética do gênero <i>Gymnotus</i> baseada no conjunto de dados analisados por Craig et al. (2019) dividindo o gênero em 6 subgêneros. ....	16
Figura 5: Uma rede de interação ilustrativa entre diferentes campos da ciência básica e aplicada, tendo a citogenética como núcleo de dados de suporte direto ou indireto para cada uma das diferentes abordagens representadas. Adaptado de Cioffi et al., 2018. ....	17
Figura 6: Coloração convencional, Banda C, Ag-NOR e espécimes de a- <i>G. capanema</i> e, b – <i>G. mamairaua</i> , ilustrando a grande variação cromossômica encontrada no gênero. Imagem adaptada de Milhomen et al., 2007 e 2012.....	20
Figura 7: Cariótipo de fluxo mostrando 4 Regiões: R1, R2 com 3 subregiões (S2A, S2B, S2C), R3 com 4 subregiões (S3A, S3B, S3C, S3D) e R4 com 4 subregiões (S4A, S4B, S4C, S4D). Abaixo: Cariótipo de <i>G. carapo</i> sensu stricto: citótipo com $2n = 42$ . ....	24
Figura 8: Idiograma mostrando rearranjos cromossômicos observados por pintura cromossômica. R1, R2, R3 e R4 representam as cores das grandes regiões da sonda. A- Cariótipo de <i>G. carapo</i> $2n=42$ utilizado na produção das sondas de cromossomo total, cada cor identifica um cromossomo ou grupo de cromossomos não separáveis por pintura. B- Cariótipo de <i>G. carapo</i> $2n=40$ . C- Cariótipo de <i>G. capanema</i> . D- Cariótipo de <i>G. arapaima</i> . (Machado et al., 2018).....	25

### CAPÍTULO 3.2

Figura 1: Karyotype of GPT. A – With Dual color fish with probes of R3 (GCA 4–8 and 17–19; red) and R4 (GCA 9–15 and 21; green): Chromosome segments hybridizing with 2 colors indicated repetitive DNA sequences; Chromosomes or segments in blue (DAPI) represent the

NOR-bearing chromosomes (GCA20) and chromosomes corresponding to R2 (GCA 1–3 and 16). B- With DAPI: the numbers on the right represent the GCA equivalent chromosomes. C – NOR bearing chromosome pair GPT 16, hybridized with GCA20. ....44

Figure 2: Ideogram showing chromosome rearrangements obtained by WCP. R1, R2, R3 and R4 represent the colors of the four major regions of the GCA 2n=42 probes. A- *G. carapo* 2n=42 utilized in the production of the probes, each different color represents a chromosome or chromosome group. B- *G. carapo* 2n=40 (Nagamachi et al., 2010). C- *G. capanema* (Nagamachi et al., 2013). D- *G. arapaima*. (Machado et al., 2018). E- *G. carapo* “Catalão” (Machado et al., 2022) and F- *G. pantanal* (present study) ..... 46

### CAPITULO 3.3

Figura 1: Gel de agarose 1%. L- Ladder. 1, 2 e 3 aliquotas de DNA extraído de tecido de *G. carapo* "Catalão" .....49

Figura 2: Amplificação de elementos repetitivos de *Gymnotus carapo* “Catalão” em gel de agarose 2%. .....49

Figura 3: FISH em metáfases de *Gymnotus carapo* “Catalão” com sondas de A: GymSat-CL7; B: GymSat-CL14; C: GymSat-CL14; D: GymSat-CL34; E: GcaSat1; F: GcaSat1 .....50

### CONSIDERAÇÕES GERAIS

**Figura 1:** Árvore filogenética de Gymnotidae, adaptada de Craig et al., 2019. Foram representadas apenas as espécies que possuem dados citogenéticos na literatura .....51

**Figura 2:** Ideograma ilustrando as regiões de homeologias encontradas nas espécies de *Gymnotus* analisadas por pintura cromossômica. GCA42: *G. carapo* 2n=42 utilizado na produção das sondas, cada cor diferente representa um cromossomo ou grupo cromossômico. GCA40: *G. carapo* 2n=40 (Nagamachi et al., 2010). GCC40: *G. carapo occidentalis* “Catalão” (presente estudo). GAR44 *G. arapaima* (Machado et al., 2018). GCP34: *G.*

<i>capanema</i> (Nagamachi et al., 2013). GPT39/40: <i>G. pantanal</i> (presente estudo)	53
--	----

## ANEXO I

<b>Figura A1-</b> Ideogramas do cariótipo de <i>G. carapo</i> ( $2n = 42$ ). A: As quatro regiões cromossômicas (R1, R2, R3, R4) obtidas por Nagamachi <i>et al.</i> (2010). B–M: Experimentos de double-fish baseados em Nagamachi <i>et al.</i> (2010, 2013), para identificar homologia cromossômica com <i>G. carapo</i> ( $2n = 42$ )	64
--	----

**LISTA DE TABELAS****INTRODUÇÃO**

**Tabela 1-** Variação cromossômica no gênero *Gymnotus*.....20

**Tabela 2-** Sondas GCA 2n=42. ....23

**Tabela 3 -** FISH de duas cores para distinguir os pares cromossômicos das Regiões 2, 3 e 4.

**CAPÍTULO 3.1**

**Table 1-** Cytogenetic studies of *Gymnotus carapo*.....30

**CAPÍTULO 3.2**

**Tabela 1-** Resultados preliminares das sequências repetitivas

**ANEXO**

**Tabela A1-** FISH de duas cores para distinguir os pares cromossômicos das Regiões 2, 3 e 4.....64

## Dinâmica cromossômica evolutiva no gênero *Gymnotus*

### RESUMO

Gymnotidae é uma família de peixes elétricos pertencente à ordem Gymnotiformes, com distribuição extensa pela região neotropical. Com dois gêneros e 46 espécies validas, possui uma grande variação cariotípica e forte dinâmica cromossômica, sendo alvo de estudos cromossômicos, morfológicos e filogenéticos que tentam entender a relação das espécies nesse grupo e sua evolução. O número diploide em Gymnotidae varia de  $2n=34$  a  $2n=54$ , apresentando uma grande diversidade cariotípica. Estudos mais recentes de citogenética e análises moleculares mostram resultados importantes quanto à diversidade de sequências repetitivas e reorganização genômica no gênero. Esse estudo visa entender a dinâmica evolutiva do grupo através do mapeamento por pintura cromossômica dos cariótipos das espécies *Gymnotus carapo* “Catalão”, *G. pantanal* e da identificação, caracterização e mapeamento de sequências repetitivas obtidas a partir do sequenciamento genômico de *G. carapo* “Catalão”.

## **Evolutionary chromosomal dynamics in the genus *Gymnotus***

### **ABSTRACT**

Gymnotidae is a family of electric fish belonging to the order Gymnotiformes, with extensive distribution throughout the neotropical region. With two genera and 46 valid species, it has a large karyotype variation and intense chromosomal dynamics, being the target of chromosomal, morphological and phylogenetic studies to understand the relationship of the species in this group and their evolutionary pattern. The diploid number in Gymnotidae varies from  $2n = 34$  to  $2n = 54$ , presenting a great karyotype diversity. More recent studies of cytogenetics and molecular analyzes show important results regarding the diversity of repetitive sequences and genomic reorganization in the genus. This study aims to understand the evolutionary dynamics of the group through mapping by whole chromosome painting the karyotypes of the species *Gymnotus carapo* “Catalão” and *G. pantanal*, the identification, characterization and mapping of repetitive sequences obtained from the genomic sequencing of *G. carapo* “Catalão”.

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- Considerações gerais sobre a ordem Gymnotiformes

Os peixes elétricos pertencentes à ordem Gymnotiformes são popularmente conhecidos como tuvira, sarapó, ituí, poraquê, entre outros. Apresentam capacidade de gerar e utilizar campos elétricos produzidos em órgãos especializados, tanto para eletro-localização de objetos e outros organismos, quanto para a interação social. Estes são produzidos em órgãos especializados conhecidos como órgãos de descarga elétrica (Figura 1). As descargas elétricas são diferenciadas para cada espécie e utilizadas como um caráter para identificação taxonômica dentro do grupo (Albert and Crampton, 2001; Albert et al., 2005; Lovejoy et al., 2010).

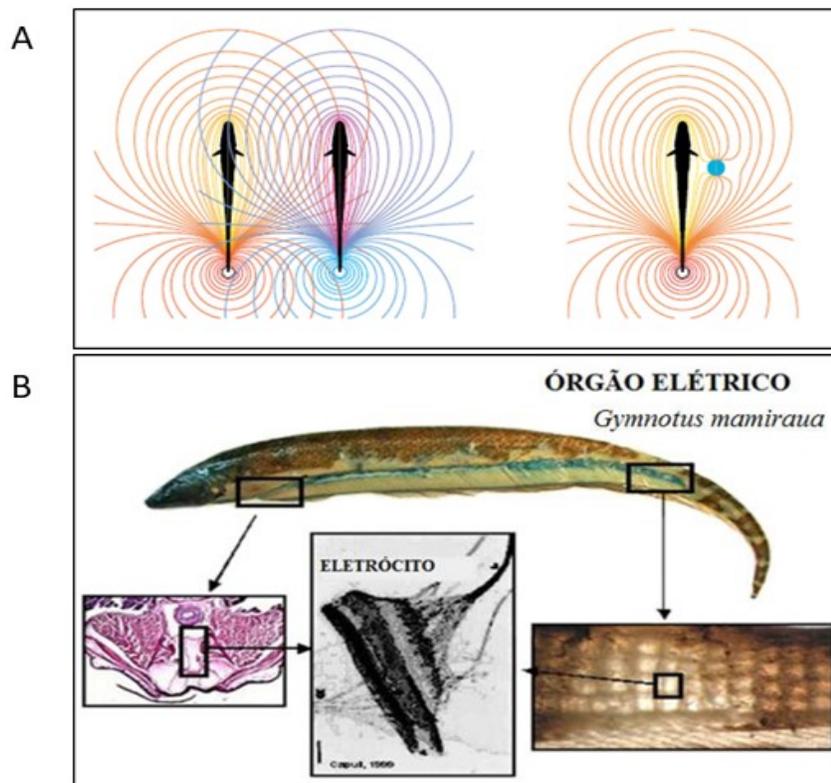


Figura 1: A- Figura representativa do campo eletrostático gerado pelos Gymnotiformes. (Fonte: Krahe, 2004. Nature Reviews Neuroscience.) B- Órgão elétrico na espécie *Gymnotus mamiraua* (Fonte: Crampton et al., 2006).

Os Gymnotiformes são morfologicamente diferenciados por possuírem o corpo delgado e comprimido (maioria das espécies) ou cilíndrico (Gymnotidae), nadadeira anal bastante

desenvolvida, com mais de 100 raios que lhes permitem nadar para frente e para trás através de movimentos ondulatórios, nadadeira caudal reduzida (Apteronotidae) ou ausente e ausência de nadadeira dorsal (Albert and Crampton, 2005).

Distribuem-se extensamente pela região Neotropical (Figura 2; Campos-da-Paz, 2003), com registros desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo que a maior diversidade de Gymnotiformes é encontrada na super-bacia Amazônica-Orinoco-Guianas (Mago-Leccia, 1994; Albert, 2001; Albert and Crampton, 2005).



Figura 2: Distribuição dos Gymnotiformes (Campos-da-Paz and Albert, 1998).

## 1.2- A família Gymnotidae

A família Gymnotidae é uma família de peixes elétricos pertencente à ordem Gymnotiformes, possuindo a mesma distribuição geográfica da ordem. A família é constituída por dois gêneros: *Gymnotus* e *Electrophorus*.

*Gymnotus* (Gymnotidae, Gymnotiformes) é um gênero monofilético (Albert et al., 2005; Lovejoy et al., 2010; Tagliacollo et al., 2016) com mais de 43 espécies formalmente descritas, sendo o mais especioso da ordem (Ferraris Jr. et al., 2017; Craig et al., 2018a, 2018b; Campos da Paz and de Santana, 2019). São facilmente distinguidos de outros Gymnotiformes por possuírem a boca voltada para cima, os olhos dispostos na posição lateral da cabeça e uma cavidade do corpo longa (Albert et al., 2005). A maioria das espécies de *Gymnotus* possuem faixas, com orientação oblíqua, intercaladas em bandas claras e escuras ao longo do corpo (Albert et al., 2005). *Gymnotus* é um grupo relativamente antigo com inúmeras espécies vivendo em assembleias simpátricas, constituídas por espécies não monofiléticas (Albert et al., 2005). Possui a distribuição mais ampla da ordem Gymnotiformes, com prevalência na bacia Amazônica, com diversas espécies vivendo em assembleias simpátricas, constituídas por espécies não monofiléticas (Albert and Crampton 2003; Crampton et al., 2005). Espécies desse gênero possuem importância comercial, por serem utilizadas como iscas vivas e, em alguns lugares, compoem boa parte das iscas utilizadas (Casciotta et al., 2013; Sousa et al., 2017; Faria-Pereira et al., 2019).

*Electrophorus*, conhecido popularmente como poraquê ou enguia elétrica, apresenta tamanho maior (podendo medir mais de dois metros de comprimento) sendo o único gênero que possui uma alta descarga elétrica dentro da ordem, chegando a 600 V (Campos-da-Paz, 2003; Albert & Crampton, 2005). Esse gênero é caracterizado por apresentar nadadeira anal e cavidade corporal se estendendo à ponta da cauda, adição contínua de vértebra durante toda vida, três órgãos elétricos separados, ausência de escamas, mais de 400 raios anais e um órgão respiratório oral vascularizado responsável pela captação do oxigênio atmosférico, possibilitando a sobrevivência do peixe em águas com baixo teor de oxigênio (Albert, 2001; Albert & Crampton, 2005). Considerado ser um gênero monotípico, constituído pela espécie *Electrophorus electricus*, até 2019 quando de Santana et al. (2019), descreveu mais duas espécies, *Electrophorus voltai* e *Electrophorus varii*, com base em análises moleculares e morfológicas (Figura 3).

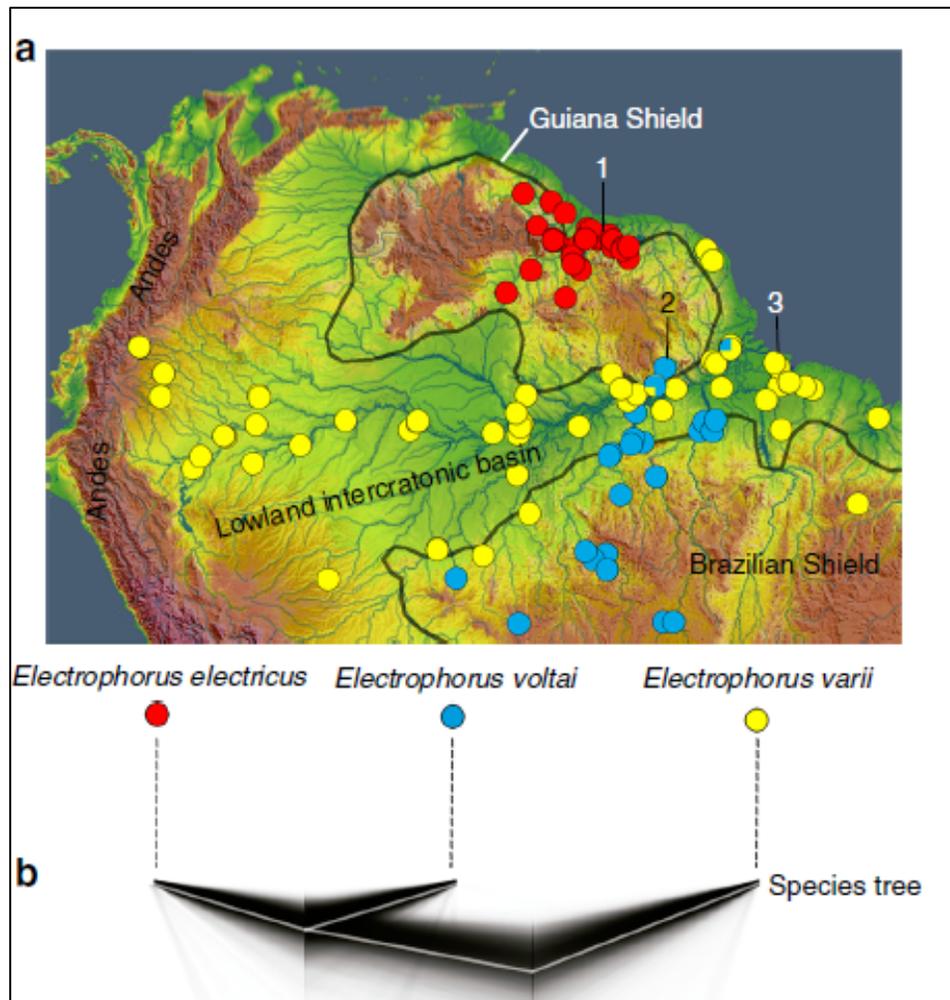


Figura 3: Imagem adaptada de De Santana et al. (2019). A - Distribuição geográfica dos espécimes analisados. B- relação filogenética.

### 1.2-1. Filogenia atual em Gymnotidae

Tagliacollo et al. (2016) com base em uma análise filogenética envolvendo o sequenciamento do DNA de seis genes (16S, COX1, CYT-B, RAG1, RAG2 e ZIC1) juntamente com 223 caracteres morfológicos, mostrou *Gymnotus* como monofilético, e dividiu o gênero em seis clados: *G. pantherinus*, *G. coatesi*, *G. anguillaris*, *G. tigre*, *G. cylindricus* e *G. carapo*. Estudos realizados por vários autores mostram uma estabilidade em vários aspectos da filogenia do gênero, como os clados *G. coatesi* (G1), *G. anguillaris* (G2, *G. catianapo*), *G. tigre* (G3, *G. henni*) e *G. cylindricus* (Lovejoy et al., 2010, Brochu, 2011, Crampton et al.,

2013; Tagliacollo et al., 2016). De Santana et al., 2019 descreveram três espécies diferentes para *Electrophorus*, com sua distribuição e relação filogenética bem definida (Figura 3). Craig et al. (2019) fez uma revisão da família, utilizando dados moleculares da literatura com mais 115 caracteres morfológicos, que somados incluem todas as espécies válidas descritas. A posição do gênero *Electrophorus* como grupo irmão, basal de *Gymnotus* foi reafirmada e o gênero *Gymnotus* foi formalmente dividido em seis subgêneros: *Gymnotus*, *Tijax*, *Tigre*, *Tigrinus*, *Lamontianus* e *Pantherus* (Figura 4) compatíveis com clados anteriormente descritos. Cada subgênero possui características morfológicas distintas dos demais, diferentes distribuições biogeográficas e grupos de espécies que têm distribuições amplamente ou totalmente alopátricas, com divergência de 10-30 milhões de anos.

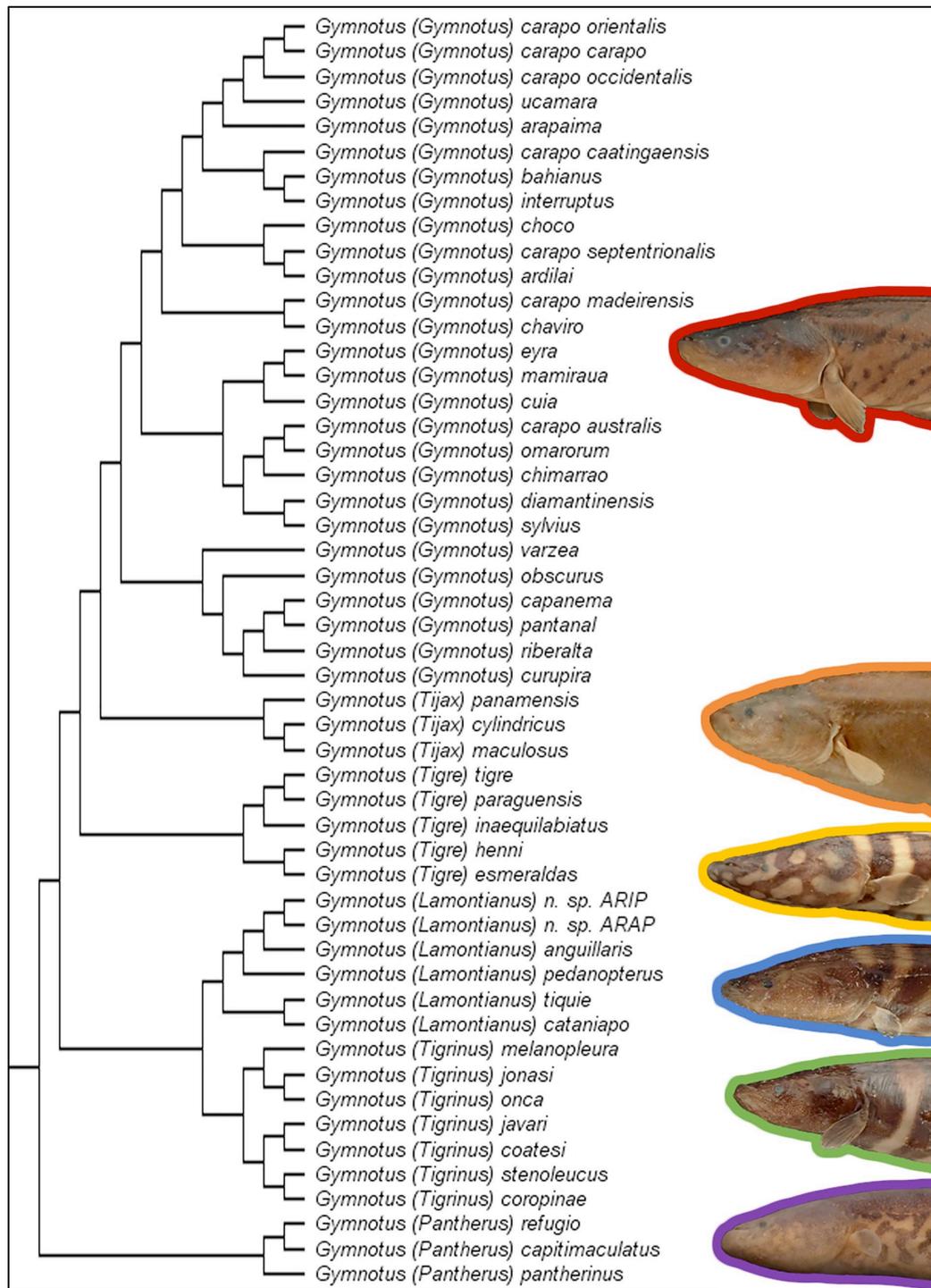
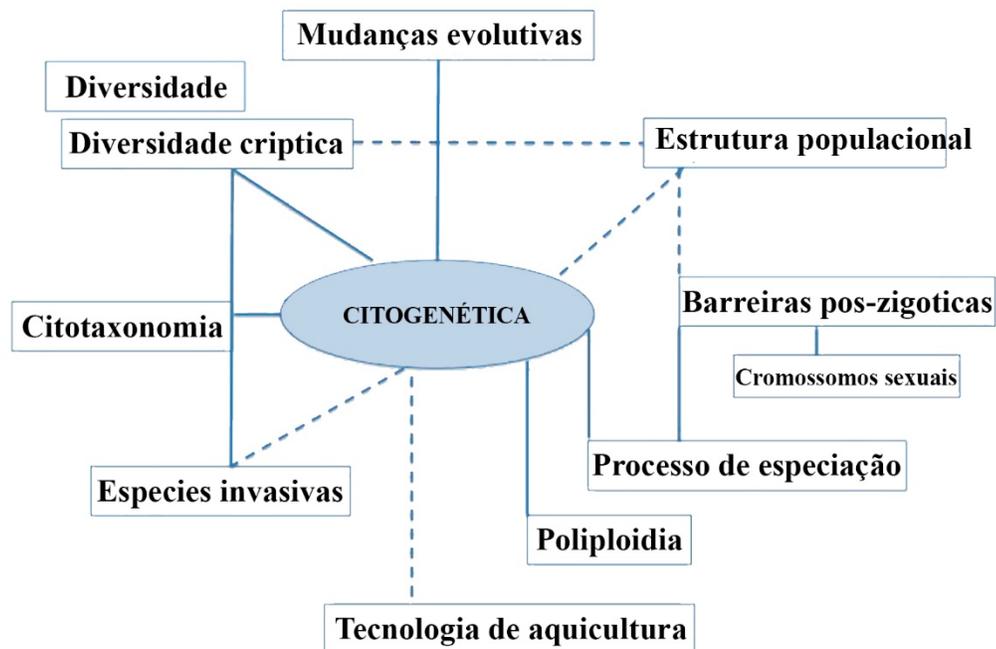


Figura 4: Hipótese filogenética do gênero *Gymnotus* baseada no conjunto de dados analisados por Craig et al. (2019) dividindo o gênero em 6 subgêneros.

