



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DARALYNS BORGES MACEDO

**ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA
MITOCONDRIAL: ESTUDO DE CASO DE
Cyprinodon sp. E *Arapaima gigas***

BELÉM-PA

2025

DARALYNS BORGES MACEDO

**ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA
MITOCONDRIAL: ESTUDO DE CASO DE
Cyprinodon sp. E *Arapaima gigas***

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR :

Prof.º Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos

BELÉM-PA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M141a Macedo, Daralyns Borges.
 Análise e caracterização do genoma mitocondrial: estudo de
 caso de *Cyprinodon* sp. e *Arapaima gigas* / Daralyns Borges
 Macedo, . — 2025.
 44 f. : il. color.

 Orientador(a): Prof. Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
 Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
 Biotecnologia, Belém, 2025.

 1. Conservação . 2. Recursos pesqueiros. 3. Genoma
 mitocondrial. I. Título.

CDD 576.5

DARALYNS BORGES MACEDO

**ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA MITOCONDRIAL:
ESTUDO DE CASO DE *Cyprinodon* sp. E *Arapaima gigas***

Data da apresentação: 15/05/2025

Belém (PA)

BANCA EXAMINADORA :

Documento assinado digitalmente
 **ROMMEL THIAGO JUCA RAMOS**
Data: 16/06/2025 11:22:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rommel Thiago Jucá Ramos

(UFPA – Orientador)

Documento assinado digitalmente
 **JOYCE KELLY DO ROSARIO DA SILVA**
Data: 16/06/2025 11:33:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Joyce Kelly do Rosário da Silva 1

(UFPA – Membro interno)

Documento assinado digitalmente
 **FABIANO CORDEIRO MOREIRA**
Data: 16/06/2025 11:16:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Fabiano Cordeiro Moreira 2

(UFPA – Membro interno)

Documento assinado digitalmente
 **MARILIA DANYELLE NUNES RODRIGUES**
Data: 09/06/2025 18:10:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marília Danyelle Nunes Rodrigues 3

(UFRA – Membro externo)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado sabedoria quando foi necessário e me proporcionar oportunidades de aprendizado.

Ao meu orientador Dr. Rommel Ramos pelas oportunidades concedidas de contribuição científica e realização deste trabalho.

À Dr.^a Marília Rodrigues por todo conhecimento repassado em minha graduação e pela parceria nos projetos que contribuíram para a minha formação científica.

À Universidade Federal do Pará por toda a infraestrutura e referência de pesquisa no norte do Brasil.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioinformática e Genômica de Microrganismos pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pelos momentos de convivência.

Aos amigos do Laboratório de Genética Aplicada que sempre estiveram ao meu lado no decorrer do projeto de mestrado e pelos momentos de convivência.

Ao Instituto Tecnológico de Santo Domingo pela parceria e contribuição com a amostragem e obtenção das sequências de DNA. Sem vocês esse trabalho não seria possível, meus sinceros agradecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo ensino em excelência e todo o suporte fornecido.

Aos meus pais Evandro e Lidiane Macedo que me apoiaram durante a caminhada da graduação e do mestrado, sem vocês a caminhada seria mais árdua. Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado e por sonharem comigo cada objetivo desta trajetória do jardim de infância até a pós-graduação. Esta conquista é nossa.

Aos meus irmãos Ben e Clarice que sempre foram meu porto seguro e, mesmo sem saber, por serem a minha inspiração e motivação diária.

Ao meu namorado Gabriel Arcanjo por abdicar dos momentos de convivência para que pudesse executar esse trabalho.

Agradeço a todos que de forma direta e indireta ajudaram na realização desta pesquisa.

“Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas!”

(Ayrton Senna)

RESUMO

O avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração tem viabilizado a caracterização em larga escala de genomas mitocondriais em diversas espécies. No entanto, mesmo entre os peixes — grupo com o maior número de genomas mitocondriais sequenciados — apenas 9,7% das espécies válidas estão representadas em bancos de dados. Essa lacuna limita programas de conservação, que dependem de dados genéticos para orientar ações de manejo. O gênero *Cyprinodon*, composto por várias espécies ameaçadas e restritas a habitats isolados, é especialmente vulnerável à perda de habitat e à hibridização. Diante disso, este estudo teve como objetivo sequenciar e caracterizar o genoma mitocondrial de *Cyprinodon* sp., visando esclarecer relações filogenéticas e aspectos evolutivos da família Cyprinodontidae. A amostra foi sequenciada na plataforma Illumina HiSeq, montada com o software Megahit e analisada com ferramentas como MitoZ, Circos, ClustalW, MrBayes e Figtree. O mitogenoma completo apresenta 16.500 pb, contendo 37 genes.

Paralelamente, *Arapaima gigas*, espécie símbolo da Amazônia e historicamente relevante para a pesca, encontra-se ameaçada de extinção e classificada como "Deficiente em Dados" pela IUCN. No rio Tocantins, fortemente impactado por atividades humanas, pescadores de 25 comunidades relataram a quase extinção da espécie, com apenas um registro recente na Ilha Jaracuera. O desaparecimento de *A. gigas* traz graves consequências econômicas às comunidades locais. Sem a colaboração entre gestores e comunidades, há risco iminente de extinção regional da espécie, agravado pela escassez de dados sobre sua pesca no norte do Brasil.

Palavras-chave: Conservação. Mitogenoma. Peixes.