### 1.3- Abordagens citogenéticas

Os peixes são o grupo de vertebrados mais rico, com mais de 34.000 espécies válidas taxonomicamente reconhecidas, com cerca de 19.000 delas vivendo em água doce, das quais 50% podem ser encontradas na região Neotropical. Essa grande diversidade implica em uma série de desafios filogenéticos e taxonômicos. Embora as espécies possam ser identificadas por meio de diferentes caracteres fenotípicos, estudos citogenéticos têm se mostrado uma ferramenta importante em inúmeros casos (Cioffi et al., 2018). Em peixes, esses estudos tiveram um grande desenvolvimento nos últimos anos devido ao emprego de novas técnicas de análise cromossômica, o que tem possibilitado à citogenética contribuir mais efetivamente (Figura 5), não só para estudos taxonômicos e filogenéticos, como também para uma maior compreensão da estrutura cromossômica e da organização do genoma dos vertebrados (Volff, 2005).



**Figura 5:** Uma rede de interação ilustrativa entre diferentes campos da ciência básica e aplicada, tendo a citogenética como núcleo de dados de suporte direto ou indireto para cada uma das diferentes abordagens representadas. Adaptado de Cioffi et al., 2018.

### 1.3-1. Sequências repetitivas

DNAs repetitivos representam uma grande parte do genoma da maioria dos organismos, sendo uma característica comum no genoma dos eucariotos, apresentando alta variabilidade e constituindo, em alguns casos, mais de 80% do teor de DNA da célula (Charlesworth et al., 1994). São classificados em duas grandes famílias: Repetições *in tandem* (agrupadas) e repetições dispersas (em todo o genoma). As repetições *in tandem* incluem três categorias principais (subfamílias): DNA satélite (satélites, minissatélites e microssatélites), parálogos de genes *in tandem* e genes de RNA ribossômico (rRNA). As repetições dispersas também consistem em três subfamílias: parálogos de genes e famílias de genes, genes que codificam RNA de transferência (tRNA) e elementos transponíveis (TEs) (Sperling and Li, 2013).

Essas sequências de DNA têm sido amplamente utilizadas como marcadores cromossômicos físicos em estudos comparativos, identificação de rearranjos cromossômicos e cromossomos sexuais, análise de evolução cromossômica e genética aplicada (Ferreira and Martins, 2008). Sequências de DNA de múltiplas cópias ajudam a entender os mecanismos evolucionários, estruturas genômicas e diferenciação cariotípica em peixes (Barbosa et al., 2017).

Diferentes estudos têm sugerido que estas sequências repetitivas estão envolvidas nos processos de recombinação, expressão gênica, replicação do DNA e na diferenciação de cromossomos sexuais em peixe (Liu et al., 2001; Li et al. 2002; Parise-Maltempo et al., 2007; Ferreira and Martins, 2008; Raskina et al., 2008; Cioffi et al., 2010; Barbosa et al., 2017). Segundo Kidwell (2002), estas sequências podem estar envolvidas em rearranjos cromossômicos, sendo responsáveis por proporções consideráveis das variações cariotípicas observadas em muitos grupos.

### 1.3-2. FISH e Pintura cromossômica

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) possibilitou mapear fisicamente sequências nucleotídicas específicas nos cromossomos da espécie ou grupo em estudo. A FISH tem desempenhado um papel importante na compreensão da estrutura do genoma de espécies de

peixes (Yi et al., 2003; Martins et al., 2011; Vicari et al., 2011; Gornung 2013; Knytl et al., 2013; Yano et al., 2017) incluindo a origem e evolução dos cromossomos sexuais (Reed et al., 1995; Phillips et al., 2001; Liu et al., 2002 ; Henning et al., 2008, 2011; Machado et al., 2011; Parise-Maltempì et al., 2013; Blanco et al., 2014; Cioffi et al., 2017).

A pintura cromossômica revitalizou as análises citogenéticas de rearranjos cromossômicos patológicos e evolutivos e fez uma grande contribuição para o sucesso da citogenética molecular durante as últimas duas décadas. A técnica de pintura cromossômica usa sondas de cromossomos inteiros, braços cromossômicos ou regiões cromossômicas para encontrar segmentos homeólogos em metáfases de outras espécies, e tornou-se uma ferramenta indispensável para a citogenética comparativa (Yang et al., 2017). Ela pode auxiliar na compreensão da filogenia de um grupo, já que revela rearranjos cromossômicos e torna-se uma ferramenta útil na identificação de espécies crípticas (Nagamachi et al., 2010) e ajuda a compreender a evolução do genoma e sua plasticidade (Ferguson-Smith et al., 1998).

#### **1.4- Citogenética na família Gymnotidae**

A citogenética tem sido uma ferramenta importante na citotaxonomia e provou ser muito útil na compreensão dos processos evolutivos por trás da diversificação de Gymnotidae. A família possui uma variação cromossômica grande com números diploides entre  $2n=34$  cromossomos em *Gymnotus capanema* (Milhomem et al., 2012) a  $2n=54$  cromossomos em *Gymnotus carapo* (Foresti et al., 1984), *G. mamiraua* (Milhomem et al., 2007), *G. paraguensis* e *G. inaequilabiatus* (Scacchetti et al., 2011) (Figura 6); um caso excepcional de triploide natural foi encontrado em *G. carapo* com  $3n=81$  cromossomos (Fernandes-Matioli et al., 1998) (Tabela 1). Fonteles et al. (2008) e Cardoso et al. (2015) analisaram o cariótipo de *E. electricus* e obtiveram o  $2n=52$  cromossomos e a fórmula cariotípica  $42m/sm + 10st/a$  em todas as populações analisadas, com pequenas diferenças populacionais envolvendo distribuição da heterocromatina constitutiva, a presença de cromossomos B e/ou os cromossomos portadores da NOR.

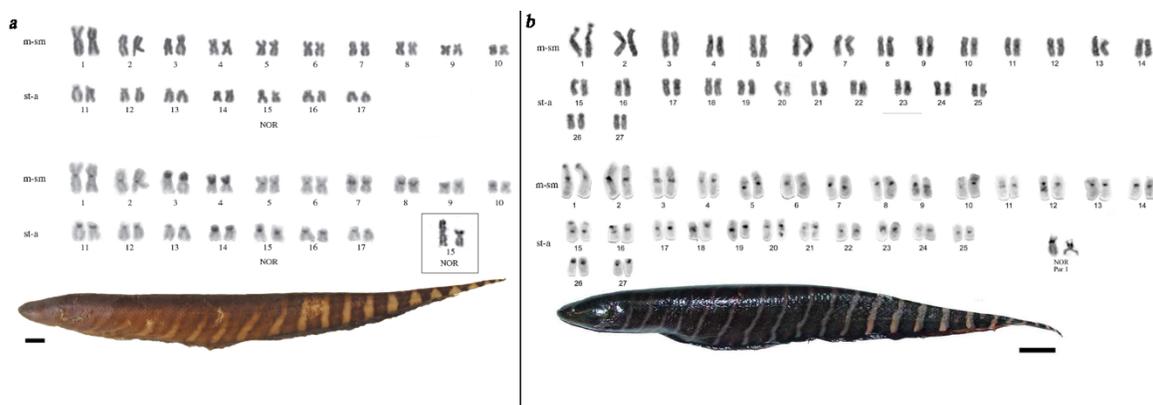


Figura 6: Coloração convencional, Banda C, Ag-NOR e espécimes de a- *G. capanema*, b – *G. mamairaua*, ilustrando a grande variação cromossômica encontrada no gênero. Imagem adaptada de Milhomem et al., 2007 e 2012.

Tabela 1- Variação cromossômica no gênero *Gymnotus*.

Species	2n (KF)	Authors
<i>Gymnotus arapaima</i>	44 (24m/sm+20st/a)	Milhomem et al. (2012b)
<i>Gymnotus bahianus</i>	♀36 (30m/sm+6st) ♂37 (32m/sm+5st)	Almeida et al. (2015)
<i>Gymnotus carapo</i>	54 (54m/sm) 52 (50m/sm+2st/a) 48 (34m/sm+14st/a) 42 (32m/sm+10st/a) 54 (52m/sm+2st/a) 42 (30m/sm+12st/a) 40 (28m/sm+12st/a)	Foresti et al. (1984) Fernandes-Matioli et al. (1998) Claro (2008) Milhomem et al. (2007) Milhomem et al. (2008)
<i>Gymnotus cf. carapo</i>	54 (50m/sm+4st/a)	Scacchetti et al. (2011)
<i>Gymnotus carapo</i> “Catalão”	40 (30m/sm+10st)	da Silva et al. (2014)
<i>Gymnotus carapo</i> “Maranhão”	42 (30m/sm+12st/4a)	da Silva (2015)
<i>Gymnotus capanema</i>	34 (20m/sm+14st/a)	Milhomem et al. (2012a)
<i>Gymnotus coatesi</i>	50 (24m/sm+26st/a)	Machado et al. (2017)

<i>Gymnotus coropinae</i>	♀50 (28m/sm+22st/a) ♂49 (26m/sm+23st/a)	da Silva et al. (2014)
<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	52 (50m/sm+2st/a) 54 (52m/sm+2st/a)	Fernandes-Matioli et al. (1998) Scacchetti et al. (2011)
<i>Gymnotus javari</i>	50 (20m/sm+30st/a)	Utsunomia et al. (2014)
<i>Gymnotus jonasi</i>	52 (12m/sm+40st/a)	Milhomem et al. (2012b)
<i>Gymnotus mamiraua</i>	54 (50m/sm+4st/a) 54 (38m/sm+16st/a)	Milhomem et al. (2012b) da Silva et al. (2016)
<i>Gymnotus pantanal</i>	♀40 (14m/sm+26st/a) ♂39 (15m/sm+24st/a)	Margarido <i>et al.</i> (2007); da Silva <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnotus pantherinus</i>	52 (46m/sm+6st/a) 52 (50m/sm+2st/a)	Fernandes-Matioli <i>et al.</i> (1998) Scacchetti <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnotus paraguensis</i>	54 (52m/sm+2st) 54 (50m/sm+4st)	Margarido <i>et al.</i> (2007); da Silva <i>et al.</i> (2011) Lacerda and Maistro (2007)
<i>Gymnotus cf. pedanopterus</i>	50 (42m/sm+8st/a)	da Silva (2015)
<i>Gymnotus cf. stenoleucus</i>	48 (20m/sm+28st/a)	da Silva (2015)
<i>Gymnotus sylvius</i>	40 (38m/sm+2st/a) 40 (38m/sm+2st/a) 40 (36m/sm+4st/a) 40 (36m/sm+4st/a) 40 (34m/sm+6st)	Fernandes-Matioli <i>et al.</i> (1998) Claro (2008) Lacerda and Maistro (2007) Margarido <i>et al.</i> (2007) Scacchetti <i>et al.</i> (2001)
<i>Gymnotus ucamara</i>	44 (28m/sm+16st/a)	da Silva (2015)
<i>Gymnotus sp.</i>	50 (26m/sm+24 st/a)	Lacerda and Maistro (2007)
<i>Gymnotus sp.</i> “Negro”	♀50 (22m/sm+28st) ♂50 (21m/sm+29st)	da Silva <i>et al.</i> (2014)

#### 1.4-1. Estudos de DNA repetitivo no gênero *Gymnotus*

Em *Gymnotus* as regiões organizadoras de nucléolo (NOR) encontram, em sua maioria, localizados em um único par cromossômico com exceção de *G. jonasi* (Milhomem et al., 2012), *G. pantanal* (Fernandes et al., 2005) e *G. coatesi* (Machado et al. 2017). Milhomem et al. (2013) demonstrou, por pintura cromossômica de sonda de cromossomo total do par portador da NOR de *G. carapo* em associação com sondas de rDNA 18S, que dentro do clado *G. carapo* o cromossomo portador da NOR é considerado uma sinapomorfia.

A caracterização das sequências de rDNA 5S na família Gymnotidae vem sendo explorada em recentes trabalhos (Scacchetti et al., 2011; da Silva et al., 2011, 2014a, 2015, 2019; Utsunomia et al., 2014; Almeida et al., 2015; da Silva et al., 2016; Machado et al. 2017), onde se observa uma grande variação de número e distribuição dessas sequências, desde um único par até 19 pares. Da Silva et al. (2016) também observou que as espécies localizadas na base da filogenia possuem a tendência de ter apenas um ou dois pares, como observado em *G. javari* (Utsunomia et al., 2014), *G. coropinae*, *Gymnotus* sp. ‘Negro’ (da Silva et al., 2014), *G. cf. stenoleucus*, *G. cf. pedanopterus* (da Silva, 2015) e *G. coatesi* (Machado et al. 2017) e um aumento no número de pares, observados no clado *carapo*. Essas sequências também foram associadas a transposons (Claro, 2008; da Silva et al., 2011) e regiões regulatórias (Scacchetti et al., 2012), além de serem marcadores biogeográficos (da Silva et al., 2019).

Utsunomia et al. (2018) analisou a distribuição de sequências de microssatélite em espécies do subgênero *Gymnotus carapo* e mostrou uma alta variação na distribuição dessas sequências, além de algumas sequências com distribuição não aleatória e com homologia nos pares cromossômicos, possivelmente relacionadas em regiões específicas do genoma, indicando um padrão de organização na compartimentalização dos cromossomos.

#### **1.4-2. Pintura cromossômica na família Gymnotidae**

Em 2010, Nagamachi et al. produziram por citometria de fluxo, sondas de cromossomo total do cariótipo de *Gymnotus carapo* sensu stricto citótipo  $2n=42$ . Foram isolados cromossomos de regiões e sub-regiões do cariógrama de fluxo, conforme especificado na Tabela 2 e Figura 7, onde a caracterização dos cromossomos de cada região e sub-região foram feitas utilizando FISH dual-color que permitiu individualizar grande parte dos

cromossomos de *G. carapo* (1–3, 6, 7, 9, 14, 16 e 18–21) e os demais em associação ([4,8]; [10,11]; [5,17]; [12,13,15]). Comparando-se as três espécies já mapeadas por sonda de cromossomo total e a espécie da qual foi obtida a sonda (*G. carapo* citótipos  $2n=42$  e  $40$ , *G. capanema* e *G. arapaima* apenas o R1(GCA20) e o GCA21 mantiveram-se em homeologia conservada (Figura 8) entre todas elas. Milhomen et al. (2013) mostraram que o GCA20, o par portador da NOR, apresentou sintenia conservada também em *G. mamiraua*, *G. cf. carapo* ( $2n = 54$ ), *G. sylvius*, *G. inaequilabiatus* e em *G. jonsasi*, sendo que em *G. jonsasi* ele está fusionado a outro cromossomo, e não compartilha a NOR no mesmo par.

**Tabela 2-** Sondas GCA  $2n=42$ .

Região	Subregião	Nº Pares	Cromossomos
R1 (Peak 1)		1	20: portador da NOR
R2 (Peak 2)		4	1, 2, 3, 16
R2	S2A (Peak 8)	3	1, 2, 16
R2	S2B (Peak 14)	2	2, 16
R2	S2C (Peak 18)	2	1, 16
R3 (Peak 3)		8	4, 5, 6, 7, 8, 17, 18, 19
R3	S3A (Peak 10)	4	5, 6, 7, 17
R3	S3B (Peak 12)	2	6, 19
R3	S3C (Peak 15)	1	7
R3	S3D (Peak 16)	5	5, 6, 7, 17, 18
R4 (Peak 4)		8	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 21
R4	S4A (Peak 9)	3	12, 13, 15
R4	S4B (Peak 11)	4	12, 13, 14, 15
R4	S4C (Peak 13)	6	10, 11, 12, 13, 15, 21
R4	S4D (Peak 17)	5	12, 13, 14, 15, 21

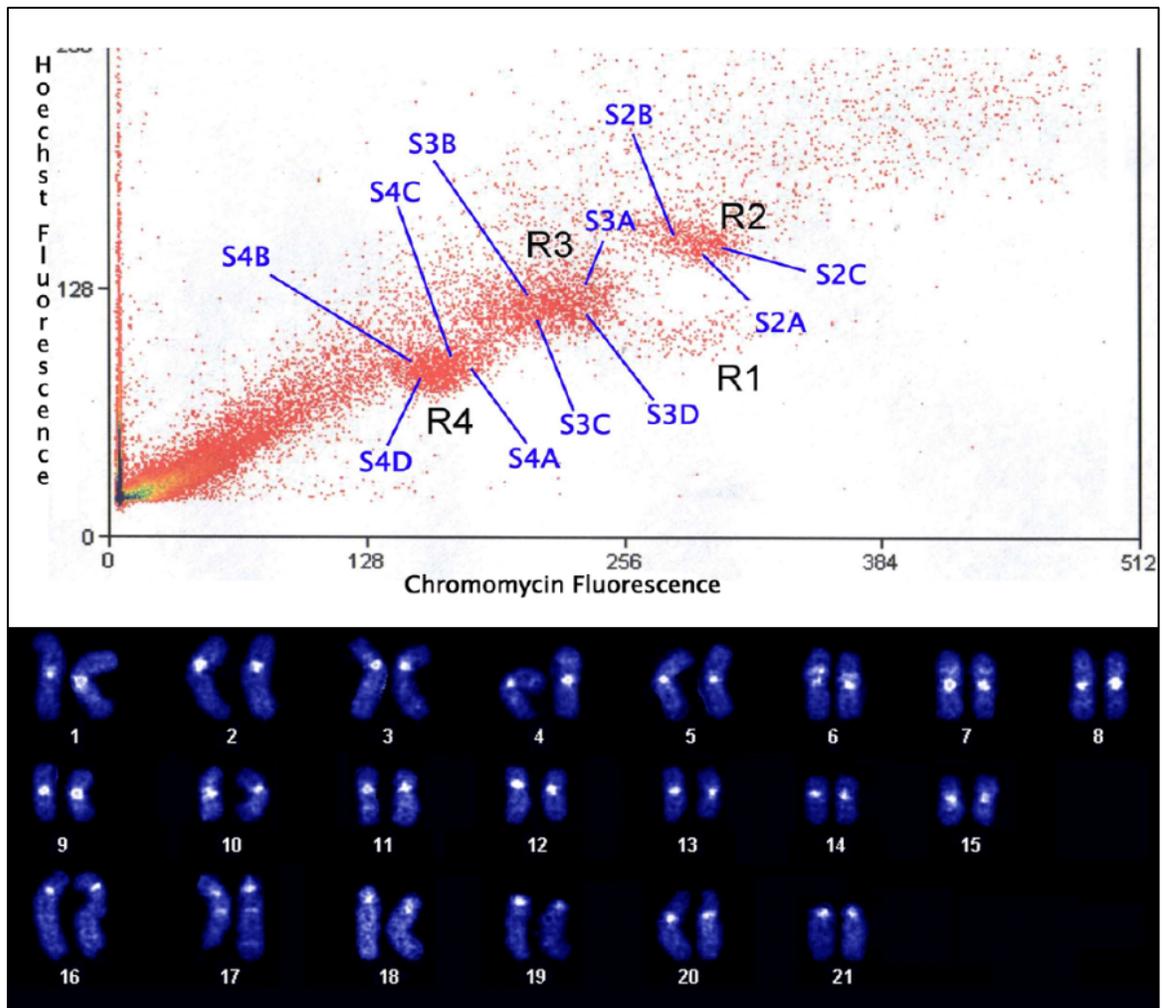
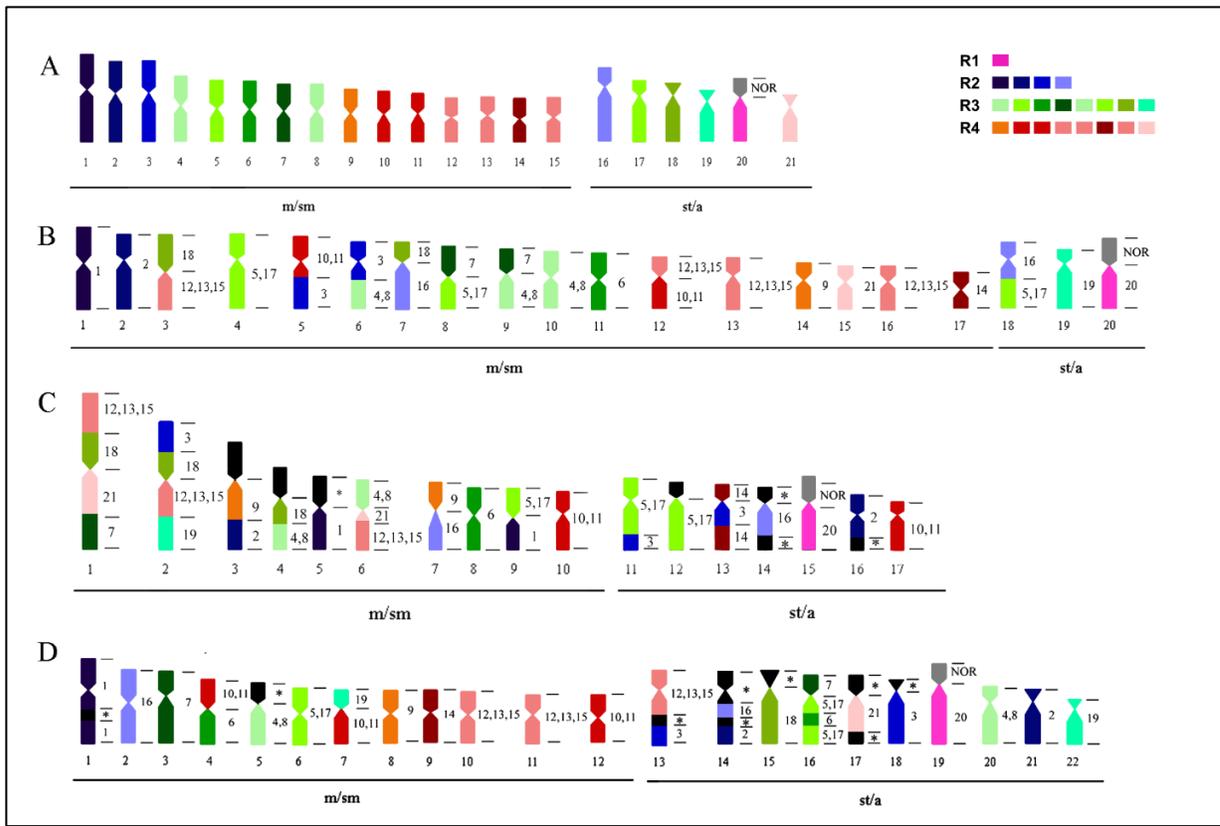


Figura 7: Cariótipo de fluxo mostrando 4 Regiões: R1, R2 com 3 subregiões (S2A, S2B, S2C), R3 com 4 subregiões (S3A, S3B, S3C, S3D) e R4 com 4 subregiões (S4A, S4B, S4C, S4D). Abaixo: Cariótipo de *G. carapo* sensu stricto: citótipo com  $2n = 42$ .



**Figura 8: Idiograma mostrando rearranjos cromossômicos observados por pintura cromossômica. R1, R2, R3 e R4 representam as cores das grandes regiões da sonda. A- Cariótipo de *G. carapo*  $2n=42$  utilizado na produção das sondas de cromossomo total, cada cor identifica um cromossomo ou grupo de cromossomos não separáveis por pintura. B- Cariótipo de *G. carapo*  $2n=40$ . C- Cariótipo de *G. capanema*. D- Cariótipo de *G. arapaima*. (Machado et al., 2018)**

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo Geral

Estudar por pintura cromossômica os cariótipos das espécies *Gymnotus carapo* “Catalão” e *G. pantanal*, almejando compreender os mecanismos de evolução cromossômica que atuaram na diversificação dessas espécies e comparar com os cariótipos das espécies já mapeadas com essas sondas; analisar e caracterizar sequências de DNA repetitivo com base no genoma de *G. carapo* “Catalão” e auxiliar na compreensão das relações filogenéticas entre as espécies desta família e a dinâmica evolutiva presente utilizando filogenia molecular.

### 2.2- Objetivos Específicos

- a. Mapear as sondas de cromossomo total de *G. carapo* ( $2n=42$ ) nas espécies *Gymnotus carapo* “Catalão” e *G. pantanal*;
- b. Verificar os tipos de rearranjos ocorridos nos cariótipos das espécies estudadas através de análise comparativa por pintura cromossômica;
- c. Verificar as possíveis homeologias existentes;
- d. Identificar a dinâmica cromossômica evolutiva na família.
- e. Isolar e caracterizar sequências de DNAs repetitivos de *G. carapo* “Catalão”;
- f. Mapear fisicamente os DNAs repetitivos obtidos em *G. carapo* “Catalão”;
- g. Comparar os padrões de organização cromossômica dos DNAs repetitivos entre as espécies estudadas e com os dados da literatura;

### **3- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **Capítulo 1 – *Gymnotus carapo* “Catalão”**

**Chromosome painting in *Gymnotus carapo* “Catalão”: Dynamics of chromosomal rearrangements in cryptic species**

#### **Capítulo 2 – *Gymnotus pantanal***

**Chromosome Painting in *Gymnotus pantanal* (Gymnotiformes): A case of  $X_1X_1X_2X_2 / X_1X_2Y$  sexual system**

#### **Capítulo 3 – Sequências repetitivas (Em andamento)**

### 3.1- Capítulo 1 – *Gymnotus carapo* “Catalão”

#### **Chromosome painting in *Gymnotus carapo* “Catalão”: Dynamics of chromosomal rearrangements in cryptic species**

Milla de Andrade Machado<sup>1</sup>, Maelin Silva<sup>2,3</sup>, Eliana Feldberg<sup>2</sup>, Patricia Mary Caroline O'Brien<sup>4</sup>, Malcolm Andrew Ferguson-Smith<sup>4</sup>, Julio Cesar Pieczarka<sup>1</sup>, Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Pará, UFPA, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, ICB, Laboratório de Citogenética, Campus Guamá, Avenida Perimetral, SN, Guamá, Belém, PA, Brasil. CEP: 66075-900 –

<sup>2</sup> Programa de Pós Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brasil.

<sup>4</sup> Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.



# Chromosome Painting in *Gymnotus carapo* “Catalão” (Gymnotiformes, Teleostei): Dynamics of Chromosomal Rearrangements in Cryptic Species

Milla de Andrade Machado<sup>1</sup>, Maelin da Silva<sup>2</sup>, Eliana Feldberg<sup>3</sup>,  
 Patricia Caroline Mary O'Brien<sup>4</sup>, Malcolm Andrew Ferguson-Smith<sup>4</sup>, Julio Cesar Pieczarka<sup>1</sup>  
 and Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Do Pará (UFPA), Belém, Brazil, <sup>2</sup>Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil, <sup>3</sup>Laboratório de Genética Animal, Coordenação de Biodiversidade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil, <sup>4</sup>Department of Veterinary Medicine, Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Tony Silveira,  
Federal University of Rio Grande, Brazil

### Reviewed by:

Jack Craig,  
Temple University, United States  
 Denisa Šimoníková,  
Academy of Sciences of the Czech  
 Republic, Czechia

### \*Correspondence:

Cleusa Yoshiko Nagamachi  
 cleusa@ufpa.br  
 cleusanagamachi@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
 Evolutionary and Population Genetics,  
 a section of the journal  
 Frontiers in Genetics

**Received:** 09 December 2021

**Accepted:** 10 February 2022

**Published:** 24 March 2022

### Citation:

Machado MA, da Silva M, Feldberg E,  
 O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA,  
 Pieczarka JC and Nagamachi CY  
 (2022) Chromosome Painting in  
*Gymnotus carapo* “Catalão”  
 (Gymnotiformes, Teleostei): Dynamics  
 of Chromosomal Rearrangements in  
 Cryptic Species.  
 Front. Genet. 13:832495.  
 doi: 10.3389/fgene.2022.832495

The genus *Gymnotus* is a large monophyletic group of freshwater weakly-electric fishes, with wide distribution in Central and South America. It has 46 valid species divided into six subgenera (*Gymnotus*, *Tijax*, *Tigre*, *Lamontianus*, *Tigrinus* and *Pantherus*) with large chromosome plasticity and diploid numbers (2n) ranging from 34 to 54. Within this rich diversity, there is controversy about whether *Gymnotus* (*Gymnotus*) *carapo* species is a single widespread species or a complex of cryptic species. Cytogenetic studies show different diploid numbers for *G. carapo* species, ranging from 40 to 54 chromosomes with varied karyotypes found even between populations sharing the same 2n. Whole chromosome painting has been used in studies on fish species and recently has been used for tracking the chromosomal evolution of *Gymnotus* and assisting in its cytotaxonomy. Comparative genomic mapping using chromosome painting has shown more complex rearrangements in *Gymnotus carapo* than shown in previous studies by classical cytogenetics. These studies demonstrate that multiple chromosome pairs are involved in its chromosomal reorganization, suggesting the presence of a complex of cryptic species due to a post zygotic barrier. In the present study, metaphase chromosomes of *G. carapo occidentalis* “catalão” (GCC, 2n = 40, 30m/sm+10st/a) from the Catalão Lake, Amazonas, Brazil, were hybridized with whole chromosome probes derived from the chromosomes of *G. carapo* (GCA, 2n = 42, 30m/sm+12st/a). The results reveal chromosome rearrangements and a high number of repetitive DNA sites. Of the 12 pairs of *G. carapo* chromosomes that could be individually identified (GCA 1–3, 6, 7, 9, 14, 16 and 18–21), 8 pairs (GCA 1, 2, 6, 7, 9, 14, 20, 21) had homeology conserved in GCC. Of the GCA pairs that are grouped (GCA [4, 8], [5, 17], [10, 11] and [12, 13, 15]), most kept the number of signals in GCC (GCA [5, 17], [10, 11] and [12, 13, 15]). The remaining chromosomes are rearranged in the GCC karyotype. Analysis of both populations of the *G. carapo* cytotypes shows extensive karyotype reorganization. Along with previous studies, this suggests that the different cytotypes analyzed here

may represent different species and supports the hypothesis that *G. carapo* is not a single widespread species, but a group of cryptic species.

**Keywords:** amazon, banded knife-fish, whole chromosome painting, FISH, complex of species

## INTRODUCTION

The genus *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) is a large monophyletic group of weakly-electric freshwater fish. It is the most speciose genus of the order, with 46 validated species (Craig et al., 2019; Kim et al., 2020; Fricke et al., 2021), widely distributed in the Neotropical region (Central and South America). The highest diversity is found in the Amazon-Orinoco-Guiana basins (Mago-Leccia, 1994; Albert, 2001; Albert and Crampton, 2005).

*Gymnotus* is divided into six subgenera: *Gymnotus*, *Tijax*, *Tigre*, *Lamontianus*, *Tigrinus* and *Pantherus* (Craig et al., 2019) with substantial chromosome plasticity. The diploid number (2n) varies from 2n = 34 in *Gymnotus capanema* (Milhomem et al., 2012a) to 2n = 54 in *G. carapo* (Foresti et al., 1984), *G. mamiraua* (Milhomem et al., 2007), *G. paraguensis* (Margarido et al., 2007) and *G. inaequilabiatus* (Scacchetti et al., 2011). The growing number of studies based not only on the karyotypic formula but also on different kinds of repetitive DNA sequences such as rDNAs, satellites, microsatellites and transposable elements (Milhomem et al., 2007; Claro, 2008; Milhomem et al., 2008; Scacchetti et al., 2011; Milhomem et al., 2012a; Milhomem et al., 2012b; da

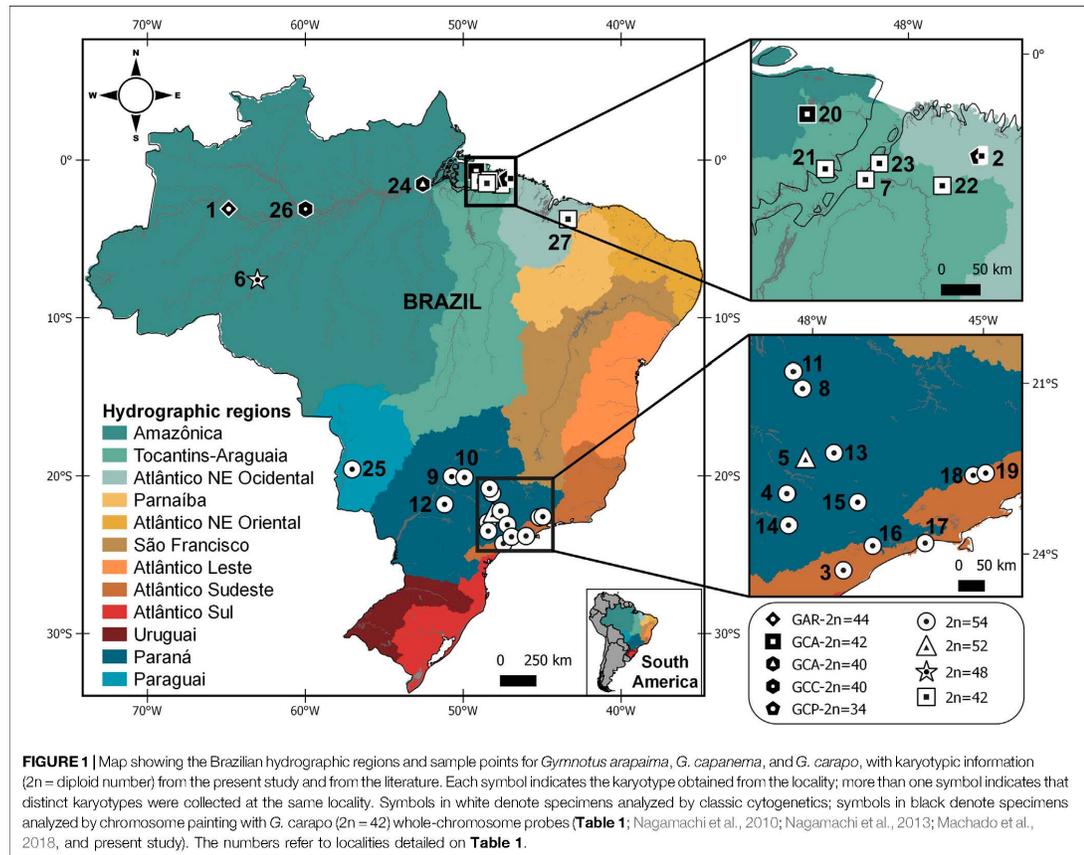
Silva et al., 2014; Utsunomia et al., 2014; Almeida et al., 2015; da Silva, 2015; da Silva et al., 2016; Machado et al., 2017; Utsunomia et al., 2018), have shown many different species-specific karyotypes and even population variants.

This large variation in 2n, however, is mostly found in the *G. carapo* subgenus, the previous *Gymnotus carapo* clade (Craig et al., 2019). In all the other subgenera, the diploid number varies from 48 to 54 chromosomes, many sharing the 2n = 52 that is found in the basal subgenus, the species *G. (pantherus) pantherinus* (Scacchetti et al., 2011; da Silva et al., 2011; da Silva et al., 2014; Utsunomia et al., 2014; Almeida et al., 2015; da Silva et al., 2016; Machado et al., 2017; da Silva et al., 2019), and also found in *Electrophorus*, the sister genus of *Gymnotus* (Fonteles et al., 2008; Cardoso et al., 2015).

In the subgenus *Gymnotus*, the *G. carapo* species has huge karyotype diversity among populations, with 2n ranging from 40 to 54, and many karyotypic formulas within the 2n described (Table 1). The species *G. carapo*, based on morphology and distribution data, was divided into subspecies *Gymnotus c. australis*, *Gymnotus c. caatingaensis*, *Gymnotus c. carapo*, *Gymnotus c. madeirensis*, *Gymnotus c. occidentalis*, *Gymnotus c. orientalis*, and *Gymnotus c. septentrionalis* (Craig et al., 2017).

**TABLE 1** | Cytogenetic studies of *Gymnotus arapaima*, *G. capanema* and *G. carapo*.

Species	2n (KF)	Authors	Localidades
<i>G. arapaima</i>	44 (24m/sm+20st/a)	Milhomem et al. (2013)	1. Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, AM
<i>G. capanema</i>	34 (20m/sm+14st/a)	Milhomem et al. (2012b), Milhomem et al. (2012a)	2. Capanema, PA
<i>G. carapo</i>	54 (54m/sm)	Foresti et al. (1984)	3. Miracatu, SP; 4. Botucatu, SP
	52 (50m/sm+2st/a)		5. Brotas, SP
	48 (34m/sm+14st/a)		6. Humaitá, AM
	42 (32m/sm+10st/a)		7. Belem, PA
	54 (52m/sm+2st/a)	Fernandes-Matioli et al. (1998)	8. Rio Mogi-Guaçu, SP
	54	Claro (2008)	9. Santa Albertina, SP;
			10. Cardoso, SP;
			11. Terra Roxa, SP;
			12. Mariópolis, SP
			13. Corumbataí, SP;
		4. Botucatu, SP;	
		14. Angatuba, SP;	
		15. Indaiatuba, SP	
		16. São Loreço, SP;	
		17. Bertoga, SP;	
		18. Piquete, SP;	
		19. Cruzeiro, SP.	
	42 (30m/sm+12st/a)	Milhomem et al. (2007)	20. Santa Cruz do Arari, PA;
	42 (30m/sm+12st/a)	Milhomem et al. (2008)	21. Ponta de Pedras, PA;
			22. São Miguel do Guamá, PA;
			2. Capanema, PA;
			23. Benfica, PA
	40 (28m/sm+12st/a)	Milhomem et al. (2008)	24. Almeirim, PA
<i>G. cf. carapo</i>	54 (50m/sm+4st/a)	Scacchetti et al. (2011)	25. Passo do Lontra, MS
<i>G. carapo</i> "Catalão"	40 (30m/sm+10st)	da Silva et al. (2014)	26. Lago Catalão, AM
<i>G. carapo</i> "Maranhão"	42 (30m/sm+12st/a)	da Silva et al. (2019)	27. Rio Munin, MA



While most Neotropical fish species of South America have restricted geographic distributions, these species are distributed widely (Albert and Reis, 2011; Lehmsberg, 2015; Craig et al., 2017).

Chromosome painting is an important tool in comparative cytogenetics studies of fish species. The results have helped to solve various issues in this field and have giving insights into several evolutionary issues (Barby et al., 2019). It has helped to bring insights into the origin of B chromosomes (Vicari et al., 2011; Scudeler et al., 2015; Utsunomia et al., 2016), the origin and evolution of sex chromosomes (Carvalho et al., 2017; Cioffi et al., 2017; de Oliveira et al., 2017; de Moraes et al., 2017; Yano et al., 2017; de Freitas et al., 2018) and helped in the understanding of chromosomal evolution and relationships between closely related species (Ráb et al., 2008; Nagamachi et al., 2010; Nagamachi et al., 2013; Milhomem et al., 2013; Machado et al., 2018; Cioffi et al., 2019). Nagamachi et al. (2010) produced whole chromosome probes (WCP) from *G. c. orientalis* (GCA42,  $2n = 42$ , 30m/sm+12st/a) by flow sorting, and hybridized these probes to the cytotypes of *G. c. orientalis* with  $2n = 40$  (GCA40, 34m/sm+6st/a). Two other studies with

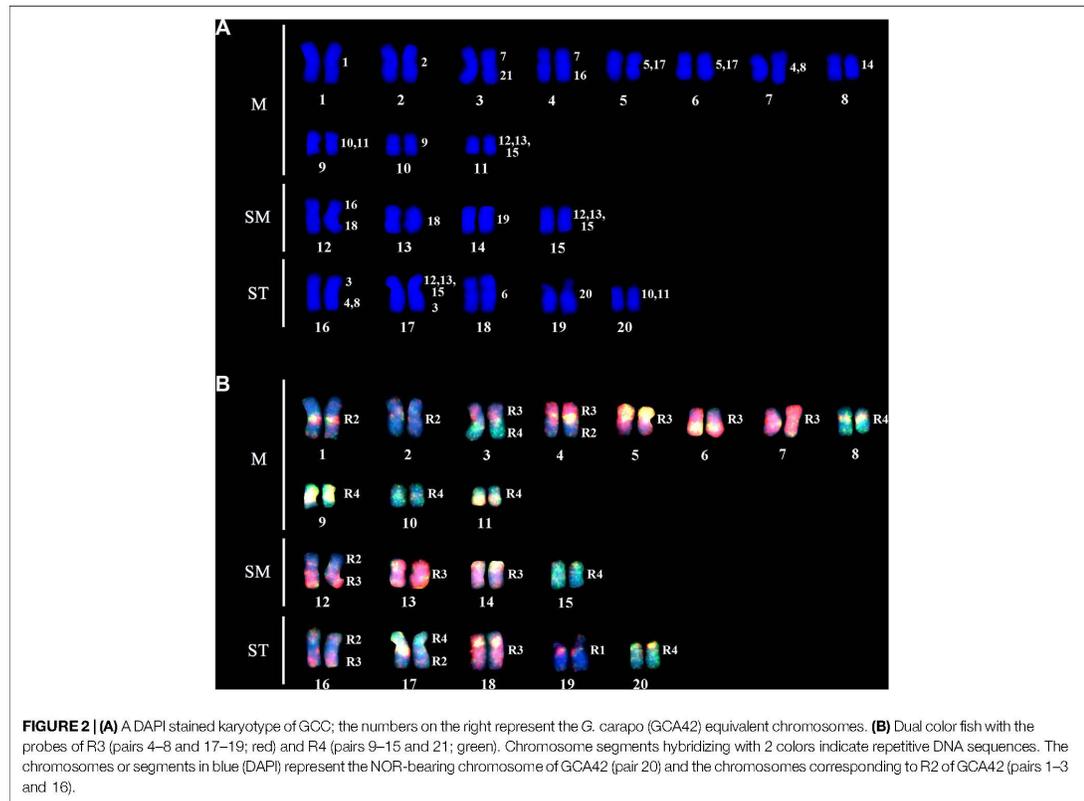
WCP from GCA42 mapped the karyotypes of *G. capanema* (GCP  $2n = 34$ , Nagamachi et al., 2013) and *G. arapaima* (GAR  $2n = 44$ , Machado et al., 2018). Those studies showed a higher level of chromosomal rearrangement than previously thought between these species.