ABSTRACT

The advancement of next-generation sequencing technologies has enabled large-scale characterization of mitochondrial genomes across various species. However, even among fish — the group with the highest number of sequenced mitochondrial genomes — only 9.7% of valid species are represented in genetic databases. This gap limits conservation programs, which rely on genetic data to guide management strategies. The genus *Cyprinodon*, composed of several threatened species restricted to isolated habitats, is particularly vulnerable to habitat loss and interspecific hybridization. In this context, the present study aimed to sequence and characterize the mitochondrial genome of *Cyprinodon* sp., in order to clarify phylogenetic relationships and evolutionary aspects of the Cyprinodontidae family. The sample was sequenced using the Illumina HiSeq platform, assembled with Megahit software, and analyzed using tools such as MitoZ, Circos, ClustalW, MrBayes, and Figtree. The complete mitogenome comprises 16,500 bp and contains 37 genes. Concurrently, *Arapaima gigas*, an iconic Amazonian species historically important to fisheries, is currently threatened with extinction and classified as “Data Deficient” by the IUCN. In the Tocantins River, heavily impacted by human activities, fishers from 25 communities reported the near disappearance of the species, with only one recent sighting on Jaracuera Island. The disappearance of *A. gigas* has severe economic consequences for local communities. Without collaboration between fishery managers and local populations, the species faces an imminent risk of regional extinction, further exacerbated by the lack of data on its fishing dynamics in northern Brazil.

Keywords: Conservation. Mitogenome. Fish.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

ddNTPs – *Dideoxynucleotide* (Didesoxinucleotídeos)

dNTPs – *Deoxynucleotide Triphosphates* (Desoxirribonucleotídeos trifosfato)

emPCR – *Emulsion PCR* (PCR em Emulsão)

IUCN – *International Union for Conservation of Nature* (União Internacional para a Conservação da Natureza)

mtDNA – *Mitochondrial DNA* (DNA Mitocondrial)

NGS – *Next Generation Sequencing* (Sequenciamento de Próxima Geração)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

pb – Par de Bases

qPCR – *Quantitative PCR* (PCR Quantitativo)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

tRNA – *Transfer Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico de Transferência)

tRNA-Ala – *Alanine Transfer Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico de Transferência de Alanina)

rRNA – *Ribosomal ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico Ribossomal)

sRNA – *Small ribonucleic Acid* (Pequenos Ácido Ribonucleicos)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	
1.1 Ictiofauna Neotropical.....	
1.2 Gênero <i>Cyprinodon</i>	
1.3 Tecnologias de sequenciamento de DNA.....	
1.4 Montagem <i>de novo</i>	
1.5 Genoma mitocondrial de peixes.....	
2. OBJETIVOS.....	
2.1 Objetivo geral.....	
2.2 Objetivos específicos.....	
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	
3.1 Aspectos éticos.....	
3.2 Coleta de material e extração de DNA.....	
3.3 Obtenção das sequências de DNA mitocondrial, montagem e anotação.....	
3.4 Análise filogenética.....	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	
4.1 Genoma mitocondrial de <i>Cyprinodon</i> sp.....	
4.2 Redução de estoques de <i>Arapaima gigas</i> no Baixo Tocantins.....	
5. CONCLUSÃO.....	
REFERÊNCIAS.....	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ictiofauna Neotropical

A região neotropical abriga a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, sendo cerca de 4.225 espécies, cujas ordens predominantes são Siluriformes (1.384), Characiformes (1.289), Cichliformes (354), Cyprinodontiformes (245) e Gymnotiformes (135) (TONELLA et al., 2023). Nesse contexto, a alta biodiversidade da região neotropical pode ser explicada pela sua grande extensão territorial, diversidade e heterogeneidade de ecossistemas e história evolutiva em relação à processos geológicos e climáticos, como a separação entre a América do Sul e a África, impacto de asteróide na costa de Yucatán-México, fechamento da rota marítima centro-americana e aquecimento seguido do resfriamento globais, o que culminou em inúmeros eventos de diversificação de espécies como radiações adaptativas, extinção e colonização (ANTONELLI, 2022).

No entanto, o antropoceno trouxe grandes desafios à contornar sobre a conservação da biodiversidade neotropical (ANDERMANN et al., 2020). Em se tratando de peixes, a erosão da diversidade de espécies é descrita com mudanças em níveis múltiplos de organização e condução à extinção (PELICICE et al., 2017). Um dos principais fatores para isso, é o exacerbado grau de fragmentação e degradação de habitat já consolidados, além de fatores como sobrepesca, poluição da água agrícola e urbana, desmatamento, mudanças climáticas e introdução de espécies exóticas invasoras (PELICICE et al., 2021; AGUIRRE et al., 2021).

1.2 Gênero *Cyprinodon*

O gênero *Cyprinodon*, pertencente à família Cyprinodontidae, compreende aproximadamente 50 espécies, onde 30 espécies ocorrem em regiões áridas da região Sudoeste da América do Norte e 20 espécies são endêmicas da região das Ilhas do Caribe à Península de Iucatã e de planícies costeiras de Massachusetts à Venezuela com distribuição alopátrica (ECHELLE et al., 2005). Denominadas popularmente como *pupfishes*, de acordo com dados da IUCN (2024), 3 espécies do gênero foram extintas (*Cyprinodon arcuatus*, *Cyprinodon inmemoriam* e *Cyprinodon ceciliae*), 3 espécies foram extintas na natureza (*Cyprinodon veronicae*, *Cyprinodon alvarezi* e *Cyprinodon longidorsalis*) e 5 espécies estão criticamente ameaçadas (*Cyprinodon diabolis*, *Cyprinodon latifasciatus*, *Cyprinodon pachycephalus*, *Cyprinodon higuey* e *Cyprinodon julimes*). Além disso, 11 espécies estão em

perigo de extinção (*Cyprinodon atrorus*, *Cyprinodon bifasciatus*, *Cyprinodon fontinalis*, *Cyprinodon meeki*, *Cyprinodon elegans*, *Cyprinodon salinus*, *Cyprinodon tularosa*, *Cyprinodon radiosus*, *Cyprinodon eremus*, *Cyprinodon bondi* e *Cyprinodon laciniatus*). Assim, muitas espécies são alvo de conservação *ex situ* ou em cativeiro, a fim da manutenção de populações contra a extinção em seus habitats naturais ou para restabelecimento de populações selvagens em declínio (BLACK et al., 2016; BLACK et al., 2017; BURG et al., 2019).

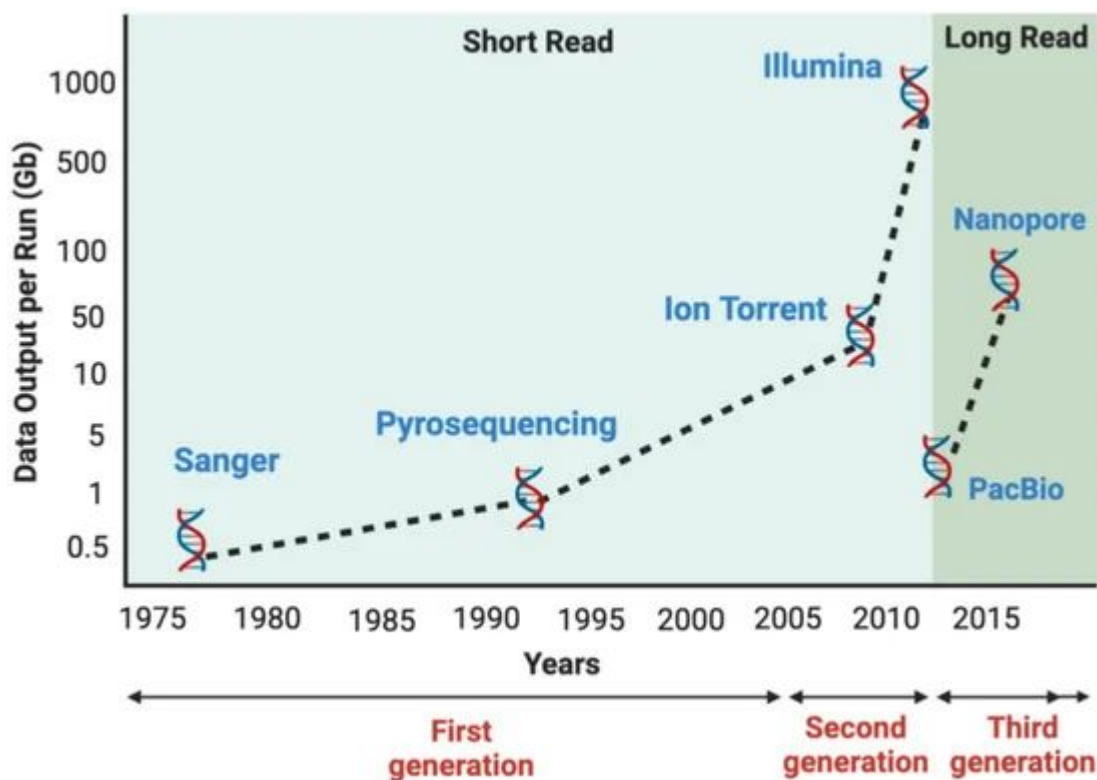
As espécies do gênero *Cyprinodon* são consideradas rústicas, resistentes a altas temperaturas e salinidade. A maioria das espécies está restrita a pequenas áreas ou nascentes isoladas e, por consequência, estão suscetíveis à perda de habitat e hibridização interespecífica (BLACK et al., 2021). Apesar disso, a capacidade adaptativa de *Cyprinodon spp.*, sobretudo em relação à salinidade do meio, levou ao surgimento da espécie *Cyprinodon brontotheroides*, advinda de uma radiação adaptativa das espécies *C. Variegatus* e *C. desquamator*, endêmicas de lagos hipersalinos da Ilha de San Salvador, Bahamas (MARTIN; WAINWRIGHT, 2013a). De acordo com Martin e Wainwright (2013b), a radiação pode ter ocorrido a menos de 10.000 anos, coincidindo com a formação dos lagos hipersalinos da ilha.

Nesse cenário, a rusticidade de *Cyprinodon spp.* vem sendo, também, avaliada como característica interessante para estudos toxicológicos sobre exposição à petróleo e absorção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, utilizando *C. Variegatus* como organismo modelo (FINCH; STUBBLEFIELD, 2016; MAGNUSON et al., 2018).

1.3 Tecnologias de sequenciamento de DNA

As tecnologias de sequenciamento de DNA evoluíram rapidamente (Figura 1), desde a descoberta da estrutura da molécula de DNA. Esse rápido avanço resultou no desenvolvimento de três gerações de sequenciamento de DNA e RNA até a atualidade (Satam et al., 2023).

Figura 1. Evolução das técnicas de sequenciamento de DNA ao longo dos anos e distribuição em três gerações de sequenciamento.



Fonte: Satam et al., 2023

A descoberta da estrutura de DNA, em 1953, possibilitou avanços na compreensão sobre a complexidade e diversidade do material genético (WATSON; CRICK, 1953). Após isso, surgiram esforços iniciais para o sequenciamento de ácidos nucleicos, centrados em genomas de bacteriófagos de RNA de fita simples, RNA de transferência (tRNA) e RNA ribossomal (rRNA), cuja primeira sequência completa de ácidos nucleicos bem sucedida foi de tRNA-Ala da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em 1965, facilitada pelo conhecimento prévio de enzimas RNase (HOLLEY, 1965). Simultaneamente, foi publicado por Sanger e colaboradores (1965) um método de detecção de fragmentos de digestão parcial radiomarcados após fracionamento bidimensional aplicado a rRNA e a pequenos RNAs (sRNA) de *Escherichia coli*. Subsequente a isso, uma mudança prática fundamental na técnica de determinação de bases nucleotídicas, foi a substituição do fracionamento bidimensional, baseado em cromatografia ou eletroforese, pela separação com base no comprimento da

cadeia nucleotídica por eletroforese em gel de poliacrilamida (SANGER; COULSON, 1975; MAXAM; GILBERT, 1977).