In this study we used GCA42 WCP (Nagamachi et al., 2010) for mapping the karyotype of *G. c. occidentalis* "Catalão" (GCC  $2n = 40$ ), a distinctive population which has been proposed as a new species (da Silva et al., 2014). The results were compared with those obtained from GCA40 (Nagamachi et al., 2010), GCP34 (Nagamachi et al., 2013) and GAR44 (Machado et al., 2018).

## MATERIAL AND METHODS

### Sampling

Samples of *G. carapo* "Catalão" (GCC) were collected in Amazonas, Brazil (Figure 1). The Cytogenetics Laboratory from Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade (UFPA) has permit number 19/2003 from the Ministry of Environment



for sample transport and permit 52/2003 for using the samples for research. The Ethics Committee from Para Federal University (Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Pará) approved this research (Permit 68/2015). Sample collections were authorized by Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) and Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Pará (SEMA-PA) under permit 020/2005 (Registration: 207419).

### Map

A distribution map was made using QGIS v.3.10.7. The shapefiles containing country limits were obtained from DIVA-GIS (Hijmans et al., 2004). We used the hydrographic regions limits provided by Braga et al. (2008) and we created the shapefiles on QGIS v.3.10.7. The localities numbered are shown on Table 1.

### Whole Chromosome Painting

Whole Chromosome Probes (WCP) from *G. carapo* ( $2n = 42$ ; 30m/sm+12st/a; Nagamachi et al., 2010) were hybridized onto metaphases of *G. carapo* "Catalão". Chromosome painting

techniques followed Yang et al. (1995) with the modifications proposed by Nagamachi et al. (2010). Chromosomes were classified morphologically according to Levan et al. (1964) with modifications. The karyotype was organized following da Silva et al. (2014).

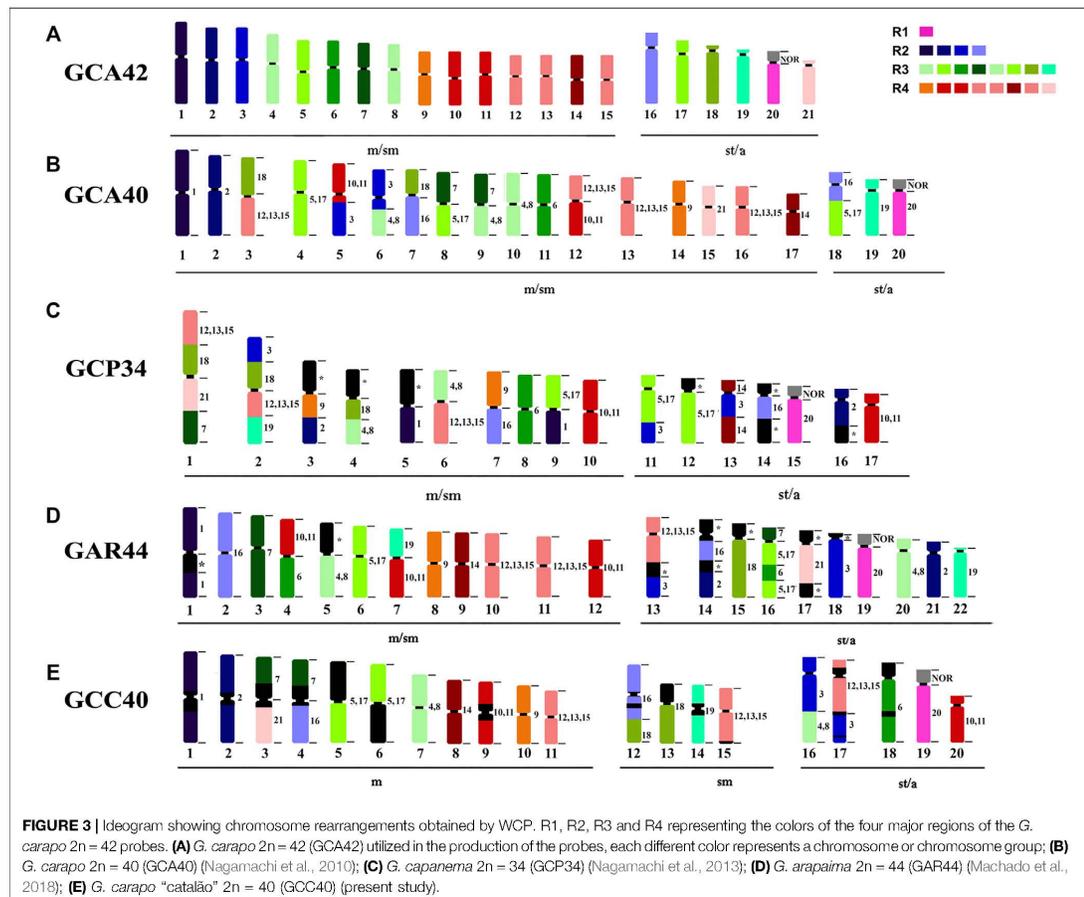
## RESULTS

### Chromosome Painting in *Gymnotus carapo Occidentalis* "Catalão"

*Gymnotus carapo occidentalis* "Catalão" (GCC) has  $2n = 40$  with 30m/sm+10st/a chromosomes (Figure 2A) without differentiated sex chromosomes in male and female specimens.

The regions of homology with GCA42 are indicated on the karyotype of GCC arranged from DAPI-stained chromosomes (Figure 2A).

Dual color FISH with the probes of GCA42 from R3 (pairs 4–8 and 17–19; red) and R4 (pairs 9–15 and 21; green) define the chromosome groups in GCC40 corresponding to the four groups in Figure 2B. Chromosome segments hybridizing with 2 colors



indicate repetitive DNA sequences. The chromosomes or segments in blue (DAPI) represent the GCA42 NOR-bearing chromosome (pair 20) and the chromosomes corresponding to R2 (pairs 1–3 and 16).

From the 12 chromosome pairs of GCA42 that can be individually differentiated (pairs 1–3, 6, 7, 9, 14, 16 and 18–21), 8 pairs (1, 2, 6, 9, 14, 19, 20, 21) conserve homeology within GCC40 (pairs 1, 2, 3, 8, 10, 14, 18, 19). GCA42 pair 20 hybridizes one whole chromosome in GCC40, pair 19. Four chromosome pairs of GCA42 (3, 7, 16, and 18) show 2 signals on GCC40 (Figure 2).

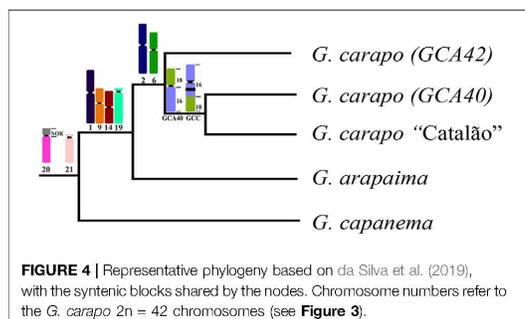
The GCA42 probes that represent two chromosome pairs (4,8), (10,11) and (5,17) all reveal 2 signals, and the one that represents three pairs (12, 13, 15) reveals 3 signals on the GCC40 chromosomes.

The following chromosome associations of GCA42 are present in GCC40 pairs: 3 (7/C/21); 4 (7/C/16); 12 (16/C/16/18); 16 (3/C/3/[4, 8]); 17 ([12, 13, 15]/C/[12, 13, 15]/3), where C = centromere.

## Comparative Chromosome Painting Analysis Among Different *Gymnotus* Karyotypes

From the 12 chromosome pairs in GCA42 that can be identified individually (1–3, 6, 7, 9, 14, 16, 18–21), GCC shows conserved synteny in 8 pairs (1, 2, 6, 9, 14, 19, 20, 21); GCC shares the same 8 pairs with GCA40, and also the same eight pairs shared between GCA40 and GCA42, grouping them together and closer to each other than the other analyzed karyotypes. From the pairs that are grouped in GCA42 [(4, 8), (10,11), (5,17), (12, 13, 15)], all keep the same number of signals in GCC40, while GCA40 has an extra signal for (5,17) and for (12, 14, 15) (Figure 3). The 16/18 syntenic associations are shared between GCC40 (16/C/16/18) and GCA40 (18/C/16) indicating pericentric inversions (Figures 3, 4).

Compared to GAR, GCC shares five of the individually identified chromosomes (1, 9, 14, 20, 21), as well as the same number of signals in the groups (4, 8) and (12, 13, 15). There is



also a similar chromosome rearrangement in GCC 17 and GAR 13 that is not shared with the other *G. carapo* cytotypes. However, as it is not possible to differentiate between GCA (2n = 42) 12, 13, and 15, we cannot infer that the involved chromosome is the same or is different (Figure 3; Table 2).

Compared to GCP, GCC shares three individual pairs (GCA 1,20,21) and the same number of signals as GCA (4,8), (10,11) and (12, 13, 15). All species share homeology to GCA 1,20,21 (Figure 3; Table 2).

The syntenic block of GCA42 6 is conserved in four of the five analyzed karyotypes by painting, except for GAR (Figure 3; Table 2), in which it is divided into two signals in pairs 4 and 16, while the syntenic block 18 of GCA 42 is shared with GAR, but not with GCC or GCA 40 (Figure 3; Table 2).

## DISCUSSION

*Gymnotus carapo occidentalis* "Catalão" has 2n = 40 (GCC, 30m/sm+10st/a), the same as *G. carapo orientalis* (GCA) 2n = 40 (28m/sm+12st/a), but with a different karyotype. It is hypothesized that the basal diploid number for Gymnotidae is 2n = 52 (da Silva et al., 2019), as the sister species *Electrophorus electricus* and *G. pantherinus* (sister species to all *Gymnotus*, Craig et al., 2019) both have 2n = 52.

This variation in karyotype can be consistently observed along the hydrographic regions. The 2n = 42 is found in the *G. c. orientalis* locations in the "Tocantins-Araguaia" region, while the 2n = 40 is observed in the *G. c. orientalis* (GCA40) located in the "Amazonica" region. While sharing the same 2n GCA40, GCC was sampled in a lake in an area close Negro river, in *G. c. occidentalis* occurrence area and also has significant karyotype differences. The 2n = 48 is found only in *G. c. madeirensis* (Table 1; Figure 1). The higher 2n = 52 and 54 is found only in *G. c. australis*, distributed along the Paraguai, "Paraná" and "Atlântico Sudeste" hydrographic regions.

When compared to all cytotypes of *G. carapo* in the literature, there is a tendency to a reduction in diploid number in the "Amazonica", "Tocantins-Araguaia" and "Atlântico Nordeste Ocidental" hydrographic regions, a trait also shared with *G. arapaima* (Figure 1). Whereas the cytotypes in the "Paraguai", "Paraná" and "Atlântico Sudeste" hydrographic regions have a

**TABLE 2** | Syntenic blocks shared among analyzed species with WCP.

GCA42—*Gymnotus carapo* 2n = 42; GCA40—*G. carapo* 2n = 40; GCC40—*G. carapo* "Catalão" 2n = 40; GAR44 - *G. arapaima* 2n = 44; GCP34—*G. capanema* 2n = 34.

Species	Syntenic blocks
GCA42 x GCA40	GCA42 1, 2, 6, 9, 14, 19, 20, 21
GCC40 X GCA42	GCA42 1, 2, 6, 9, 14, 19, 20, 21
GCC40 X GCA40	GCA42 1, 2, 6, 9, 14, 19, 20, 21
GCC40 X GCA40 X GCA42	GCA42 1, 2, 6, 9, 14, 19, 20, 21
GCA42 x GAR44	GCA42 1, 9, 14, 18, 20, 21
GCA40 x GAR44	GCA42 1, 9, 14, 20, 21
GCC40 X GAR44	GCA42 1, 9, 14, 20, 21
GCC40 X GCA42 X GCA40 x GAR44	GCA42 1, 9, 14, 20, 21
GCA42 x GCP34	GCA42 6, 19, 20, 21
GCA40 x GCP34	GCA42 6, 19, 20, 21
GCC40 x GCP34	GCA42 6, 19, 20, 21
GAR44 x GCP34	GCA42 20, 21
ALL	GCA42 20, 21

higher chromosome number, with all locations having 2n = 54 except in one population that has 2n = 52 (Table 1; Figure 1) similar to more basal 2n in the genus. This suggests that the reduction in diploid number in the amazon region happened after colonization of the area.

Whole chromosome probes of GCA42 have been used in previous studies comparing two cytotypes of *G. carapo* (GCA42 and GCA40), *G. capanema* (GCP34) and *G. arapaima* (GAR44). The results demonstrate highly rearranged karyotypes, more than found by classical cytogenetics alone (Nagamachi et al., 2010; Nagamachi et al., 2013; Machado et al., 2018). The same results are observed in *G. carapo* "Catalão" (present study), confirming that the chromosomal evolution in this group is quite complex.

The karyotypes of the three *G. carapo* cytotypes analyzed by chromosome painting (GCA42, GCA40 and GCC40) are more similar to each other than to those of GAR44 or GCP34 and share a uniform amount of synteny. However, they have multiple species-specific rearrangements, which probably constitute a post zygotic barrier that would result in an inviable or infertile hybrid (Figure 4). We observe the same pattern when compared to *G. arapaima*, explained by the fact that they are sister species with recent divergence (Brochu, 2011) in relation to *G. capanema* (Craig et al., 2019).

This large number of chromosomal rearrangements in *Gymnotus carapo*, demonstrated by chromosome painting, indicates that the different cytotypes constitute a complex of cryptic species as already suggested (Milhomem et al., 2008; Nagamachi et al., 2010). The chromosomal speciation must have played a key role in this process that, if associated with small-inbred demes, could have facilitated the fixation of chromosomal rearrangements (King, 1993).

Currently these cryptic species (with the same morphology but different cytotypes) are in allopatry, which corroborates the pattern found in many Neotropical freshwater fish groups. This could be due to the dynamics of the river networks, including the fragmentation and merging of adjacent rivers, that led to increased species richness closer to the core region of the Amazon basin (Albert and Reis, 2011; Tagliacollo et al.,

2016; Albert et al., 2018a; Albert et al., 2018b; Albert et al., 2020).

The taxonomy of *G. carapo* is quite complex and has been discussed in many studies. Some authors report it as a single generalized species (Craig et al., 2017), other studies show a paraphyletic group within a monophyletic complex of related species (Brochu, 2011; da Silva et al., 2019) and still others suggest it to be a complex of cryptic species (Milhomem et al., 2008; Nagamachi et al., 2010). Within this context, some phylogenetic studies with molecular data show polytomy of the *G. carapo* complex, consisting of *G. carapo*, *G. arapaima*, and *G. ucumari* (Lovejoy et al., 2010; Brochu, 2011) and other studies show species of the subgenus *Gymnotus* nested within *G. carapo* lineages (Lehberg et al., 2018; Craig et al., 2019; da Silva et al., 2019).

In conclusion, the results presented here support that these populations with different cytotypes of *G. carapo* analysed (*G. carapo occidentalis* "Catalão", *G. c. orientalis* GCA42 and GCA 40, along with the geographic-specific  $2n = 48$  and  $2n = 54$ ) may be a cryptic species complex. Analyses by chromosome painting of more cytotypes of *G. carapo* as well as other species of this genus coupled with molecular studies of those samples could help elucidate the chromosomal evolution and pattern of speciation in the group and help identify same-species populations from endemic species that have recently diverged.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data presented in this study are found in the article.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by The Ethics Committee from Para Federal University (Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Pará) approved this research (Permit 68/2015).

## REFERENCES

- Albert, J. S., Craig, J. M., Tagliacollo, V. A., and Petry, P. (2018a). "Upland and lowland Fishes: a Test of the River Capture Hypothesis," in *Mountains, Climate and Biodiversity*. Editors C. Hoorn, A. Perrigo, and A. Antonelli (Chichester: Wiley Blackwell), 273–294.
- Albert, J. S., and Crampton, W. G. R. (2005). "Diversity and Phylogeny of Neotropical Electric Fishes (Gymnotiformes)," in *Electroreception* (New York: Springer), 360–409. doi:10.1017/s1477200005001726
- Albert, J. S. (2001). *Species Diversity and Phylogenetic Systematics of American Knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei)*, 190. Ann Arbor, MI: Miscellaneous Publications. University of Michigan, 1–129.
- Albert, J. S., Tagliacollo, V. A., and Dagosta, F. (2020). Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 51 (1), 27–53. doi:10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032
- Albert, J. S., Val, P., and Hoorn, C. (2018b). The Changing Course of the Amazon River in the Neogene: center Stage for Neotropical Diversification. *Neotrop. Ichthyol.* 16, e180033. doi:10.1590/1982-0224-20180033

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM: Conceptualization; Data Curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Visualization; Writing original draft; Writing review and editing. MS: Investigation; Methodology; Visualization; Writing review and editing. EF: Investigation; Methodology; Funding acquisition; Visualization; Writing review and editing. PM: Investigation; Methodology; Visualization; Writing review and editing. MF-S: Investigation; Methodology; Resources; Visualization; Writing review and editing. JP: Data Curation; Formal analysis; Funding acquisition; Resources; Visualization; Writing review and editing. CN: Data Curation; Formal analysis; Funding acquisition; Project administration; Resources; Supervision; Visualization; Writing review and editing.

## FUNDING

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support on a project coordinated by CN (Edital Pró-Amazônia Proc 047/2012); the FAPESPA for financial support (Edital Vale-Proc 2010/110447) and Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social-BNDES (2.318.697.0001) on a project coordinated by JP; the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support on project coordinated by EF (Edital Universal Proc 473812/2011-8), CYN (305880/2017-9), JP (305876/2017-1) and EF (301886/2019-9), are grateful to CNPq for Productivity Grants and MS (160155/2018-5) for a scholarship from CNPq. This study is part of the Doctoral Thesis in Genetic and Molecular Biology of MM who is recipient of a CNPq Doctor Scholarship.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to members of the team of the cytogenetics laboratory UFPA for the fieldwork and chromosomal preparations. To MSc. Jorge Rissino, to MSc. Shirley Nascimento and Maria da Conceição for assistance in laboratory work.

- Almeida, J. S., Miguez, V. H., Diniz, D., and Affonso, P. R. A. M. (2015). A Unique Sex Chromosome System in the Knifefish *Gymnotus Bahianus* with Inferences about Chromosomal Evolution of Gymnotidae. *J. Hered.* 106, 177–183. doi:10.1093/jhered/esu087
- Barby, P. P., Bertollo, L. A. C., de Oliveira, E. A., Yano, C. P., Hatanaka, T., Ráb, P., et al. (2019). Emerging Patterns of Genome Organization in Notopteridae Species (Teleostei, Osteoglossiformes) as Revealed by Zoo-FISH and Comparative Genomic Hybridization (CGH). *Sci. Rep.* 9 (1), 1112. doi:10.1038/s41598-019-38617-4
- Braga, B. P. F., Flecha, R., Pena, D. S., and Kelman, J. (2008). Pacto federativo e gestão de águas. *Estud. Av.* 22 (63), 17–42. doi:10.1590/S0103-40142008000200003
- Brochu, K. (2011). Molecular Phylogenetics of the Neotropical Electric Knifefish Genus *Gymnotus* (Gymnotidae, Teleostei): Biogeography and Signal Evolution of the Trans-andean Species. [Master dissertation]. Toronto (ON): University of Toronto.
- Cardoso, A. L., Ready, J. S., Pieczarka, J. C., Milhomem, S. S. R., Figueiredo-Ready, W. M. B. d., Silva, P. H. R., et al. (2015). Chromosomal Variability between