Apoiado por esses estudos, foi desenvolvido o primeiro método de sequenciamento bem sucedido de DNA a partir da adição de nucleotídeos marcados radioativamente, chamados de didesoxinucleotídeos ou ddNTPs, na cadeia de terminação na fita molde aplicado ao bacteriófago ϕ X174 (ou 'PhiX') para um fragmento do genoma (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1975) e posteriormente para o genoma completo do organismo (SANGER, 1977). Esse método foi amplamente aceito e adotado, denominado como sequenciamento de DNA de primeira geração ou sequenciamento de Sanger, que continuou a ser desenvolvido com a implementação da eletroforese capilar e a utilização de marcadores fluorescentes (ANSORGE et al., 1986; SWERDLOW; GESTELAND, 1990). Assim, a primeira máquina comercial de sequenciamento automatizado foi lançada em 1987 nos Estados Unidos, a Applied Biosystems ABI 370, a qual implementou o uso de ddNTPs marcadas com fluorescência e eletroforese capilar (BARBA; CZOSNEK; HADIDI, 2013).

Juntos aos esforços de aumentar a escala de sequenciamento da época, surgiu a técnica de pirosequenciamento, que consiste na determinação de sequências com base no monitoramento da síntese de pirofosfato inorgânico utilizando luciferase, ao passo que cada nucleotídeo é incorporado pelo sistema sobre o DNA molde (NYRÉN; LUNDIN, 1985; HYMAN, 1988). Essa técnica foi licenciada pela 454 Life Sciences e incorporada ao primeiro equipamento comercial de sequenciamento de segunda geração, também denominado *Next Generation Sequencing* (NGS) ou Sequenciamento de Próxima Geração, que permitia o sequenciamento massivamente paralelo de milhões de fragmentos de DNA em uma única reação por meio da amplificação de fragmentos de DNA em gotículas de água em óleo, *Polymerase Chain Reaction* de emulsão (emPCR) (MARGULIES et al., 2005). Isso culminou no desenvolvimento de novas técnicas e plataformas de sequenciamento como o Solexa com tecnologia baseada no processo de amplificação ou PCR “em ponte”, uma vez que os adaptadores ligados às extremidades de um fragmento ligam oligonucleotídeos em uma célula de fluxo, formando uma estrutura arqueada ou em ponte durante a replicação de DNA ocorre para iniciar o próximo ciclo de polimerização (VOELKERDING; DAMES; DURTSCHI, 2009). Outra plataforma de sequenciamento que agregou importantes mudanças tecnológicas na época, foi a SOLid que diferente dos métodos anteriores de Sanger e pirosequenciamento, não realiza sequenciamento por síntese, ou seja, que requerem a ação de DNA polimerase com nucleotídeos marcados, mas por ligação que utiliza uma DNA ligase, em que cada sinal de fluorescência é emitido a partir da combinação de dois nucleotídeos (MCKERNAN, 2009).

Nesse cenário, uma característica comum das tecnologias de sequenciamento de segunda geração é a produção de leituras curtas, sequências de DNA em pares de base (pb) de 250 a 800 pb. Além disso, o fluxo de trabalho de NGS é composto pelas etapas de preparo de bibliotecas, sequenciamento e análise de dados (TUCKER; MARRA; FRIEDMAN, 2009). Essas plataformas levaram a avanços significativos no desenvolvimento das ciências “-ômicas”, áreas da biologia molecular que atuam na caracterização em larga escala e resolução de unidades biológicas e organismos (VEENSTRA, 2021). Possibilitando, assim, a identificação e distinção de diversidade de conteúdo, arquitetura e biologia de genomas mitocondriais de diversas espécies animais e vegetais (GUALBERTO; NEWTON, 2017; LAVROV; PETT, 2016).

As tecnologias de terceira geração são fundamentadas na técnica de sequenciamento de molécula única, divergindo das gerações anteriores, que são dependentes da amplificação de DNA. Desenvolvida no início dos anos 2000, a tecnologia de sequenciamento de molécula única consistia na anexação de DNA em uma superfície plana, seguida da lavagem e fotografia de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) de terminadores fluorescentes, sendo uma base por vez (BRASLAVSKY et al., 2003). A partir dessa tecnologia, originou-se o sequenciamento de molécula única em tempo real, a qual é baseada na difração da luz com o auxílio de guia de ondas de modo zero, pequenos orifícios de uma liga metálica que cobre um chip, iluminando, portanto, apenas o fundo dos poços, e permitindo a visualização de moléculas únicas de fluoróforo. A sequência nucleotídica pode ser monitorada em tempo real pela incorporação de nucleotídeos fluorescentes à cadeia de DNA, cujo sinal de fluorescência para determinada posição é encerrado após a clivagem do corante (EID, 2009). Atualmente, a última ramificação do sequenciamento de terceira geração, é o sequenciamento de nanoporos em que um campo elétrico conduz uma fita simples de DNA através de um canal iônico em uma membrana de bicamada lipídica por eletroforese. Ademais, a passagem pelo canal iônico limita o fluxo de íons e diminui a corrente em tempo proporcional ao comprimento de ácidos nucléicos específicos (HAQUE et al., 2013). As primeiras plataformas de sequenciadores de nanoporos foram GridION e MinION da *Oxford Nanopore Technologies* (EISENSTEIN, 2012). Essas diferentes plataformas de sequenciamento de terceira geração podem gerar leituras longas com comprimentos superiores a 10 kb (VAN DIJK et al., 2014).

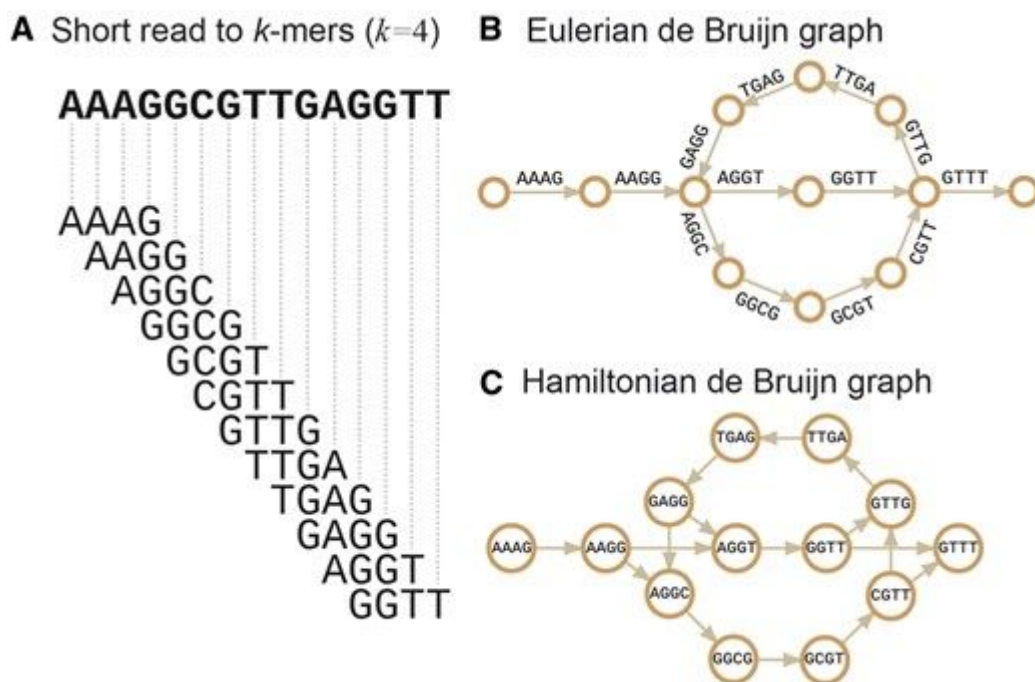
Tecnologias de leituras longas podem contornar problemas encontrados na utilização de leituras curtas como sequências repetitivas e detecção de variantes estruturais. No entanto, a precisão por leitura e o rendimento são de menor qualidade em comparação a tecnologias de leituras curtas (ADEWALE, 2020).

1.4 Montagem *de novo*

O avanço nas tecnologias de NGS revolucionou o sequenciamento de DNA e RNA com rapidez e alto rendimento, resultando em um grande volume de dados de sequências genômicas, inclusive de organismos não-modelo (MOREY et al., 2013). Nesse sentido, as abordagens de montagem de genoma *de novo*, processo de construção de um genoma a partir de leituras de sequenciamento com ausência de um genoma de referência, acompanharam a evolução tecnológica das plataformas de sequenciamento (LIAO et al., 2019). A estratégia *de novo* também pode ser aplicada à montagem de genomas mitocondriais (KUANG; YU, 2019) e cloroplastos (ŠTORCHOVÁ; KRÜGER, 2024).

Os programas de montagem *de novo* são majoritariamente baseados na implementação de grafos *de Bruijn*, o qual faz a decomposição das sequências em *substrings* de comprimento k ou k -mers. Por exemplo, uma leitura de 100 nucleotídeos pode ser dividida em k -mers sobrepostos de comprimento de 46 a 55 (COMPEAU et al., 2011). Nessa estrutura, todas as leituras são divididas em $L-k+1$, onde L representa o comprimento da leitura e k é o tamanho da *substring*, o que confere menor esforço computacional para montagem. Além disso, há dois tipos de classificação de grafos *de Bruijn*, sendo grafos hamiltonianos e eulerianos com diferentes formas de expressão de nós e arestas (Figura 2) (SOHN; NAM, 2018). Um exemplo de programa que integra grafos *de Bruijn* é o Megahit, projetado para montagem de leituras curtas de dados metagenômicos grandes e complexos, com uso eficiente de memória de uma unidade de processamento gráfico (LI et al., 2015). Para avaliação da qualidade da montagem, uma métrica essencial é o valor de N50, em que 50% do total de pares de bases do genoma esteja contido em *contigs* (ALHAKAMI et al., 2017).

Figura 2. (A) Na abordagem de grafos *de Bruijn*, leituras curtas são divididas em k -mers antes da construção de grafos. (B) Na abordagem hamiltoniana de grafos *de Bruijn*, os k -mers são os nós. (C) Na abordagem euleriana de grafos *de Bruijn*, os k -mers são as arestas. Os k -mers são conectados aos vizinhos pela sobreposição de prefixo e sufixo $(k-1)$ -mers.



Fonte: Sohn; Nam, 2018.

1.5 Genoma mitocondrial de peixes

Os genomas mitocondriais de animais bilaterais foram bem caracterizados como genomas pequenos (~16–17 kb) e circulares (BOORE, 1999), codificantes de pequena parte de genes responsáveis pelos mecanismos funcionais mitocondriais (SCHULZ; SCHENDZIELORZ; REHLING, 2015), de herança majoritariamente materna (MUNASINGHE; ÅGREN, 2023) e possuem região controle com alta taxa de polimorfismo e níveis reduzidos de recombinação homóloga (FILIP et al., 2023). Além disso, coevoluem de forma complexa com genes nucleares codificantes de proteínas com funções mitocondriais como na estrutura, replicação e transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA) (SLOAN et al., 2018). A estrutura padrão do genoma mitocondrial é composta por 13 genes codificadores de proteínas, 2 genes de rRNA, 22 genes de tRNA e a região controle D-Loop. De forma geral, em eucariotos, o mitogenoma pode variar em tamanho e número de genes (LADOUKAKIS; ZOUROS, 2017; SHARBROUGH et al., 2023). Em peixes, os genomas mitocondriais contêm o conjunto padrão de genes, com estruturas conservadas em subunidades do citocromo c oxidase (COI) e sítios invariáveis em 12S rRNA e 16S rRNA (ALVARENGA et al., 2024). No entanto, desvios de conteúdo e ordem genética do mitogenoma podem ocorrer entre peixes, como identificado em espécies da ordem Perciformes (SATO et al., 2016). Peixes

representam o grupo de animais com maior número de genomas mitocondriais sequenciados, no entanto, apenas 9,7% de espécies válidas são depositadas em banco de dados como o GenBank (SAYERS et al., 2023).