- Populations of *Electrophorus Electricus* Gill, 1864 (Pisces: Gymnotiformes: Gymnotidae). *Zebrafish* 12 (6), 440–447. doi:10.1089/zeb.2014.1059
- Carvalho, P. C., de Oliveira, E. A., Bertollo, L. A. C., Yano, C. F., Oliveira, C., Decru, E., et al. (2017). First Chromosomal Analysis in Hepsetidae (Actinopterygii, Characiformes): Insights into Relationship between African and Neotropical Fish Groups. *Front. Genet.* 8, 203. doi:10.3389/fgene.2017.00203
- Cioffi, M. B., Ráb, P., Ezaz, T., Bertollo, L. A. C., Lavoué, S., Oliveira, E. A., et al. (2019). Deciphering the Evolutionary History of Arowana Fishes (Teleostei, Osteoglossiformes, Osteoglossidae): Insight from Comparative Cytogenomics. *Ijms* 20, 4296. doi:10.3390/ijms20174296
- Cioffi, M. d. B., Yano, C. F., Sember, A., and Bertollo, L. A. C. (2017). Chromosomal Evolution in Lower Vertebrates: Sex Chromosomes in Neotropical Fishes. *Genes* 8, 258. doi:10.3390/genes8100258
- Claro, F. L. (2008). *Gymnotus Carapo and Gymnotus Sylvius (Teleostei: Gymnotidae): Uma Abordagem Citogenético-Molecular. Master's Dissertation.* São Paulo, SP: Universidade de São Paulo.
- Craig, J. M., Crampton, W. G. R., and Albert, J. S. (2017). Revision of the Polytypic Electric Fish *Gymnotus carapo* (Gymnotiformes, Teleostei), with Descriptions of Seven Subspecies. *Zootaxa* 4318, 401–438. doi:10.11646/zootaxa.4318.3.1
- Craig, J. M., Kim, L. Y., Tagliacollo, V. A., and Albert, J. S. (2019). Phylogenetic Revision of Gymnotidae (Teleostei: Gymnotiformes), with Descriptions of Six Subgenera. *PLoS One* 14 (11), e0224599. doi:10.1371/journal.pone.0224599
- da Silva, M. (2015). Análise Biogeográfica do Gênero *Gymnotus* (Gymnotidae, Gymnotiformes), Por Meio de Marcadores Cariotípicos e Moleculares. Dissertation. Manaus, AM: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- da Silva, M., Barbosa, P., Artoni, R. F., and Feldberg, E. (2016). Evolutionary Dynamics of 5S rDNA and Recurrent Association of Transposable Elements in Electric Fish of the Family Gymnotidae (Gymnotiformes): the Case of *Gymnotus Mamiraua*. *Cytogenet. Genome Res.* 149, 297–303. doi:10.1159/000449431
- da Silva, M., Matoso, D. A., Artoni, R. F., and Feldberg, E. (2019). Karyotypic Diversity and Evolutionary Trends in Neotropical Electric Fish of the Genus *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae). *Zebrafish* 16 (3), 308–320. doi:10.1089/zeb.2018.1716
- da Silva, M., Matoso, D. A., Artoni, R. F., and Feldberg, E. (2014). New Approach Data in Electric Fish (Teleostei: Gymnotus): Sex Chromosome Evolution and Repetitive DNA. *Zebrafish* 11, 528–535. doi:10.1089/zeb.2013.0966
- da Silva, M., Matoso, D. A., Vicari, M. R., de Almeida, M. C., Margarido, V. P., and Artoni, R. F. (2011). Physical Mapping of 5S rDNA in Two Species of Knifefishes: *Gymnotus Pantanal* and *Gymnotus Paraguensis* (Gymnotiformes). *Cytogenet. Genome Res.* 134, 303–307. doi:10.1159/000328998
- de Freitas, N. L., Al-Rikabi, A. B. H., Bertollo, L. A. C., Ezaz, T., Yano, C. F., de Oliveira, E. A., et al. (2018). Early Stages of XY Sex Chromosomes Differentiation in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) Revealed by DNA Repeats Accumulation. *Cg* 19 (3), 216–226. doi:10.2174/1389202918666170711160528
- de Moraes, R. L. R., Bertollo, L. A. C., Marinho, M. M. F., Yano, C. F., Hatanaka, T., Barby, F. F., et al. (2017). Evolutionary Relationships and Cytotaxonomy Considerations in the Genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). *Zebrafish* 14 (6), 536–546. doi:10.1089/zeb.2017.1465
- de Oliveira, E. A., Sember, A., Bertollo, L. A. C., Yano, C. F., Ezaz, T., Moreira-Filho, O., et al. (2017). Tracking the Evolutionary Pathway of Sex Chromosomes Among Fishes: Characterizing the Unique XX/XY1Y2 System in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). *Chromosoma* 127 (1), 115–128. doi:10.1007/s00412-017-0648-3
- Fernandes-Matioli, F. M. C., Marchetto, M. C. N., Almeida-Toledo, L. F., and Toledo-Filho, S. A. (1998). High Intraspecific Karyological Conservation in Four Species of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) from Southeastern Brazilian Basins. *Caryologia* 51, 221–234. doi:10.1080/00087114.1998.10797414
- Ponteles, S. B. A., Lopes, C. E., Akama, A., Fernandes, F. M. C., Porto-Foresti, P., Senhorini, J. A., et al. (2008). Cytogenetic Characterization of the Strongly Electric Amazonian Eel, *Electrophorus Electricus* (Teleostei, Gymnotiformes), from the Brazilian Rivers Amazon and Araguaia. *Genet. Mol. Biol.* 31, 227–230. doi:10.1590/S1415-47572008000200010
- Foresti, F., de Almeida Toledo, L. F., and de Almeida Toledo, S. (1984). Chromosome Studies in *Gymnotus Carapo* and *Gymnotus Sp.* (Pisces, Gymnotidae). *Caryologia* 37, 141–146. doi:10.1080/00087114.1984.10797693
- Hijmans, R. J., Guarino, L., Bussink, C., Mathur, P., Cruz, M., Barrentes, I., et al. DIVA-GIS. Vsn 5.0. A Geographic Information System for the Analysis of Species Distribution Data. 2004. Available at: <http://www.diva-gis.org>.
- J. S. Albert and R. Reis (Editors) (2011). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (Berkeley, USA: Univ of California Press). doi:10.1525/california/9780520268685.001.0001
- Kim, L. Y., Crampton, W. G. R., and Albert, J. S. (2020). Two New Species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from Brazil and Historical Biogeography of the Subgenus *Lamontianus*. *Copeia* 108 (3), 468–484. doi:10.1643/ci-19-205
- King, M. (1993). *Species Evolution - the Role of Chromosome Change*. Cambridge, England: Cambridge University Press, 335.
- Lehmberg, E. (2015). *Biogeography of the Weakly Electric Knifefish Gymnotus carapo (Teleostei: Gymnotidae) in the Guianas.* Toronto: University of Toronto. Available at: [https://space.library.utoronto.ca/bitstream/1807/69686/3/Lehmberg\\_Emma\\_S\\_201506\\_MSc\\_thesis.pdf](https://space.library.utoronto.ca/bitstream/1807/69686/3/Lehmberg_Emma_S_201506_MSc_thesis.pdf) (Accessed January 19, 2022).
- Lehmberg, E. S., Elbassiouny, A. A., Bloom, D. D., López-Fernández, H., Crampton, W. G. R., and Lovejoy, N. R. (2018). Fish Biogeography in the "Lost World" of the Guiana Shield: Phylogeography of the Weakly Electric Knifefish *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotidae). *J. Biogeogr.* 45, 815–825. doi:10.1111/jbi.13177
- Levan, A., Fredga, K., and Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas* 52, 201–220. doi:10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- Lovejoy, N. R., Lester, K., Crampton, W. G. R., Marques, F. P. L., and Albert, J. S. (2010). Phylogeny, Biogeography, and Electric Signal Evolution of Neotropical Knifefishes of the Genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 54, 278–290. doi:10.1016/j.ympev.2009.09.017
- Machado, M. A., Pieczarka, J. C., Silva, F. H. R., O'Brien, P. C. M. O., Ferguson-Smith, M. A., and Nagamachi, C. Y. (2018). Extensive Karyotype Reorganization in the Fish *Gymnotus arapaima* (Gymnotiformes, Gymnotidae) Highlighted by Zoo-FISH Analysis. *Front. Genet.* 9 (8), 1–19. doi:10.3389/fgene.2018.00008
- Machado, M. d. A., Cardoso, A. L., Milhomem-Paixão, S. S. R., Pieczarka, J. C., and Nagamachi, C. Y. (2017). *Gymnotus Coatesi* (Gymnotiformes): a Case of Colocation of Multiple Sites of 18S rDNA with Telomeric Sequences. *Zebrafish* 14, 459–463. doi:10.1089/zeb.2017.1435
- Mago-Leccia, P. (1994). *Electric Fishes of the continental Waters of America: Classification and Catalogue of the Electric Fishes of the Order Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi), with Descriptions of New Genera and Species.* Caracas, Venezuela: Fundacion para Desarrollo de las Ciencias Fisicas, Matematicas y Naturales.
- Margarido, V. P., Bellafrente, E., and Moreira-Filho, O. (2007). Cytogenetic Analysis of Three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) Species Verifies Invasive Species in the Upper Paraná River basin, Brazil. *J. Fish. Biol.* 70, 155–164. doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01365.x
- Milhomem, S. S., Pieczarka, J. C., Crampton, W. G., Silva, D. S., De Souza, A. C., Carvalho, J. R., et al. (2008). Chromosomal Evidence for a Putative Cryptic Species in the *Gymnotus carapo* Species-Complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genet.* 9, 75. doi:10.1186/1471-2156-9-75
- Milhomem, S. S. R., Crampton, W. G. R., Pieczarka, J. C., dos Santos Silva, D., Cardoso, A. L., da Silva, P. C., et al. (2012b). Chromosomal and Electric Signal Diversity in Three Sympatric Electric Knifefish Species (Gymnotus, Gymnotidae) from the central Amazon Floodplain. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 22, 485–497. doi:10.1007/s11160-011-9239-1
- Milhomem, S. S. R., Crampton, W. G. R., Pieczarka, J. C., Shetka, G. H., Silva, D. S., and Nagamachi, C. Y. (2012a). *Gymnotus Capanema*, a New Species of Electric Knife Fish (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Eastern Amazonia, with Comments on an Unusual Karyotype. *J. Fish. Biol.* 80, 802–815. doi:10.1111/j.1095-8649.2012.03219.x
- Milhomem, S. S. R., Pieczarka, J. C., Crampton, W. G. R., De Souza, A. C. P., Carvalho Jr, J. R., Jr., and Nagamachi, C. Y. (2007). Differences in Karyotype between Two Sympatric Species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Eastern Amazon of Brazil. *Zootaxa* 1397, 55–62. doi:10.11646/zootaxa.1397.710.11646/zootaxa.1397.1.7
- Milhomem, S. S. R., Scacchetti, P. C., Pieczarka, J. C., Ferguson-Smith, M. A., Pansonato-Alves, J. C., O'Brien, P. C. M., et al. (2013). Are NORs Always Located on Homeologous Chromosomes? A FISH Investigation with rDNA

- and Whole Chromosome Probes in Gymnotus Fishes (Gymnotiformes). *PLoS ONE* 8, e55608. doi:10.1371/journal.pone.0055608
- Nagamachi, C. Y., Pieczarka, J. C., Milhomem, S. S., O'Brien, P. C., de Souza, A. C., and Ferguson-Smith, M. A. (2010). Multiple Rearrangements in Cryptic Species of Electric Knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) Revealed by Chromosome Painting. *BMC Genet.* 11, 1. doi:10.1186/1471-2156-11-28
- Nagamachi, C. Y., Pieczarka, J. C., Milhomem, S. S. R., Batista, J. A., O'Brien, P. C. M., and Ferguson-Smith, M. A. (2013). Chromosome Painting Reveals Multiple Rearrangements between *Gymnotus capanema* and *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes). *Cytogenet. Genome Res.* 141, 163–168. doi:10.1159/000354988
- Ráb, P., Rábová, M., Pereira, C. S., Collares-Pereira, M. J., and Pelikánová, Š. (2008). Chromosome Studies of European Cyprinid Fishes: Interspecific Homology of Leuciscine Cytotaxonomic Marker-The Largest Subtelocentric Chromosome Pair as Revealed by Cross-Species Painting. *Chromosome Res.* 16, 863–873. doi:10.1007/s10577-008-1245-3
- R. Fricke, W. N. Eschmeyer, and R. van der Laan (Editors) (2021). *Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References*. (San Francisco, United States: California Academy of Sciences). Available at: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.
- Scacchetti, P., Pansonato-Alves, J., Utsunomia, R., Oliveira, C., and Foresti, F. (2011). Karyotypic Diversity in Four Species of the Genus *Gymnotus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): Physical Mapping of Ribosomal Genes and Telomeric Sequences. *Cyg* 5, 223–235. doi:10.3897/compcytogen.v5i3.1375
- Scudeler, P. E. S., Diniz, D., Wasko, A. P., Oliveira, C., and Foresti, F. (2015). Whole Chromosome Painting of B Chromosomes of the Red-Eye Tetra *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *Cyg* 9 (4), 661–669. doi:10.3897/CompCytogen.v9i4.5460
- Tagliacollo, V. A., Bert, M. J., Craig, J. M., Oliveira, C., and Albert, J. S. (2016). Model-based Total Evidence Phylogeny of Neotropical Electric Knifefishes (Teleostei, Gymnotiformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 95, 20–33. doi:10.1016/j.ympev.2015.11.007
- Utsunomia, R., Melo, S., Scacchetti, P. C., Oliveira, C., Machado, M. d. A., Pieczarka, J. C., et al. (2018). Particular Chromosomal Distribution of Microsatellites in Five Species of the Genus *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes). *Zebrafish* 15 (4), 398–403. doi:10.1089/zeb.2018.1570
- Utsunomia, R., Scacchetti, P. C., Pansonato-Alves, J. C., Oliveira, C., and 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. *Cytogenet. Genome Res.* 142, 286–292. doi:10.1159/000362258
- Utsunomia, R., Silva, D. M. Z. d. A., Ruiz-Ruano, F. J., Araya-Jaime, C., Pansonato-Alves, J. C., Scacchetti, P. C., et al. (2016). Uncovering the Ancestry of B Chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *PLoS ONE* 11 (3), e0150573. doi:10.1371/journal.pone.0150573
- Vicari, M. R., de Mello Pistone, H. P., Castro, J. P., de Almeida, M. C., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O., et al. (2011). New Insights on the Origin of B Chromosomes in *Astyanax scabripinnis* Obtained by Chromosome Painting and FISH. *Genetica* 139, 1073–1081. doi:10.1007/s10709-011-9611-z
- Yang, F., Carter, N. P., Shi, L., and Ferguson-Smith, M. A. (1995). A Comparative Study of Karyotypes of Muntjacs by Chromosome Painting. *Chromosoma* 103, 642–652. doi:10.1007/BF00357691
- Yano, C. P., Bertollo, L. A. C., Ezaz, T., Trifonov, V., Sember, A., Liehr, T., et al. (2017). Highly Conserved Z and Molecularly Diverged W Chromosomes in the Fish Genus *Tripottheus* (Characiformes, Tripottheidae). *Heredity* 118 (3), 276–283. doi:10.1038/hdy.2016.83

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Machado, da Silva, Feldberg, O'Brien, Ferguson-Smith, Pieczarka and Nagamachi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### 3.2- Capítulo 2 – *Gymnotus pantanal*

#### Chromosome Painting in *Gymnotus pantanal* (Gymnotiformes):

##### A case of $X_1X_1X_2X_2 / X_1X_2Y$ sexual system

Milla de Andrade Machado<sup>1</sup>, Ananda Marques Pety<sup>1</sup>, Fernando Henrique Silva<sup>1</sup>, Vladimir Pavan Margarido<sup>3</sup>, Elisangela Bellafronte da Silva<sup>4</sup>, Patricia Mary Caroline O'Brien<sup>5</sup>, Malcolm Andrew Ferguson-Smith<sup>5</sup>, Julio Cesar Pieczarka<sup>1</sup>, Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Pará, UFPA, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, ICB, Laboratório de Citogenética, Campus Guamá, Avenida Perimetral, SN, Guamá, Belém, PA, Brasil. CEP: 66075-900

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Genética, Cascavel, PR, Brazil.

<sup>3</sup> Centro Universitário União das Américas, Foz do Iguaçu, PR, Brazil.

<sup>4</sup> Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

## INTRODUCTION

*Gymnotus* is the most specie-rich genus of the Gymnotiformes order, the electric knifefishes, with 46 valid species (Ferraris Jr. et al., 2017; Craig et al., 2018a, 2018b; Campos da Paz and de Santana, 2019; Craig et al., 2019; Kim et al., 2020; Fricke et al., 2021), with a wide distribution in the neotropical region, present in Central and South America with the higher diversity found in the Amazon-Orinoco-Guiana basins (Mago-Leccia, 1994; Albert, 2001; Albert and Crampton, 2005). This genus is also extremely diverse cytogenetically, with high variability in chromosome numbers, ranging from  $2n=34$  in *Gymnotus capanema* (Milhomem et al., 2012a) to  $2n=54$  in *G. carapo* (Foresti et al., 1984), *G. mamiraua* (Milhomem et al., 2007), *G. paraguensis* (Margarido et al., 2007) and *G. inaequilabiatus* (Scacchetti et al., 2011). It is divided in six subgenera: *Gymnotus*, *Tijax*, *Tigre*, *Lamontianus*, *Tigrinus* and *Pantherus* (Craig et al., 2019). Most part of this karyotypic plasticity is found within the *Gymnotus* subgenus (Former *Gymnotus carapo* clade, Tagliacolo et al., 2016), with other subgenera the number varies from 48 to 54 chromosomes, many sharing the  $2n=52$ .

Chromosome painting studies in *Gymnotus* also show complex chromosome reorganization, even between closely related species (Nagamachi et al., 2010, 2013; Machado et al., 2018, 2022). It can tell in a more accurate resolution what are the chromosomal evolution mechanisms that most probably resulted in the diversity found and it also can help with understanding which chromosomes are involved in the formation of sexual chromosome systems. The emergence of sex chromosomes in fish has been reported as an event of recent origin, defined as turnover by Kitano and Peichel (2012), where they are characterized by having little heterochromatin and high homology between homologs. However, for the fixation of the “new” sex chromosomes to take place, a process of heterochromatinization of the heteromorphic chromosome is required, as a process of silencing and dose compensation. It is through this process that the specific chromosomes for sex determination are repressed and the recombination between the protosexuals is suppressed and thus they are established in the species (Charlesworth et al., 2005).

While most species of the genus show no sexual chromosome differentiation, within this exuberant chromosomal diversity is found different sexual chromosome systems: XX/XY in *Gymnotus* sp. “Negro” (da Silva et al., 2014); XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> in *G. interruptus* (Almeida et al.,

2015;  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ , *G. coropinae* and *G. pantanal*, (Fernandes et al., 2005; da Silva et al., 2014;). *Gymnotus (Gymnotus) pantanal* is one of the four species of *Gymnotus* with a sexual chromosome system, with  $2n=40$  for females and  $2n=39$  for males ( $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ), in all 3 populations studied, two on the Paraná state, and another in São Paulo (Fernandes et al., 2005; da Silva et al., 2011; Utsunomia et al., 2014). Here we present the chromosome painting of this species with the aim of helping understand further the evolution of the karyotype diversity in the *Gymnotus* genus and the evolution of the sexual chromosome system in this species.

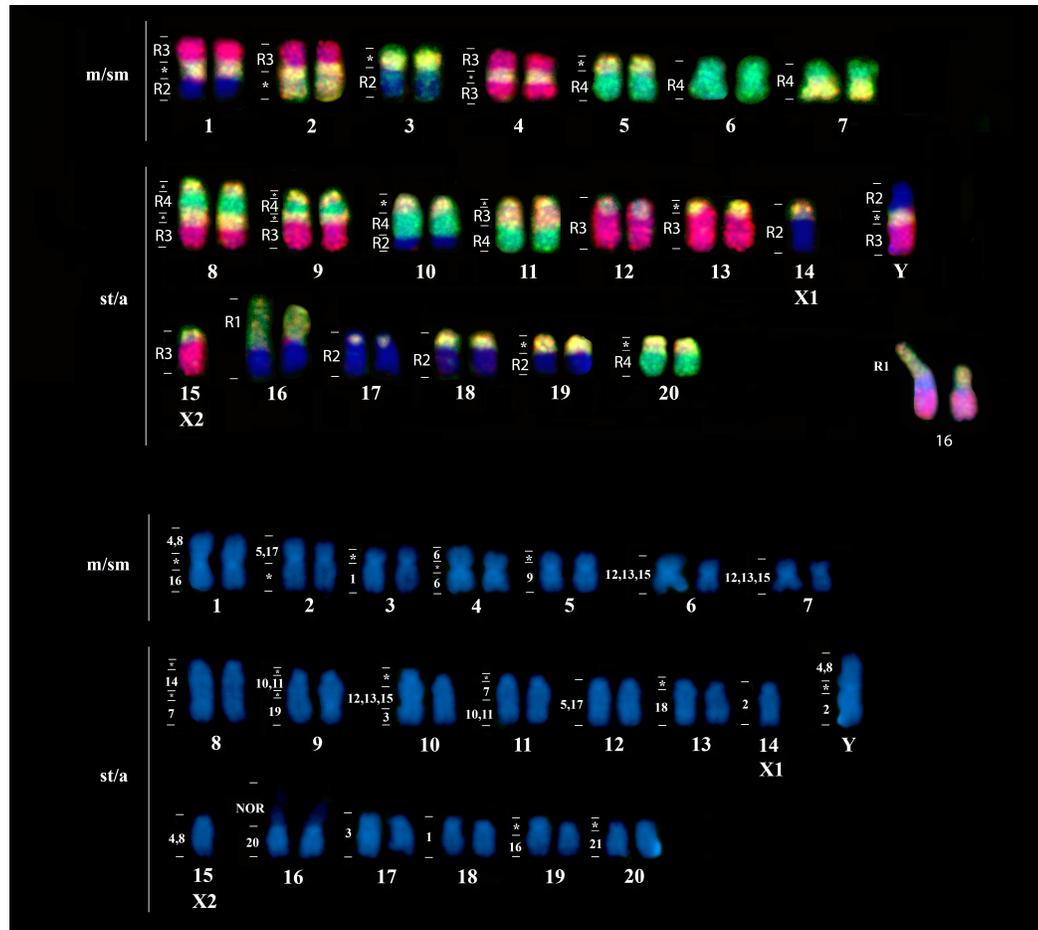
## MATERIAL AND METHODS

Cell suspensions from *G. pantanal* from Paraná basin were already available in our laboratory. Whole Chromosome Probes from *G. carapo* ( $2n=42$ ; 30 m/sm + 12 st/a) described in Nagamachi et al. (2010) were hybridized onto metaphases of *G. pantanal*. Chromosome painting techniques followed Yang et al. (1995) with the modifications proposed by Nagamachi et al. (2010). The scheme followed for the experiment and probes used is illustrated in Machado et al. (2017). Chromosomes were morphologically classified according to Levan et al. (1964), with modifications. The karyotype was organized according to Margarido et al. (2007).