Nesse sentido, o mtDNA é um eficiente marcador molecular para estudos de evolução molecular (DOWLING; WOLFF, 2023), genética forense (ROCCARO et al., 2021), identificação de espécies e ictiodiversidade a partir de DNA *barcoding* (ALI et al., 2020), além de ser uma potencial ferramenta para fiscalização de espécies com captura controlada (SANTANA et al., 2023) e manejo conservacional de peixes com técnicas de DNA ambiental (SCHROETER et al., 2020). Para a aplicação do DNA mitocondrial como ferramenta de pesquisa e gestão, é necessário o uso de bancos de dados de sequências para busca de iniciadores ou atribuição taxonômica (GOLDBERG et al., 2016). Apesar de existirem bancos de dados de DNA mitocondrial de peixes como *Fish Barcode of Life* (FISH-BOL) (WARD et al., 2009) e MitoFish (IWASAKI et al., 2013), essas ferramentas carecem de representação abrangente de espécies, necessitando de expansão contínua além da inclusão de regiões genéticas taxonomicamente discriminativas além do gene COI, majoritariamente utilizado em projetos, como RNA ribossômico 12S, 16S rRNA e CytB (SCHROETER et al., 2020).

Essa representação ampla de recursos mitocondriais para espécies aquícolas em bases de dados é fundamental para ampliação e eficiência do uso do DNA mitocondrial, uma vez que a utilização de um único recurso como o gene COI pode impossibilitar projetos de *primers* de *Quantitative PCR* (qPCR) específicos para espécies, *primers* universais para metabarcoding e resolução taxonômica a nível de espécie (SCHROETER et al., 2020). Nesse sentido, incertezas taxonômicas e falta de recursos genéticos são fatores limitantes em programas de conservação de espécies de peixes, uma vez que é possível fornecer evidências para melhor tomada de decisão de gestão de recursos pesqueiros por meio de caracterização e monitoramento de espécies e populações (THEISSINGER et al., 2023).

Dada a relevância ecológica de *Cyprinodon* spp., a importância da compreensão da organização genética dessas espécies para conservação e o uso potencial de genomas mitocondriais como ferramenta investigativa, objetivou-se sequenciar e caracterizar o genoma mitocondrial de *Cyprinodon* sp. a fim de esclarecer relações filogenéticas e aspectos evolutivos da família Cyprinodontidae.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o genoma mitocondrial de *Cyprinodon* sp. para fins de análise evolutiva e avaliar a percepção de estoques pesqueiros de *Arapaima gigas* na microrregião amazônica do Baixo Tocantins.

2.2 Objetivos específicos

- Sequenciar o genoma mitocondrial completo de *Cyprinodon* sp., utilizando Sequenciamento de Próxima Geração;
- Realizar montagem do genoma mitocondrial de *Cyprinodon* sp.;
- Fazer anotação e caracterização do genoma mitocondrial de *Cyprinodon* sp.;
- Realizar análise comparativa de genomas mitocondriais entre espécies do gênero *Cyprinodon* disponíveis no NCBI por meio de uma árvore filogenética;
- Avaliar a percepção ambiental de pescadores no Baixo Tocantins sobre a pesca de *Arapaima gigas* e o monitoramento ambiental realizado na região.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi realizado em conformidade com os preceitos da Lei nº 64-00 Geral do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais do governo da República Dominicana, decreto nº 361-22, de 7 de julho de 2022, sob protocolo DJ-C-1-2023-0097, aprovado em 9 de outubro de 2023.

3.2 Coleta de material e extração de DNA

Amostras de tecido de nadadeira caudal e dorsal foram coletadas de um indivíduo de *Cyprinodon* sp. Encontrado na Laguna El Salado del Muerto, Salinas Baní, as amostras foram armazenadas em freezer (-20 °C) até o momento de extração de DNA. O DNA foi isolado utilizando o *DNA extraction and purification kit blood and tissue handbook*® (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante, modificando apenas o período de incubação para 30 minutos. A quantificação e análise de pureza do DNA total foram verificadas no espectrofotômetro Biodrop Duo UV/Vis.

3.3 Obtenção das sequências de DNA mitocondrial, montagem e anotação

A sequência completa do mitogenoma de *Cyprinodon* sp. foi obtida a partir da tecnologia de sequenciamento de próxima geração, plataforma Illumina HiSeq 2000TM. A montagem foi realizada pelo programa Megahit (Li et al., 2015) utilizando o *k*-mer 71, selecionado após avaliação de dados brutos com o *software* Kmerstream (Melsted et al., 2014). Posteriormente, os *contigs* foram submetidos ao Mitoz (Meng et al., 2019) para extração das sequências do mitogenoma, seguido da anotação e representação visual com o programa Circos (Krzywinski et al., 2009). A composição de nucleotídeos básica foi calculada usando o pacote BioSeqUtils na biblioteca BioPython (Cock et al., 2009) em Python 3.12.