## RESULTS

The regions of homology with *G. carapo* (GCA;  $2n=42$ ) are indicated on the karyotype of *G. pantanal* (GPT) arranged from DAPI-stained chromosomes (Figure 1). Dual color FISH with the probes of R3 (GCA 4–8 and 17–19; red) and R4 (GCA 9–15 and 21; green) defined the chromosome groups corresponding to the 4 regions in *G. carapo*. Chromosome segments hybridizing with 2 colors indicated repetitive DNA sequences. The chromosomes or segments in blue (DAPI) represent the NOR-bearing chromosomes (GCA20) and the chromosomes corresponding to R2 (GCA 1–3 and 16). From the 12 chromosome pairs of *G. carapo* that can be individually differentiated (GCA 1–3, 6, 7, 9, 14, 16 and 18–21), 6 pairs (GCA 6, 9, 14, 19, 20, 21) conserved homeology within GPT. GCA 20 hybridizes one whole chromosome, pair 16. Four chromosome pairs (GCA 1, 2, 3, 7, 16, and 18) showed 2 signals on GPT chromosomes. From the GCA probes that represent two chromosome pairs (4,8), (10,11) and

(5,17) all revealed 2 signals, and the one that represent three pairs (12,13,15) revealed 3 signals on the GPT chromosomes. The following chromosome associations were found in GPT: GPT 1: [4,8]/C/16; GPT 8: 14/C/14/7; GPT 9: [10,11]/C/[10,11]/19; GPT 10: [12,13,15]/C/[12,13,15]/3; GPT 11: 7/C/7/ [10,11]; CPT Y: 2/C/[4,8] where C = centromere (Figure 1 and 2)



**Figure 1: Karyotype of GPT. A – With Dual color fish with probes of R3 (GCA 4–8 and 17–19; red) and R4 (GCA 9–15 and 21; green): Chromosome segments hybridizing with 2 colors indicated repetitive DNA sequences; Chromosomes or segments in blue (DAPI) represent the NOR-bearing chromosomes (GCA20) and chromosomes corresponding to R2 (GCA 1–3 and 16). B- With DAPI: the numbers on the right represent the GCA equivalent chromosomes. C – NOR bearing chromosome pair GPT 16, hybridized with GCA20.**

## Discussion

Our results demonstrate a genomic reorganization in the analyzed species is greater than assumed by classical cytogenetics studies. The Gymnotiformes order is very diverse

karyotypically, not only in diploid number (from  $2n=24$  in *Apteronotus albifrons*, Almeida-Toledo *et al.*, 1981; to  $2n=74$  in *Rhabdolichops cf eastward*, Suárez *et al.*, 2017) but also in the karyotype formula and location of repetitive sequences (de Almeida-Toledo *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2014, 2019; Araya-Jaime *et al.*, 2017, 2022; Sousa *et al.*, 2017; Utsunomia *et al.*, 2018). Molecular cytogenetic studies in Gymnotiformes have shown dynamic reorganization, including pericentric inversions observed through repetitive DNA position (Fernandes *et al.*, 2017), sequence dispersion via transposable elements and the association between different repetitive sequences (Utsunomia *et al.*, 2014, da Silva *et al.*, 2016 and Machado *et al.*, 2017) and the presence of different sex chromosome systems (Margarido *et al.*, 2007; Henning *et al.*, 2008, 2011; da Silva *et al.*, 2011, 2014; Almeida *et al.*, 2015). This evolutionary plasticity of the karyotype is reflected to an even greater degree in the present study, and in the studies of Nagamachi *et al.* (2010, 2013) and Machado *et al.* (2018, 2022) (Figure 2).

Whole chromosome probes from *G. carapo orientalis* (GCA  $2n=42$ ) have been used for comparative genomic mapping of the karyotype of i) *G. carapo orientalis* (GCA  $2n=40$  Nagamachi *et al.*, 2010), ii) *G. capanema* GCP  $2n=34$  (Nagamachi *et al.*, 2013), iii) *G. arapaima* GAR  $2n=44$  (Machado *et al.* 2018), iv) *G. carapo occidentalis* “Catalão” (GCC  $2n=40$ , Machado *et al.* 2022) and, in the present work v) *G. pantanal* (GPT  $2n=39/40$ ). Similar to the observations in the previously mapped species GPT also presents a highly reorganized karyotype (Figure 2) in relation to GCA  $2n=42$  and also in relation to the other analyzed species. From the 12 chromosome pairs of GCA  $2n=42$  that can be individually differentiated, GPT: a) shows conserved synteny of the same 6 pairs (GCA 6, 9, 14, 19, 20, 21) with all three *G. carapo* species, b) shares 4 pairs (GCA 9, 14, 20, 21) with GAR and c) three pairs (GCA 6, 20, 21) with GCP. It is also worth noting that the probes representing GCA [4,8] and [12,13,15] show two and three signals, respectively, in three species (GCA 42, GCP and GAR) indicating that these chromosomes may have retained their homeology.



From the pairs that are grouped [4,8], [10,11], [5,17], [12,13,15], in GPT all keep the same number of signals from GCA42 and GCC, with GCA40 having one extra signal for [4,8]; GCA40, GAR and GCP having one extra signal for [5,17]; GAR having one extra signal for [10,11] and GCA40 for [12,14,15]; GPT also shares 2 chromosome rearrangements with GAR: GPT 9: [10,11]/C/[10,11]/19; GPT 10: [12,13,15]/C/[12,13,15]/3.

A comparative analysis of the data described above (Figure 2) shows that the karyotype of *G. pantanal* is more similar to *G. carapo orientalis* (GCA40 and GCA42), *G. carapo occidentalis* “Catalão” and *G. arapaima* than that of *G. capanema*, even though Craig *et al.* (2019) groups *G. pantanal* and *G. capanema* as sister species in a more basal position within the subgenus *Gymnotus*. That could be due to the fact that there was no molecular data for *G. capanema*, added to the fact that this species has a  $2n$  significantly lower than the other *Gymnotus* species. It is worth noting that the *G. pantanal* specimen studied is in a completely different Basin from all other species analyzed by chromosome painting but still shares many homeologies with the other species, all within the same group of chromosome pairs (GCA 6, 9, 14, 19, 20, 21), while also having specie-specific rearrangements. Lande (1977) theorizes that the rates of chromosomal rearrangement are proportional to selection and inversely proportional to the effective size of the population. Araya-Jaime (2017) suggests that this could be considered a general model of chromosomal evolution within Gymnotiformes, since populations with little or no gene flow may facilitate the fixation of chromosomal rearrangements within a particular species in a shorter evolutionary time. This may be a contributory factor to speciation within the group and may also contribute to the higher number of rearrangements found within each specie analyzed.

It is hypothesized that the basal diploid number for Gymnotidae is  $2n = 52$  (da Silva *et al.*, 2019), as the sister species *Electrophorus electricus* and *G. pantherinus* (sister species to all *Gymnotus*, Craig *et al.*, 2019) both have  $2n = 52$ . The lower  $2n$  found on the analyzed species points to the shared chromosomal homeologies being present on the ancestor of the *Gymnotus* subgenus. Taken together, the sum of the results might explain the difficulty in finding synapomorphies among the species compared so far, since most of the rearrangements might have become fixed after the species became isolated.

Sex chromosomes have already been reported in several genera of Gymnotiformes, such as *Brachyhypopomus*, *Steatogenys*, *Eigenmannia* and *Gymnotus* (de Almeida-Toledo et al., 2000; de Almeida-Toledo and Foresti 2001; Silva and Margarido 2005; Cardoso et al., 2011). In *Gymnotus*, until now sex chromosomes are restricted to *Gymnotus* sp. “Negro”  $2n=50$  XX/XY, *G. interruptus*  $2n=37♂/36♀$  XX/XY1Y2 (Almeida et al., 2015; Rangel-Pereira and Ottoni 2021), *G. coropinae*  $2n=49♂/50♀$  X1X1X2X2/X1X2Y, *G. pantanal*  $2n=39♂/40♀$  with X1X1X2X2/X1X2Y (Margarido et al., 2007; da Silva et al., 2011a) and meiotic analysis confirmed the presence of sex chromosomes in *G. pantanal* and evidenced the recent emergence of this system (da Silva et al. 2011), visualized by the homology between X1, X2 and the Y chromosome, that are hybridized by the GCA42 chromosomes [4,8] and 2.

The origin of sex chromosomes in fish, even in phylogenetically related species as seen with Gymnotiformes, can occur independently, as a result of structural rearrangements of the ancestral sex chromosomes and autosomes (Hening et al., 2010; Kitano and Peichel 2012). In general fish sex chromosomes typically represent early phases of differentiation with no pronounced changes in their morphology, size, and genetic content (Schartl et al., 2016, Sember et al., 2021), This could be owing to the high plasticity of fish sex chromosomes and their frequent turnovers, which repeatedly reset the process of sex chromosome differentiation (Sember et al., 2021). The multiple sex chromosome system X1X1X2X2/X1X2Y found in *G. pantanal* is the most prevalent in fishes (Sember et al., 2021), usually, as is with *G. pantanal*, formed by a centric or tandem fusion of the ancestral Y with an autosome forming a large bi-armed chromosome.

The identification of the chromosomes involved in the formation of the Y chromosome in *G. pantanal* is a important step in understanding this evolutionary process, enabling to observe behavior of the same chromosomes across the karyotypes of different species, and possible compare with the origin of the sex chromosome systems of other *Gymnotus* species. With diverse karyotypes including different sex chromosome systems, chromosome painting on the genus is becoming an invaluable tool to help understand the evolution in the group, identify and differentiate closely related species and identify in the future possible sequences

and/or chromosomes associated with the origin of sex chromosome in the group.

### 3.3- Capítulo 3 – Sequências repetitivas

Dois indivíduos machos e duas fêmeas de *Gymnotus carapo* “Catalão”,  $2n = 40$  foram sequenciados pela plataforma Illumina Miseq. Para identificação dos DNAs repetitivos provenientes do sequenciamento de nova geração, foi utilizado o método de agrupamentos de semelhantes pelo programa RepeatExplorer (Novak et al., 2013), que permite a montagem de novo de elementos repetitivos de DNA através da formação de gráficos baseados na similaridade entre reads. Dos clusters escolhidos foram selecionados os contigs com maior tamanho e maior cobertura para busca de DNAs satélites com o uso da ferramenta Tandem Repeat Finder (Benson 1999). Esses contigs foram também alinhados contra bancos de dados (Genkbank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> e Repbase, <https://www.girinst.org/replib/>) para anotação. A partir disso, primers para amplificação de sequências pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Tabela 1) foram desenhados manualmente e sua eficiência foi verificada no programa Primer3 (Untergasser et al., 2012).

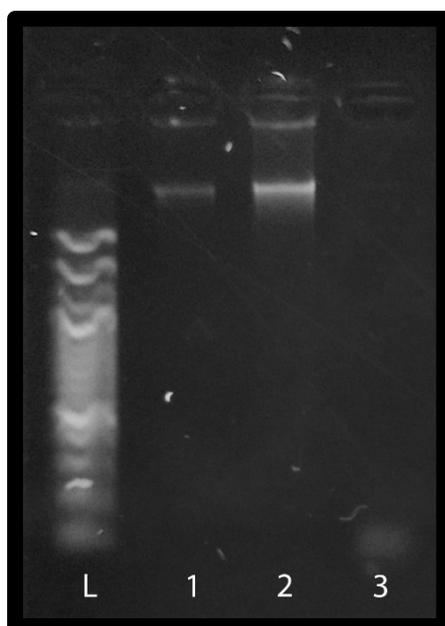
As reações de PCR consistiram de 15,7 uL de água ultrapura, 2,5 uL de Tampão 10X, 1 uL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 uL de DNTP (10 mM), 1 uL de primer forward (10 mmol), 1 uL de primer reverse (10 mmol), 2,5 uL de DNA de *G. carapo* “catalão” (Figura 1) e 0,3 uL de Taq Platinum (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) nas seguintes condições 94°C por 2 minutos, 45 ciclos (94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos) e 72°C por 5 minutos. Os produtos das reações foram observados em gel de agarose 2% (Figura 2). Todas as sequencias, com exceção do GymSat-CL1 e GCCSat10, foram amplificadas com sucesso (Tabela 1, Figura 2).

Das sequências amplificadas e hibridizadas em lâminas de *Gymnotus carapo* “Catalão”, as sequencias GymSat-CL7, GymSat-CL14, GymSat-CL17, GymSat-CL34, GCaSat1 e GCaSat2 mostraram resultados positivos (Figura 3, Tabela 1). A sequência GymSat-CL7 possui marcação na região centromérica dos cromossomos. GymSat-CL14 marca na região telomérica, com algumas marcações intersticiais em alguns pares. GymSat-

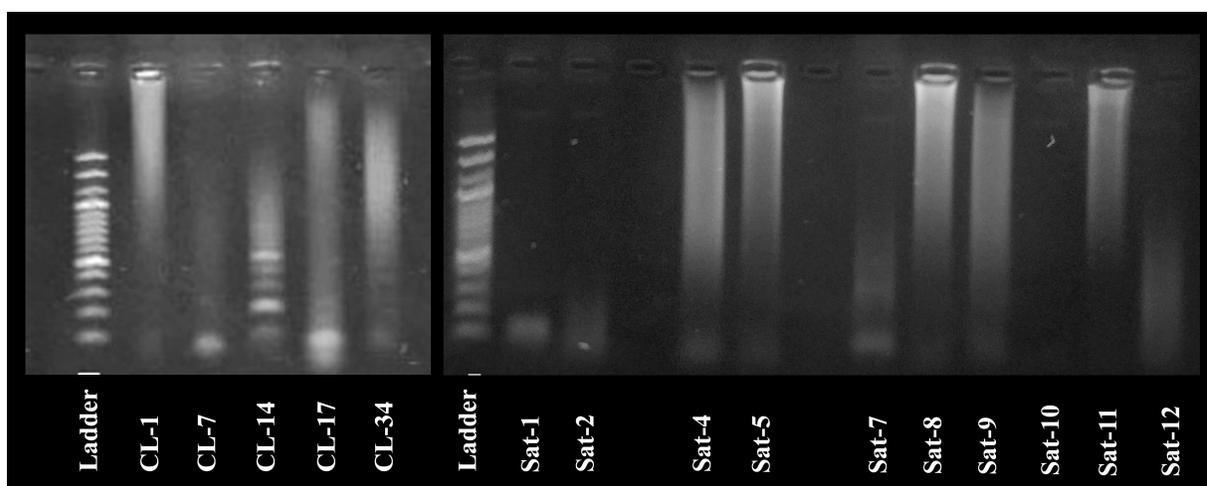
CL17 marca em sobreposição com a NOR. GymSat-CL34 marca na região pericentromérica da maioria dos cromossomos. GCaSat1 marca tanto em regiões pericentroméricas como em regiões intersticiais e GCaSat2 marca em regiões teloméricas e pericentroméricas dos cromossomos.

**Tabela 1-** Resultados preliminares das sequências repetitivas.

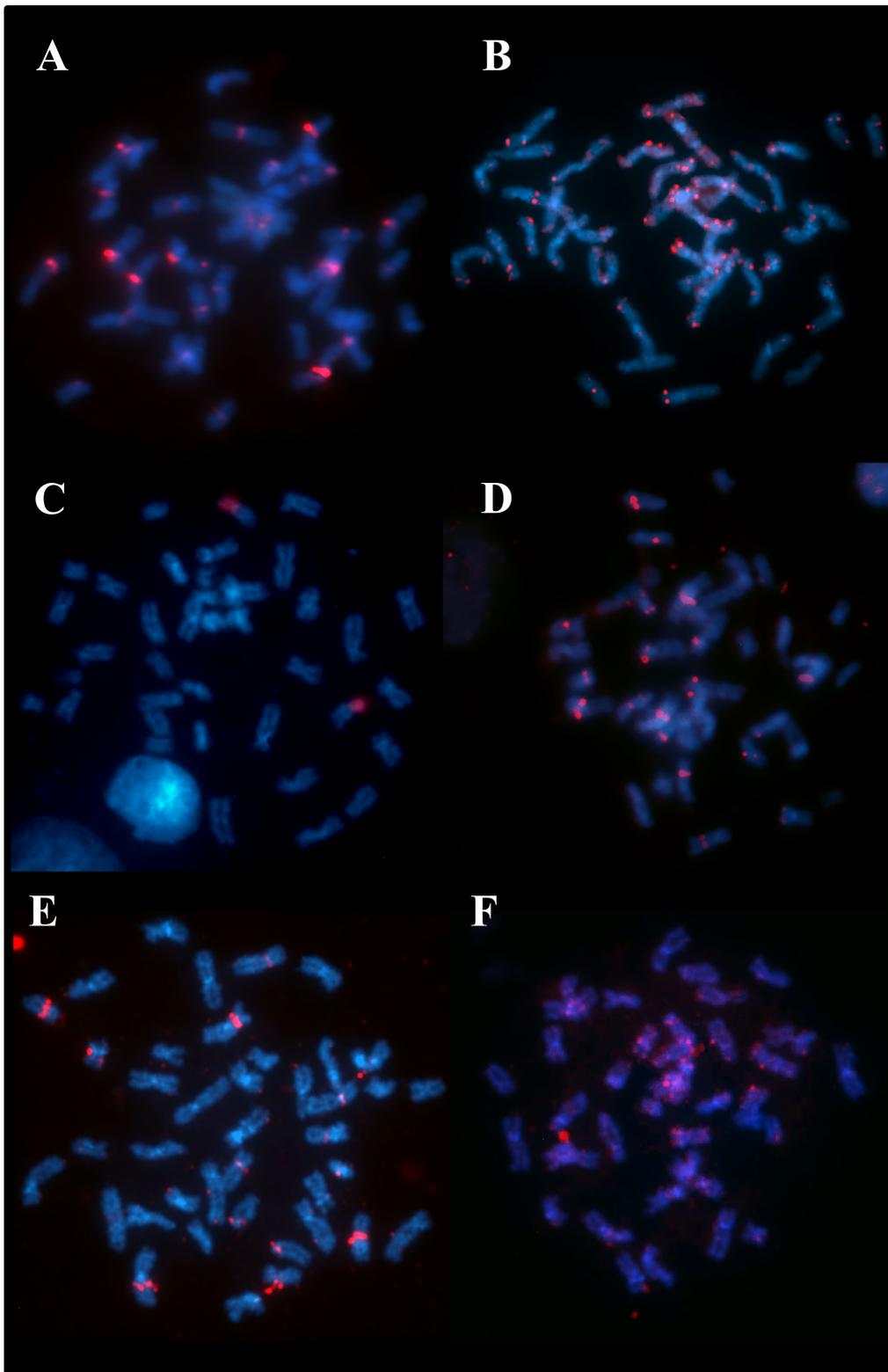
<b>Sequência</b>	<b>Tipo</b>	<b>Gel</b>	<b>FISH</b>
GymSat-CL1	Satellite	Negativo	Negativo
GymSat-CL7	Satellite	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
GymSat-CL14	Minisatellite	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
GymSat-CL17	Minisatellite	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
GymSat-CL34	Minisatellite	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
GcaSat1	Satellite	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
GcaSat2	Satellite	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
GcaSat4	Satellite	<b>Positivo</b>	Negativo
GcaSat5	Satellite	<b>Positivo</b>	Negativo
GcaSat7	Satellite	<b>Positivo</b>	Negativo
GcaSat8	Satellite	<b>Positivo</b>	Negativo
GcaSat9	Satellite	<b>Positivo</b>	Negativo
GcaSat10	Satellite	Negativo	Negativo
GcaSat11	Satellite	<b>Positivo</b>	Negativo
GcaSat12	Satellite	<b>Positivo</b>	Negativo



**Figura 1:** Gel de agarose 1%. L- Ladder. 1, 2 e 3 aliquotas de DNA extraído de tecido de *G. carapo* "Catalão".



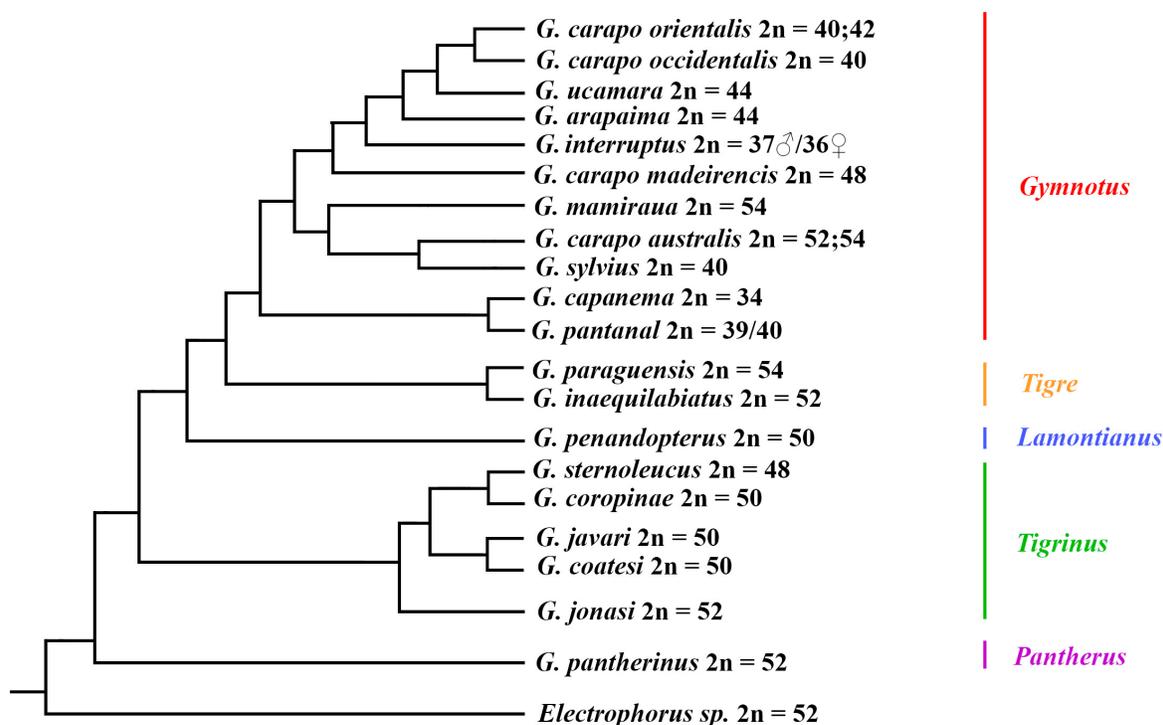
**Figura 2:** Amplificação de elementos repetitivos de *Gymnotus carapo* "Catalão" em gel de agarose 2%.



**Figura 3:** FISH em metáfases de *Gymnotus carapo* "Catalão" com sondas de A: GymSat-CL7; B: GymSat-CL14; C: GymSat-CL14; D: GymSat-CL34; E: GcaSat1; F: GcaSat1.

#### 4- CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste trabalho a pintura nas duas espécies de *Gymnotus*: *G. carapo occidentalis* “Catalão” (GCC)  $2n=40$  e *G. pantanal* (GPT)  $2n=39♂/40♀$  mostram uma grande quantidade de rearranjos cromossomos comparados ao citótipo de *G. carapo orientalis* ( $2n=42$ , espécie da sonda) Esses resultados mostram que a evolução cromossômica no grupo é mais complexa do que se supõe por citogenética clássica. É teorizado que o  $2n$  basal para Gymnotidae é  $2n=52$ , já que o gênero basal em Gymnotidae, *Electrophorus* e *G. pantherinus* (espécie irmã de todos *Gymnotus*, Craig et al., 2019) ambas apresentam  $2n=52$ . Quando comparado com todos os citótipos de *Gymnotus* na literatura, é possível observar uma tendência de redução do  $2n$  nas espécies do subgênero *Gymnotus* que se encontram em posição mais derivada na árvore filogenética (Figura 1)

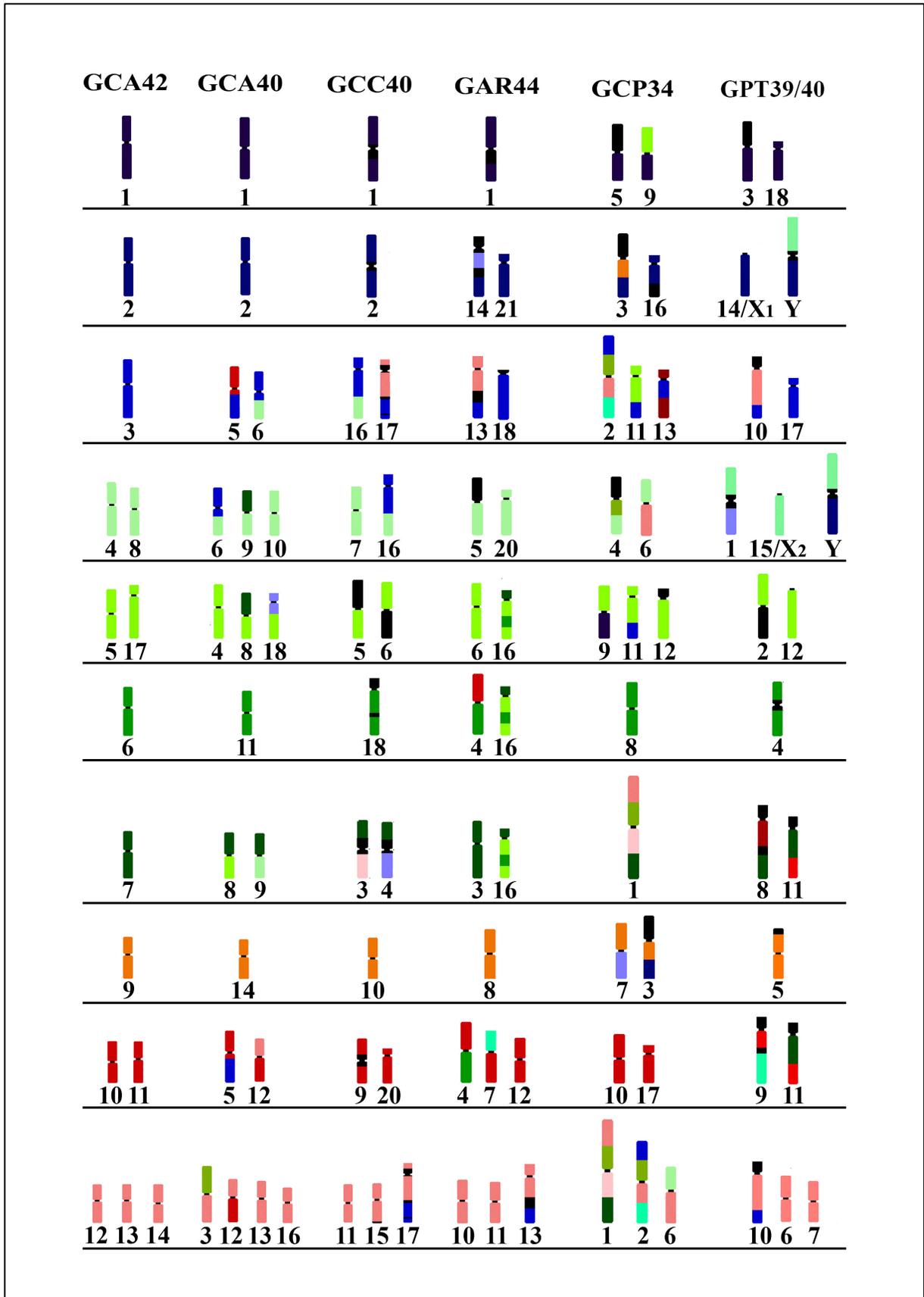


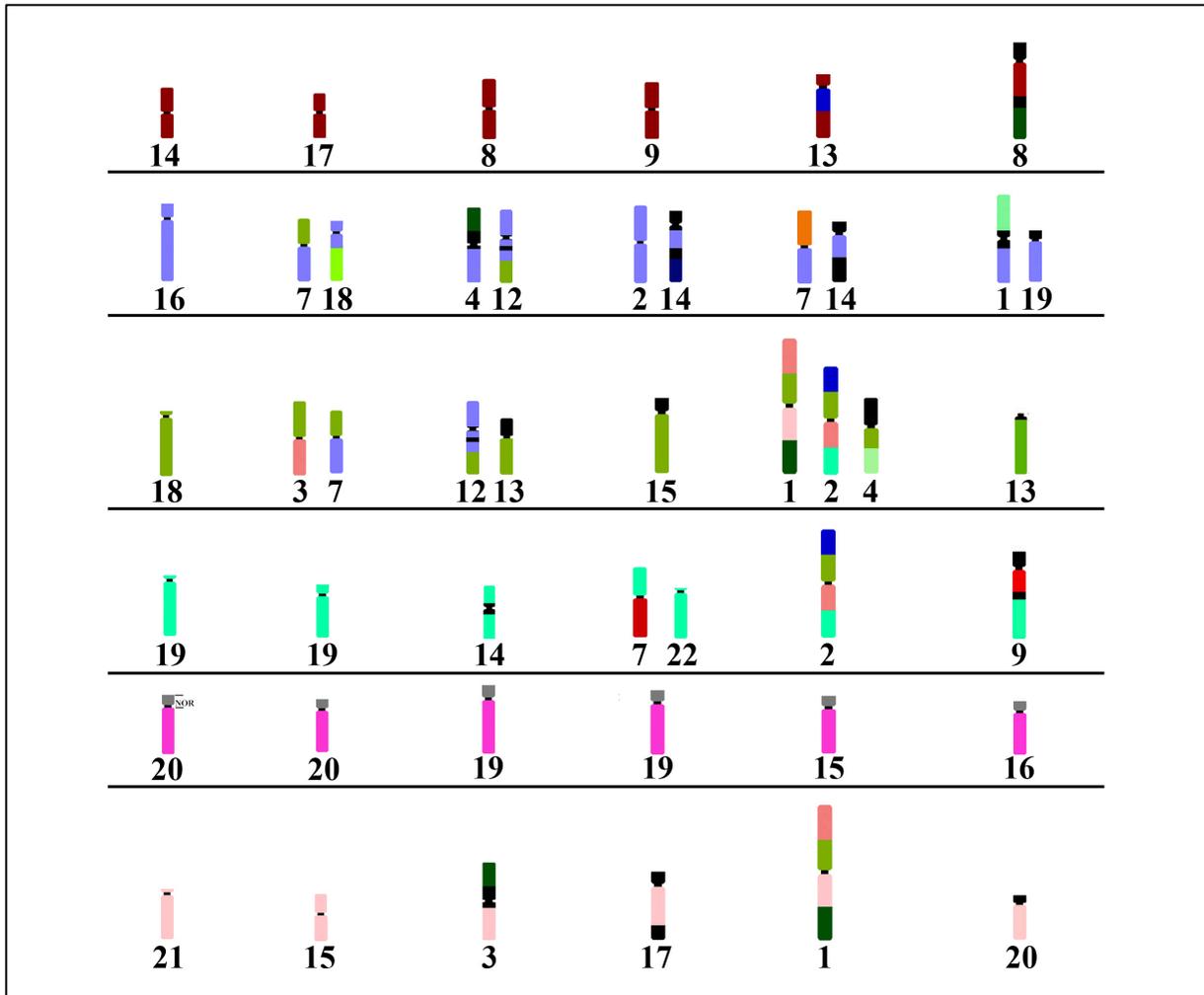
**Figura 1:** Árvore filogenética de Gymnotidae, adaptada de Craig et al., 2019. Foram representadas apenas as espécies que possuem dados citogenéticos na literatura.

Sondas de cromossomo inteiro de GCA  $2n=42$  foram usadas em estudos anteriores comparando dois citótipos de *G. carapo* (GCA42 e GCA40), *G. capanema* (GCP) e *G. arapaima* (GAR) (Nagamachi et al., 2010, 2013; Machado et al., 2018) e mostraram cariótipos muito rearranjados. A identificação precisa dos cromossomos envolvidos na formação do par sexual em *G. pantanal* abre o caminho para a investigação de outros sistemas sexuais descritos para *Gymnotus*, o que poderá permitir investigar se existe ou não homeologias dos cromossomos envolvidos na formação do cromossomo sexual. Com esses resultados vamos poder verificar se os cromossomos sexuais nas diferentes espécies de *Gymnotus* tiveram uma origem ancestral ou se foram eventos independentes.

Comparando-se os cariótipos das espécies já mapeadas por sondas de cromossomo total e a espécie da qual foi obtida a sonda, apenas os pares GCA20 (R1) e GCA21 mantiveram homeologias conservada (Figura 2). Milhomen et al. (2013) mostraram que o GCA20, o par portados da NOR, apresentou sintenia conservada também em *G. mamiraua*, *G. cf. carapo* ( $2n = 54$ ), *G. sylvius*, *G. inaequilabiatus* e *G. jonasi*, sendo que em *G. jonasi* ele está fusionado a outro cromossomo, e não compartilha a NOR no mesmo par. Estudos em andamento em *G. coatesi* e *E. electricus* também evidenciam a manutenção da sintenia conservada de GCA20. Além disso, pode-se observar inversões pericêntricas ou adição de sequências através da mudança da posição centromérica, como observado por exemplo, no par GCA21, que em *G. carapo* citótipo  $2n=42$  este cromossomo é acrocêntrico e em *G. carapo* ( $2n=40$ ) e *G. arapaima*, é subtelocêntrico. O par GCA6 é metacêntrico em quase todos os citótipos, mas no *G. carapo occidentalis* “Catalão” é subtelocêntrico (Figura 2).

Em Gymnotiformes, essa reorganização dinâmica do genoma vem sendo estudada através de sequências repetitivas, do estudo de cromossomos sexuais e sondas de cromossomo total (Margarido et al., 2007; Henning et al., 2008, 2011; Nagamachi et al., 2010, 2013; da Silva et al., 2011, 2014; Utsunomia et al., 2014; Almeida et al., 2015; da Silva et al., 2016 Fernandes et al., 2017 e Machado et al., 2017). Os resultados do presente trabalho, comparado aos da literatura (Nagamachi et al., 2010, 2013; Machado et al., 2018, 2022), mostram que de forma recorrente no gênero, vários rearranjos são espécie-específicos ou os cromossomos tiveram outros rearranjos nos mesmos cromossomos/pontos de quebra.





**Figura 2:** Ideograma ilustrando as regiões de homeologias encontradas nas espécies de *Gymnotus* analisadas por pintura cromossômica. GCA42: *G. carapo*  $2n=42$  utilizado na produção das sondas, cada cor diferente representa um cromossomo ou grupo cromossômico. GCA40: *G. carapo*  $2n=40$  (Nagamachi et al., 2010). GCC40: *G. carapo occidentalis* “Catalão” (presente estudo). GAR44 *G. arapaima* (Machado et al., 2018). GCP34: *G. capanema* (Nagamachi et al., 2013). GPT39/40: *G. pantanal* (presente estudo).

Análises filogenéticas estimam que *Gymnotus* tem uma história de múltiplas colonizações das principais regiões biogeográficas, pelo menos 5 no período de 5 ma a 0.5 ma atrás, resultando no padrão de polifilia de assembleias de espécies (Craig et al., 2019) e possui um padrão de dispersão similar a outros peixes neotropicais, devido à dinâmica das redes de rios, incluindo a fragmentação e fusão de rios adjacentes (Albert et al. 2017, 2018a,b, 2020). Além disso, os peixes teleósteos provavelmente teriam experimentado uma maior taxa de

rearranjos cromossômicos em comparação com outros vertebrados (Ravi & Venkatesh, 2008) juntamente com a formação de demes isolados por barreiras geográficas e menores populações com endocruzamento, facilitaria a fixação de rearranjos cromossômicos (King, 1993). Levando em consideração esses fatos, análises citogenéticas tem auxiliado no processo de identificação de espécies crípticas e/ou complexos parafiléticos de espécies, como por exemplo, os espécimes de *G. carapo* analisados por pintura cromossômica neste trabalho. Esse mesmo padrão foi refletido em análises filogenéticas que mostra *G. carapo* como um grupo parafilético (Craig et al., 2019) e reflete o padrão de cariótipo encontrado em diferentes regiões hidrográficas.

O uso de pintura cromossômica e análises de sequência repetitivas são importantes para o entendimento da composição e evolução genômica de *Gymnotus*, para identificar, classificar e compreender mais sobre esse grupo amplamente distribuído na América Latina.

## 5- REFERENCIAS

- Albert, J.S. (2001). Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). Misc. Publ. Mus. Zool. University of Michigan, 190: 1-129.
- Albert, J.S., Crampton, W.G.R. (2003). Seven new species of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes) with a redescription of *G. carapo* (Linnaeus). Zootaxa, 287: 1-54. doi: 10.11646/zootaxa.287.1.1
- Albert, J.S., Crampton, W.G. (2005). Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). In *Electroreception* (pp. 360-409). Springer New York.
- Albert, J.S., Crampton, W.G.R., Thorsen, D.H., Lovejoy, N.R. (2005). Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). Syst. Biodivers, 2(4): 375-417. doi: 10.1017/S1477200004001574
- Albert JS, Antonelli A. 2017. Society for the study of systematic biology symposium: frontiers in parametric biogeography. Syst. Biol. 66(2):125–27
- Albert JS, Craig JM, Tagliacollo VA, Petry P. 2018a. Upland and lowland fishes: a test of the river capture hypothesis. See Hoorn et al. 2018, pp. 273–94
- Albert JS, Val P, Hoorn C. 2018b. The changing course of the Amazon River in the Neogene: center stage for Neotropical diversification. Neotropical Ichthyol. 16:e180033
- Albert, J. S., Tagliacollo, V. A., & Dagosta, F. (2020). Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 51(1). doi:10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032

- Almeida, J. S., Miguez, V. H., Diniz, D., & Affonso, P. R. A. (2015). A unique sex chromosome system in the knifefish *Gymnotus bahianus* with inferences about chromosomal evolution of Gymnotidae. *Journal of Heredity*, *106*(2), 177-183. Doi: <https://doi.org/10.1093/jhered/esu087>
- Araya-Jaime, C., Lam, N., Pinto, I. V., Méndez, M. A., & Iturra, P. (2017). Chromosomal organization of four classes of repetitive DNA sequences in killifish *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *Comparative Cytogenetics*, *11*(3), 463.
- Araya-Jaime, C. A., de Andrade Silva, D. M. Z., da Silva, L. R. R., do Nascimento, C. N., 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, E. V., da Silva, M., de Almeida, M. C., Moreira-Filho, O., & Artoni, R. F. (2017). Variability and evolutionary implications of repetitive DNA dynamics in genome of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Comparative Cytogenetics*, *11*(1), 143-162. <http://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i1.11149>
- Benson, G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic acids research*, *27*(2), 573-580.
- Bertollo, L.A.C. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Bras. Genet*, *1*, 103-120.
- Blanco, D. R., Vicari, M. R., Lui, R. L., Artoni, R. F., de Almeida, M. C., Traldi, J. B., ... & Moreira-Filho, O. (2014). Origin of the X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetica*, *142*(2), 119-126.
- Brochu, K. (2011). Molecular phylogenetics of the neotropical electric knifefish genus *Gymnotus* (Gymnotidae, Teleostei): biogeography and signal evolution of the trans-Andean species (Doctoral dissertation, University of Toronto).
- Campos-da-Paz, R., & Albert, J. S. (1998). The gymnotiform" eels" of Tropical America: a history of classification and phylogeny of the South American electric knifefishes (Teleostei: Ostariophysi: Siluriphysi) (pp. 401-417). Edipucrs.
- Campos-da-Paz, R. (2003). Family Gymnotidae. Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp483-486.
- Campos-da-Paz, R., & de Santana, C. D. (2019). A New Species of the Electric Knifefish *Gymnotus* Linnaeus (Gymnotiformes: Gymnotidae) from Northeastern Brazil. *Copeia*, *107*(1), 144-151. Doi: <https://doi.org/10.1643/CI-18-141>
- Cardoso, A. L., Pieczarka, J. C., Feldberg, E., Milhomem, S. S. R., Moreira-Almeida, T., Silva, D. D. S., ... & Nagamachi, C. Y. (2011). Chromosomal characterization of two species of genus *Steatogenys* (Gymnotiformes: Rhamphichthyoidea: Steatogenini) from the Amazon basin: sex chromosomes and correlations with Gymnotiformes phylogeny. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *21*(3), 613-621.
- Cardoso, A.L., Ready, J.S., Pieczarka, J.C., Milhomem, S.S.R., Figueiredo-Ready, W.M.B.D., Silva, F.H.R., Nagamachi, C.Y. (2015). Chromosomal Variability Between Populations of

- Electrophorus electricus* Gill, 1864 (Pisces: Gymnotiformes: Gymnotidae). *Zebrafish*, 12(6), 440-447.
- Casciotta, J., Almirón, A., Sánchez, S., Iwaszkiw, J. and Bruno, M. C. (2013), The genus *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) in Argentina. How bad taxonomy results in poor regulations and no conservation. *J. Appl. Ichthyol.*, 29: 208–212. doi:10.1111/jai.12028
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. 371: 215-220.
- Cioffi, M.B., Martins, C., Bertollo, L.A. (2010). Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 1.
- Cioffi, M. B., Yano, C. F., Sember, A., and Bertollo, L. A. C. (2017). Chromosomal Evolution in Lower Vertebrates: Sex Chromosomes in Neotropical Fishes. *Genes* 8, 258. doi: [10.3390/genes8100258](https://doi.org/10.3390/genes8100258)
- Crampton et al., 2003
- Cioffi, M., Moreira-Filho, O., Ráb, P., Sember, A., Molina, W. F., & Bertollo, L. A. C. (2018). Conventional cytogenetic approaches—useful and indispensable tools in discovering fish biodiversity. *Current Genetic Medicine Reports*, 6(4), 176-186.
- Claro, F. L. (2008). *Gymnotus Carapo* and *Gymnotus sylvius* (Teleostei: Gymnotidae): Uma Abordagem Citogenético-Molecular. Master's dissertation. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo.
- Craig JM, Malabarba LR, Crampton WGR, Albert JS. (2018a). Revision of Banded Knifefishes of the *Gymnotus carapo* and *G. tigre* clades (Gymnotidae Gymnotiformes) from the Southern Neotropics. *Zootaxa*. 2018;4379: 47–73. pmid:29689973
- Craig JM, Correa-roldán V, Ortega H, Crampton WGR, Albert JS. (2018b). Revision of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Upper Madeira Basin of Bolivia and Peru, with descriptions of two new species. *Zootaxa*. 2018;4413: 111–132. pmid:29690122
- Craig J., Kim L. Y., Tagliacollo V. A., and Albert J. S. (2019). Phylogenetic revision of Gymnotidae (Teleostei: Gymnotiformes), with descriptions of six subgenera. *Plos One* 14(11), e0224599. doi: [10.1371/journal.pone.0224599](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224599)
- Crampton, W.G.R., Thorsen, D.H., Albert, J.S. (2005). Three new species from a diverse, sympatric assemblage of the electric fish *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) in the lowland Amazon basin, with notes on ecology. *Copeia*. 82-99. doi: [10.1643/CI-03-242R2](https://doi.org/10.1643/CI-03-242R2)
- Crampton, W. G. R., Albert, J. S., Ladich, F., Collin, S. P., Moller, P., & Kapoor, B. G. (2006). Communication in fishes.
- Crampton, W.G.R., Rodríguez-Cattáneo, A., Lovejoy, N.R., Caputi, A.A. (2013). Proximate and ultimate causes of signal diversity in the electric fish *Gymnotus*. *Journal of Experimental Biology*, 216(13), 2523-2541.

- da Silva, M., Matoso, D.A., Vicari, M.R., De Almeida, M.C., Margarido, V.P., Artoni, R.F. (2011). Physical mapping of 5S rDNA in two species of knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 134(4), 303-307. doi: 10.1159/000328998
- da Silva, M., Matoso, D.A., Artoni, R.F., Feldberg, E. (2014). New approach data in electric fish (Teleostei: *Gymnotus*): Sex chromosome evolution and repetitive DNA. *Zebrafish*, 11(6), 528-535. doi: 10.1089/zeb.2013.0966
- da Silva M.: Análise biogeográfica do gênero *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae), por meio de marcadores citogenéticos e moleculares. (2015) PhD Thesis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- da Silva, M., Barbosa, P., Artoni, R.F., Feldberg, E. (2016). Evolutionary Dynamics of 5S rDNA and Recurrent Association of Transposable Elements in Electric Fish of the Family Gymnotidae (Gymnotiformes): The Case of *Gymnotus mamiraua*. *Cytogenetic and Genome Research*, 149(4), 297-303. doi: 10.1159/000449431
- da Silva, M., Matoso, D. A., Artoni, R. F., and Feldberg, E. (2019). Karyotypic Diversity and Evolutionary Trends in Neotropical Electric Fish of the Genus *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae). *Zebrafish* 16(3), 308–320. doi: 10.1089/zeb.2018.1716
- de Almeida Toledo, L. F., Foresti, F., & de Almeida Toledo, S. (1981). Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region in the knifefish, *Apteronotus albifrons* (Pisces, Apteronotidae). *Experientia*, 37(9), 953-954. Doi: 10.1007/BF01971773
- de Almeida-Toledo, L. F., Daniel-Silva, M. F. Z., Lopes, C. E., & Toledo-Filho, S. D. A. (2000). Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an X1X2Y sex chromosome system in Gymnotiformes. *Chromosome Research*, 8(4), 335-340. Doi: 10.1023/A:1009287630301
- de Almeida-Toledo, L. F., de Fatima Zambelli, M., Daniel-Silva, C. B. M., & Foresti, F. (2007). Chromosome variability in Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi). *Fish cytogenetics*, 17.
- de Almeida Toledo, L. F., & Foresti, F. (2001). Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica*, 111(1), 91-100. Doi: 10.1023/A:1013768104422
- de Santana, C. D., Crampton, W. G., Dillman, C. B., Frederico, R. G., Sabaj, M. H., Covain, R., ... & Wosiacki, W. B. (2019). Unexpected species diversity in electric eels with a description of the strongest living bioelectricity generator. *Nature communications*, 10(1), 1-10.
- Faria-Pereira, L. P., Hilsdorf, A. S., Albert, J., Paiva, M. J. T. R., Galvão, M. S. N. (2019) Molecular assessment of *Gymnotus* spp. (Gymnotiformes: Gymnotidae) fishing used as live baitfish in the Tietê River, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 17, e190075
- Ferguson-Smith, M. A. (1998). Comparative chromosome painting. In *CYTOGENETICS AND CELL GENETICS* (Vol. 81, No. 2, pp. 104-104). ALLSCHWILERSTRASSE 10, CH-4009 BASEL, SWITZERLAND: KARGER.