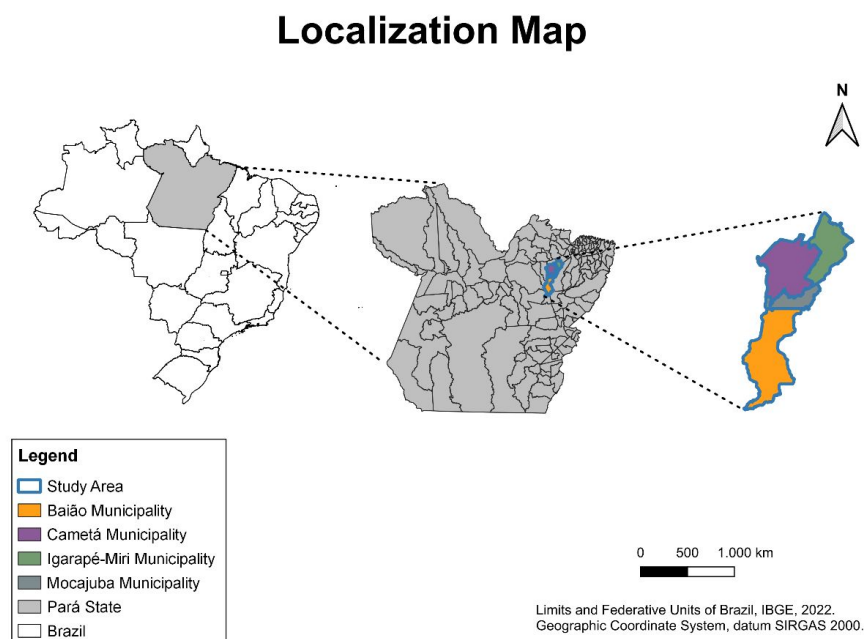
3.4 Análise filogenética

Para reconstruir a árvore filogenética, será realizado o alinhamento de múltiplas sequências utilizando o programa de alinhamento ClustalW com os parâmetros pré-definidos do MEGA 11 (Tamura, et al., 2021). As Inferências Bayesianas serão executadas usando *Markov-Chain Monte Carlo* em duas execuções simultâneas de cadeias de 5.000.000 gerações no Mr. Bayes versão 3.1.2, com uma frequência de amostragem a cada 1.000^o geração (Ronquist; Huelsenbeck, 2003). As primeiras mil árvores serão descartadas como burn-in e a probabilidade posterior de cada nó será calculada a partir das árvores restantes, e examinadas no Figtree v1.4.4 (Rambaut, 2009).

3.5 Área de estudo

O estudo de *Arapaima gigas* alcançou comunidades pesqueiras pertencentes aos municípios Baião, Mocajuba, Cametá e Igarapé-Miri do Estado do Pará, região Norte do Brasil (Figura 3). A região deste estudo é cercada por cursos de água pertencentes à parte baixa do Rio Tocantins.

Figura 3. Mapa ilustrativo da área de estudo em municípios amazônicos (Pará, Brasil).



Fonte: os autores.

A região apresenta uma temperatura anual média de 26°C, clima tropical úmido megatérmico, com índice pluviométrico anual da ordem de 2.000 mm e um período climático bem definido com maiores vazões no período de dezembro a maio e menores de agosto a novembro (IDESP, 2014).

O município Baião abrange uma área de 3.202,399 km² e possui aproximadamente 49.454 habitantes. O município Mocajuba compreende uma área de 871.171 km² e contém por volta de 31.917 habitantes. O município Cametá envolve uma área de 3.081,367 km² e apresenta em torno de 140.814 habitantes. O município Igarapé-Miri engloba uma área de 1.996,790 km² e conta com cerca de 63.367 habitantes (IBGE, 2021).

3.6 Levantamento dos dados

No período de Dezembro de 2017 a Dezembro de 2018, foram entrevistados 25 pescadores de 25 comunidades pesqueiras da região do Baixo Rio Tocantins (Tabela 1). As entrevistas foram estruturadas com base em dados pessoais, censo populacional do *A. gigas* na

região, atividade pesqueira e informações correlatas. Perguntas abertas e fechadas foram aplicadas. Cada entrevista ocorreu a partir da indicação dos representantes das comunidades pesqueiras e de pescadores, conforme a técnica de amostragem não probabilística bola de neve (Vinuto, 2014).

Município	Comunidade pesqueira	Número de entrevistados
Baião	Limão	6
	Vila Iteguara	
	Joana Peres	
	Boa vista	
	Itaperuçú	
	Vila Bom Sucesso	
Cametá	Ilha de Itamduba	9
	Jurmate	
	Ilha Marinteua	
	Ilha Jakacuera-	
	Curuçambaba	
	Ilha Murucu Carmo	
	Ilha Jaracuera	
	Cuxipiari Carmo	
	Itaúna Baixo	
Igarapé-Miri	Santa Maria do Maracu	6
	Joarimbu	
	Ilha da Santana da Conceição	
	Muritipucu	
	Panacuera	
	Pindobal Grande	
Mocajuba	Ilha do Tauaré	4
	Ilha de Santana	

Informações abertas citadas pelos pescadores como espécies de peixes capturadas e relações apontadas entre alterações na dinâmica populacional de peixes e intervenções humanas no ambiente foram registradas em relatório de viagem. Para identificar as espécies citadas, utilizou-se o catálogo de peixes do Baixo Tocantins (Juras, 2004).