- Ferreira, I. A., & Martins, C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, 39(4), 411-418.
- Fernandes, C.A., Paiz, L.M., Baumgärtner, L., Margarido, V.P., Vieira, M.M.D.R. (2017). Comparative Cytogenetics of the Black Ghost Knifefish (Gymnotiformes: Apterontidae): Evidence of Chromosomal Fusion and Pericentric Inversions in Karyotypes of Two *Apterontus* Species. *Zebrafish*, 14(5): 471-476. doi: 10.1089/zeb.2017.1432
- Fernandes-Matioli, F. M. C., Marchetto, M. C. N., Almeida-Toledo, L. F., and Toledo-Filho, S. A. (1998). High intraspecific karyological conservation in four species of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) from southeastern Brazilian basins. *Caryologia* 51, 221–234. doi: 10.1080/00087114.1998.10797414
- Ferraris Jr, C.J., de Santana, C.D., Vari, R.P. (2017). Checklist of Gymnotiformes (Osteichthyes: Ostariophysi) and catalogue of primary types. *Neotrop Ichthyol*, 15(1): e160067. doi.10.1590/1982-0224-20160067
- Ferreira, I. A., & Martins, C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, 39(4), 411-418.
- Fonteles, S., Lopes, C.E., Akama, A., Fernandes, F., Porto-Foresti, F., Senhorini, J.A., ... Almeida-Toledo, L.F.D. (2008). Cytogenetic characterization of the strongly electric Amazonian eel, *Electrophorus electricus* (Teleostei, Gymnotiformes), from the Brazilian rivers Amazon and Araguaia. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 227-230.
- Foresti, F., de Almeida Toledo, L. F., and de Almeida Toledo, F. S. (1984). Chromosome studies in *Gymnotus carapo* and *Gymnotus* sp. (Pisces, Gymnotidae). *Caryologia* 37, 141–146. doi: 10.1080/00087114.1984.10797693
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N., and van der Laan, R. (eds) 2021. Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references. California Academy of Sciences, San Francisco, CA (<https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed 19 aug 2022.
- Gornung, E. (2013). Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: A review of research. *Cytogenetic and genome research*, 141(2-3), 90-102. Kidwell, M. G. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63.
- Henning, F., Trifonov, V., Ferguson-Smith, M. A., & de Almeida-Toledo, L. F. (2008). Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 121(1), 55-58.
- Henning, F., Moysés, C. B., Calcagnotto, D., Meyer, A., & de Almeida-Toledo, L. F. (2011). Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*). *Heredity*, 106(2), 391-400.

- Kim, L. Y., Crampton, W. G., and Albert, J. S. (2020). Two New Species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from Brazil and Historical Biogeography of the Subgenus *Lamontianus*. *Copeia* 108(3), 468-484. doi: [10.1643/CI-19-205](https://doi.org/10.1643/CI-19-205)
- King, M. (1993). *Species Evolution - The Role of Chromosome Change*. Cambridge University Press, Cambridge, England, pp. 335.
- Kitano, J., & Peichel, C. L. (2012). Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. *Environmental biology of fishes*, 94(3), 549-558.
- Knytl, M., Kalous, L., Symonová, R., Rylková, K., & Ráb, P. (2013). Chromosome studies of European cyprinid fishes: cross-species painting reveals natural allotetraploid origin of a *Carassius* female with 206 chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 139(4), 276-283.
- Lacerda, M. C. V., & Maistro, E. L. (2007). Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* species (Teleostei: Gymnotidae) from the Fundo Stream, MG, Brazil. *Cytologia*, 72(1), 89-93.
- Lande, R. (1979). Effective deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. *Evolution*, 234-251.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201-220.
- Li, Y. C., A. B. Kord, T. Fahima, A. Berles, and E. Nero, 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Liu, Z., P. Li, A. Kocabas, A. Karsi, and Z. Ju, 2001. Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Bio physical Research Communication* 289: 317-324.
- Liu, J. D., Yi, M. S., Zhao, G., Zhou, F., Wang, D. Q., & Yu, Q. X. (2002). Sex chromosomes in the spiny eel (*Mastacembelus aculeatus*) revealed by mitotic and meiotic analysis. *Cytogenetic and genome research*, 98(4), 291-297.
- Lovejoy, N.R., Lester, K., Crampton, W.G., Marques, F.P., Albert, J.S. (2010). Phylogeny, biogeography, and electric signal evolution of Neotropical knifefishes of the genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1), 278-290.
- Machado, T. C., Pansonato-Alves, J. C., Pucci, M. B., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Oliveira, C., ... & Vicari, M. R. (2011). Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC genetics*, 12(1), 1-8.
- Machado, M.A., Cardoso, A.L., Milhomem-Paixão, S.S.R., Pieczarka, J.C., Nagamachi, C.Y. (2017). *Gymnotus coatesi* (Gymnotiformes): A Case of Colocation of Multiple Sites of 18S rDNA with Telomeric Sequences. *Zebrafish*, 14(5): 459-463. doi: [10.1089/zeb.2017.1435](https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1435)
- Machado, M. D. A., Cardoso, A. L., Milhomem-Paixão, S. S. R., Pieczarka, J. C., & Nagamachi, C. Y. (2017). *Gymnotus coatesi* (Gymnotiformes): A Case of Colocation of Multiple Sites of 18S rDNA with Telomeric Sequences. *Zebrafish*, 14(5), 459-463.
- Machado, M. D. A., Pieczarka, J. C., Silva, F. H. R., O'Brien, P. C. M. O., Ferguson-Smith, M. A., & Nagamachi, C. Y. N. (2018). Extensive karyotype reorganization in the fish *Gymnotus arapaima* (Gymnotiformes, Gymnotidae) highlighted by Zoo-FISH analysis. *Frontiers in genetics*, 9, 8.

- Mago-Leccia, F. (1994). Electric fishes of the continental waters of America: classification and catalogue of the electric fishes of the order Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi), with descriptions of new genera and species. Fundacion para Desarrollo de las Ciencias Fisicas, Matematicas y Naturales.
- Margarido, V.P., Bellafronte, E., Moreira-Filho, O. (2007). Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) species verifies invasive species in the Upper Parana' River basin, Brazil. *J. Fish Biol*, 70(sb):155–164. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01365.x
- Martins, C., Cabral-de-Mello, D. C., Valente, G. T., Mazzuchelli, J., & Oliveira, S. G. (2011). Cytogenetic mapping and contribution to the knowledge of animal genomes. *Advances in genetics research*, 4, 1-81.
- Milhomem, S.S.R., Pieczarka, J.C., Crampton, W.G.R., Souza, A.C.P., Carvalho Jr, J.R., Nagamachi, C.Y. (2007). Differences in karyotype between two sympatric species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the eastern amazon of Brazil. *Zootaxa*, 1397, 55-62.
- Milhomem, S.S.R., Pieczarka, J.C., Crampton, W.G.R., Silva, D.S., de Souza, A.C., Carvalho, J.R., et al. (2008). Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genetics*, 9(1): p.75. doi: 10.1186/1471-2156-9-75
- Milhomem, S.S.R., Crampton, W.G.R., Pieczarka, J.C., Shetka, G.H., Silva, D.S., Nagamachi, C.Y. (2012a). *Gymnotus capanema*, a new species of electric knife fish (Gymnotiformes, Gymnotidae) from eastern Amazonia, with comments on an unusual karyotype. *Journal of fish biology*, 80(4), 802-815.
- Milhomem, S.S.R., Crampton, W.G.R., Pieczarka, J.C., Silva, D.S., Cardoso, A.L., da Silva, P.C., Nagamachi, C.Y. (2012b). Chromosomal and electric signal diversity in three sympatric electric knifefish species (*Gymnotus*, Gymnotidae) from the Central Amazon Floodplain. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22(2), 485-497.
- Milhomem, S.S.R., Scacchetti, P.C., Pieczarka, J.C., Ferguson-Smith, M.A., Pansonato-Alves, J.C., O'Brien, P.C., ... Nagamachi, C. Y. (2013). Are NORs always located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). *PLoS One*, 8(2), e55608.
- Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C., Milhomem, S.S.R., O'Brien, P.M.C., de Souza, A.C., Ferguson-Smith, M.A. (2010). Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. *BMC genetics*, 11(1), 1.
- Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C., Milhomem, S.S.R., Batista, J.A., O'Brien, P.C.M., Ferguson-Smith, M.A. (2013). Chromosome painting reveals multiple rearrangements between *Gymnotus capanema* and *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes). *Cytogenetic and genome research*, 141(2-3), 163-168.
- Novák, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., & Macas, J. (2013). RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, 29(6), 792-793.

- Parise-Maltempi, P. P., C. Martins, C. Oliveira, and F. Foresti, 2007. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetics and Genome Research* 116: 218-223.
- Parise-Maltempi, P. P., da Silva, E. L., Rens, W., Dearden, F., O'Brien, P., Trifonov, V., & Ferguson-Smith, M. A. (2013). Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. *BMC genetics*, 14(1), 1-7.
- Phillips, R. B., Konkol, N. R., Reed, K. M., & Stein, J. D. (2001). Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica*, 111(1), 119-123.
- Rangel-Pereira, F. S., & Ottoni, F. P. (2021). Misidentification of *Gymnotus interruptus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) leads to erroneous karyotype addressing. *International Journal of Aquatic Biology*, 9(1), 11-14.
- Raskina, O., Barber, J. C., Nevo, E., & Belyayev, A. (2008). Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3-4), 351-357
- Ravi, V., & Venkatesh, B. (2008). Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. *Current opinion in genetics & development*, 18(6), 544-550.
- Reed, K. M., Bohlander, S. K., & Phillips, R. B. (1995). Microdissection of the Y chromosome and fluorescence in situ hybridization analysis of the sex chromosomes of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosome Research*, 3(4), 221-226.
- Scacchetti, P., Pansonato-Alves, J., Utsunomia, R., Oliveira, C., Foresti, F. (2011). Karyotypic diversity in four species of the genus *Gymnotus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): physical mapping of ribosomal genes and telomeric sequences. *Comparative cytogenetics*, 5(3), 223.
- Scacchetti, P.C., Alves, J.C.P., Utsunomia, R., Claro, F.L., de Almeida Toledo, L.F., Oliveira, C., Foresti, F. (2012). Molecular characterization and physical mapping of two classes of 5S rDNA in the genomes of *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). *Cytogenetic and genome research*, 136(2), 131-137.
- Schartl, M., Schmid, M., & Nanda, I. (2016). Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma*, 125(3), 553-571.
- Sember, A., Nguyen, P., Perez, M. F., Altmanová, M., Ráb, P., & Cioffi, M. D. B. (2021). Multiple sex chromosomes in teleost fishes from a cytogenetic perspective: state of the art and future challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1833), 20200098.
- Silva, D.S., Milhomem, S.S.R., Pieczarka, J.C., Nagamachi, C.Y. (2009). Cytogenetic studies in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. *BMC Genet.*, 10(1), 74. doi: 10.1186/1471-2156-10-74. doi: 10.1186/1471-2156-10-74
- Silva, E. B., & Margarido, V. P. (2005). An X1X1X2X2/X1X2Y multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). *Environmental Biology of Fishes*, 73(3), 293-297.

- Sousa, T.P., Marques, D.K.S., Vitorino, C.D.A., Faria, K.D.C., Braga, G.D.S.F., Ferreira, D.C., et al. (2017). Cytogenetic and Molecular Data Support the Occurrence of Three *Gymnotus* Species (Gymnotiformes: Gymnotidae) Used as Live Bait in Corumbá, Brazil: Implications for Conservation and Management of Professional Fishing. *Zebrafish*, 14(2), 177-186. doi: 10.1089/zeb.2016.1356
- Sperling, A., & Li, R. (2013). Repetitive Sequences. *Encyclopedia of Genetics*, 150-154.
- Suarez, P., Pinto Barroso, I. C. G., Silva, D. D. S., Milhomem, S. S., Cabral-de-Mello, D. C., Martins, C., ... & Nagamachi, C. Y. (2017). Highest diploid number among Gymnotiformes: first cytogenetic insights into Rhabdoliops (Sternopygidae). *Zebrafish*, 14(3), 272-279.
- Tagliacollo, V.A., Bernt, M.J., Craig, J.M., Oliveira, C., Albert, J.S. (2016). Model-based total evidence phylogeny of Neotropical electric knifefishes (Teleostei, Gymnotiformes). *Molecular phylogenetics and evolution*, 95, 20-33.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.
- Utunomia, R., Scacchetti, P. C., Pansonato-Alves, J.C., 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.
- Utunomia, R., Melo, S., Scacchetti, P. C., Oliveira, C., Machado, M. A., Pieczarka, J. C., et al. (2018) Particular chromosomal distribution of microsatellites in five species of the genus *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes). *Zebrafish*. 15(4), 398–403. doi: 10.1089/zeb.2018.1570
- Vicari, M. R., de Mello Pistune, H. F., Castro, J. P., de Almeida, M. C., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O., et al. (2011). New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica* 139, 1073–1081. doi: 10.1007/s10709-011-9611-z
- Volff, J. N. (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94(3), 280-294.
- Yang, F., Carter, N.P., Shi, L., Ferguson-Smith, M.A. (1995). A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma*, 103(9), 642-652.
- Yang, F., Trifonov, V., Ng, B. L., Kosyakova, N., & Carter, N. P. (2017). Generation of paint probes from flow-sorted and microdissected chromosomes. In *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)* (pp. 63-79). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Yano, C. F., Bertollo, L. A., Ezaz, T., Trifonov, V., Sember, A., Liehr, T., et al. (2017). Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triporthus* (Characiformes, Triporthidae). *Heredity* 118(3), 276–283. doi.org/10.1038/hdy.2016.83
- Yi, M. S., Li, Y. Q., Liu, J. D., Zhou, L., Yu, Q. X., & Gui, J. F. (2003). Molecular cytogenetic detection of paternal chromosome fragments in allogynogenetic gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch. *Chromosome Research*, 11(7), 665-671.

## ANEXO I

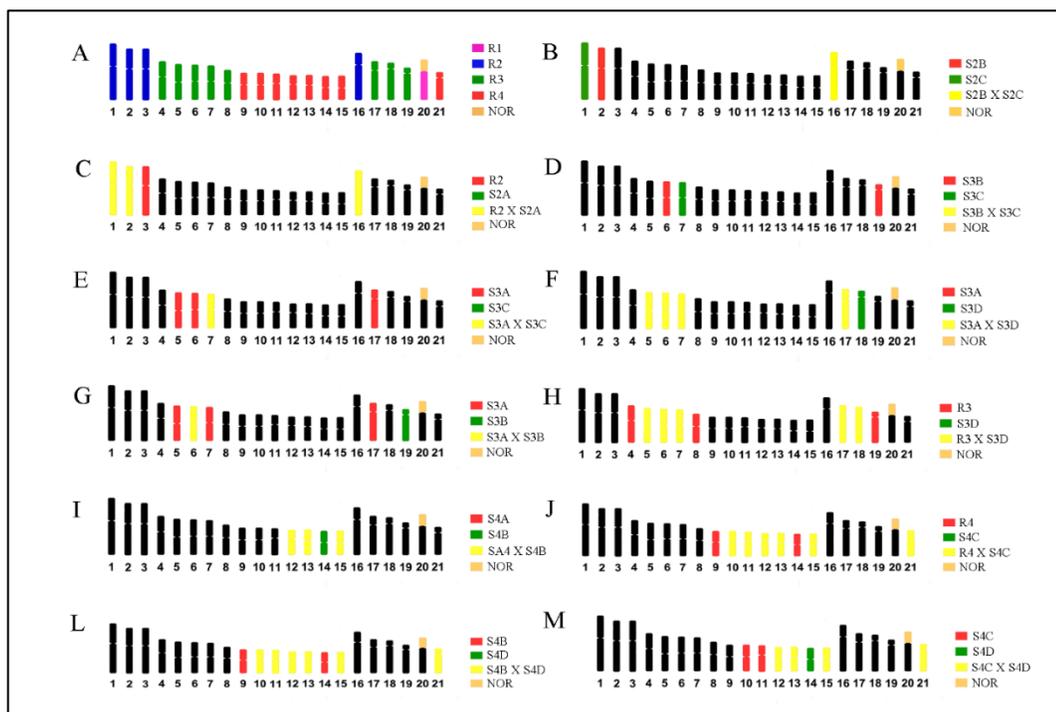
## MATERIAL E MÉTODOS

## A.1- AMOSTRA BIOLÓGICA

A amostra é constituída de espécimes de *G. carapo* “catalão” e *G. pantanal*, cedidos para trabalhos em colaboração.

## A.2- SONDA DE CROMOSSOMO TOTAL

Foram utilizadas as sondas de cromossomo total de *G. carapo* ( $2n=42$ ) produzidas por Nagamachi et al. (2010), seguindo os experimentos discriminados na Figura A1 e nas Tabela A1, utilizando de duas cores.



**Figura A1-** Ideogramas do cariótipo de *G. carapo* ( $2n = 42$ ). A: As quatro regiões cromossômicas (R1, R2, R3, R4) obtidas por Nagamachi *et al.* (2010). B–M: Experimentos de double-fish baseados em Nagamachi *et al.* (2010, 2013), para identificar homologia cromossômica com *G. carapo* ( $2n = 42$ ).

**Tabela A1-** FISH de duas cores para distinguir os pares cromossômicos das Regiões 2, 3 e 4.

FISH 2 cores (subregião)	FISH 2 cores (picos)	Pares cromossômicos
<b>Região 2</b>		
S2B x S2C	P14 x P18	1 (cor do S2C); 2 (cor do S2B); 16 (2 cores)
R2 x S2A	P02 x P08	3(cor do R2); 1, 2, 16 (2 cores)
R2 x S2B	P02 x P14	2, 16 (2 cores); 1, 3 (cor do R2) – define par 3 por exclusão do par 1
<b>Região 3</b>		
S3B x S3C	P12 x P15	7 (cor do S3C); 6, 19 (cor do S3B)
S3A x S3D	P10 x P16	18 (cor do S3D); 5, 6, 7, 17 (2 cores)
S3A x S3B	P10 x P12	6 (2 cores); 19 (cor do S3B); 5, 7, 17 (cor do S3A)
R3 x S3D	P03 x P16	5, 6, 7, 17, 18 (2 cores); 4, 8, 19 (cor do R3) – define pares 4,8 por exclusão do par 19
<b>Região 4</b>		
S4A x S4B	P09 x P11	14 (cor do S4B); 12, 13, 15 (2 cores)
R\$ x S4C	P04 x P13	9, 14 (cor do R4); 10, 11, 12, 13, 15, 21 (2 cores) – define o par 9 por exclusão do par 14
S4B x S4D	P11 x P17	21 (cor do S4D); 12, 13, 14, 15 (2 cores)
S4C x S4D	P13 x P17	14 (cor do S4D); 10, 11 (cor do S4C); 12, 13, 15, 21 (duas cores)

### **A.3- HIBRIDIZAÇÃO *In Situ* FLUORESCENTE (FISH)**

As hibridizações seguiram o protocolo descrito por Yang et al. (1995) e Nagamachi et al. (2010) com algumas modificações.

Imersão da lâmina em uma solução de pepsina a 1% (50 ml de HCl 4,8 N para 0,5 ml de pepsina) por 45 minutos e posteriormente, lavagem em solução de 2xSSC por 3 vezes, 2 minutos em cada. Desidratação dos cromossomos com etanol (séries de 2x70% por 2 min, 2x90% por 2 min e 1x100% por 5 min). Envelhecimento das lâminas em estufa a 37°C overnight. Após essa etapa coloca-se as lâmina em formamida 70% (70 ml de formamida e 30 ml de 2xSSC) durante 50 segundos, a 62°C. Retirou-se as lâminas da solução de formamida 70% e imergiu em solução de etanol 70% gelado, por 5 minutos. Novamente, desidratou os cromossomos em uma bateria de álcool (1x70% por 2 min, 2x90% por 2 min cada e 1x100% por 5 min). Posteriormente, desnaturou a solução contendo as sondas em termociclador a 70°C, durante 15 minutos. Após a desnaturação, foi pingada a solução contendo as sondas sobre a lâmina, colocada uma lamínula sobre ela e vedada com cola PVC. Em seguida, preparou-se uma câmara úmida e encubou-se as lâminas em estufa a 37°C durante três dias (Sondas de cromossomo total) ou 24 horas (demais sondas). Para a retirada de marcações inespecíficas (resultados de pareamentos com poucos pares de bases), incubou-se as lâminas em solução de formamida 50% a 40°C, durante 5 minutos; em solução 2XSSC a 40°C por 5 minutos; em solução 4XSSC/Tween (0,2%) ou 4xT a 36°C por 5 minutos. Após essa etapa foi pingada a solução de detecção (0,2µL avidina CY3 ou FITC + 200µL de 4xT) sobre a lâmina, foi coberto com parafilme e deixado em estufa a 37°C por 30 minutos. Após o tempo decorrido, foi retirado o parafilme e a lâmina foi lavada em 4xT em temperatura ambiente, duas vezes, por 4 minutos cada. Por fim, foi adicionado 7 µL de solução DAPI com anti-fade na lâmina, e coberto com uma lamínula de vidro 24 x 50 mm.

### **A.4- CAPTURA DE IMAGENS E MONTAGEM DO CARIÓTIPO**

As imagens das metáfases nas lâminas hibridizadas foram capturadas utilizando o software Nis-Elements no microscópio Nikon H550S. As metáfases foram analisadas utilizando o software Adobe Photoshop e os cromossomos organizados com base em Levan et al. (1964) com modificações, utilizando como referência as descrições cariotípicas das espécies.