3.7 Avaliação de informações publicadas e não publicadas

Realizamos um levantamento de informações publicadas em artigos científicos acerca de estudos populacionais de *Arapaima gigas*, plano de gestão pesqueira e conservação da espécie no Brasil e no mundo. A partir disso, as informações obtidas nos questionários foram

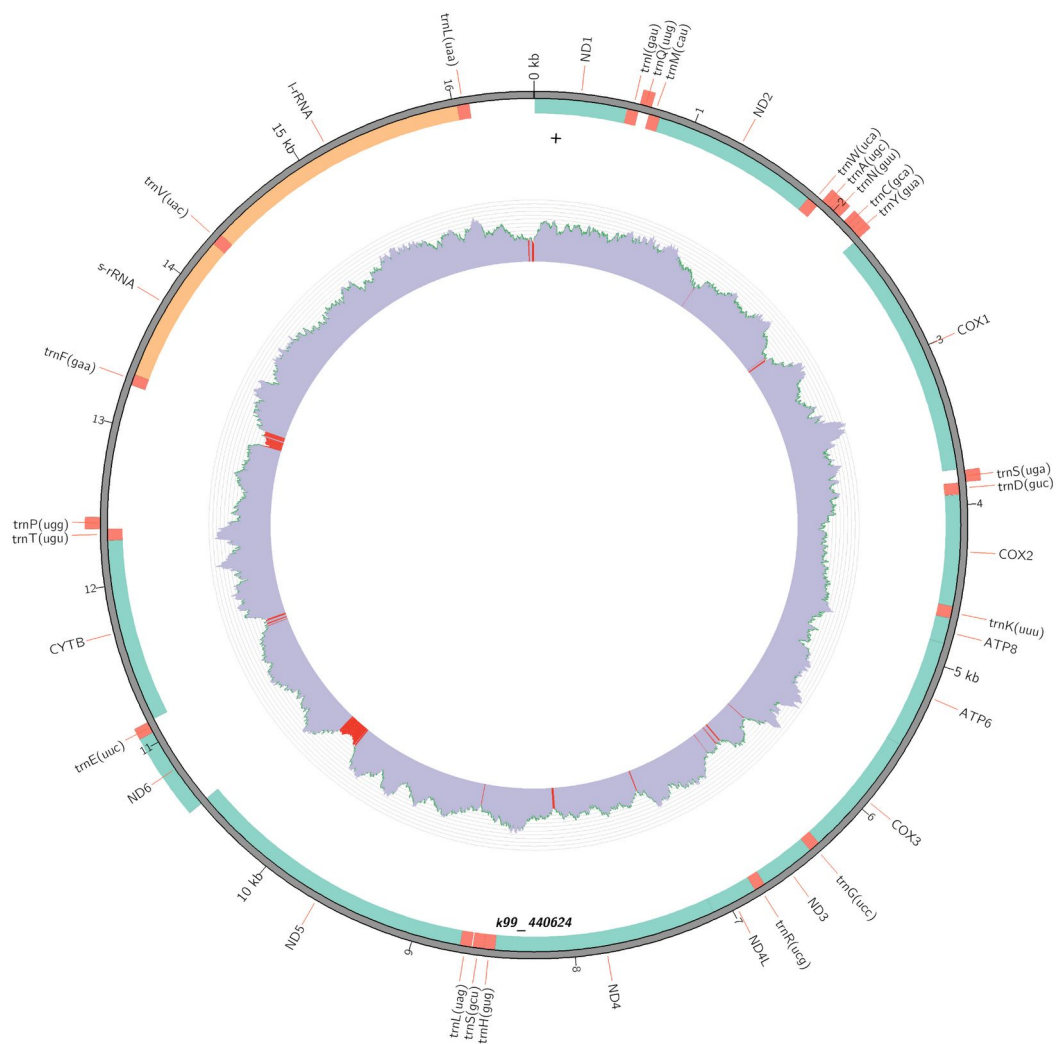
comparadas para identificação de informações novas e prospecção de status de abundância populacional de *A. gigas* na região do Baixo Rio Tocantins e o impacto na comunidade local.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Genoma mitocondrial de *Cyprinodon* sp.

A montagem gerou o total de 498.633 *contigs* com o total de 522.941.889 pb, valor de N50 de 1.396 pb e comprimentos mínimo, médio e máximo de *contigs* de 200 pb, 1.048 pb e 16.605 pb, respectivamente. O genoma mitocondrial completo de *Cyprinodon* sp. compreende uma molécula circular medindo 16.500 pb de comprimento (Figura 2), obtido a partir da montagem do genoma e análise dos *contigs* na plataforma Mitoz. O mitogenoma é composto pelo total de 37 genes, incluindo 13 genes codificadores de proteínas, 22 tRNAs e 2 genes rRNA. O perfil genético e a categorização funcional do mitogenoma estão apresentados na Tabela 2. A composição nucleotídica do mitogenoma é em média A: 26,25%; T: 27,18%; C: 29,61%; G: 16,94% e conteúdo geral AT de 53,43% e GC de 46,55%.

Figura 3. A organização do genoma mitocondrial de *Cyprinodon* sp.



Tipo de gene	Nome	Posição inicial	Posição final	Comprimento (pb)	Fita de DNA	Produto
Codificadores de proteínas	ND1	5	575	571	L	<i>NADH dehydrogenase subunit 1</i>
	ND2	788	1835	1048	L	<i>NADH dehydrogenase</i>

						<i>subunit 2</i>
	COX1	2226	3780	155	L	<i>Cytochrome c oxidase subunit I</i>
	COX2	3940	4639	700	L	<i>Cytochrome c oxidase subunit II</i>
	ATP8	4706	4874	169	L	<i>ATP synthase F0 subunit 8</i>
	ATP6	4864	5548	685	L	<i>ATP synthase F0 subunit 6</i>
	COX3	5547	6333	787	L	<i>Cytochrome c oxidase subunit III</i>
	ND3	6404	6755	352	L	<i>NADH dehydrogenase subunit 3</i>
	ND4L	6822	7119	298	L	<i>NADH dehydrogenase subunit 4L</i>
	ND4	7112	8498	1387	L	<i>NADH dehydrogenase subunit 4</i>

	ND5	8712	10551	1840	L	<i>NADH dehydrogenase subunit 5</i>
	ND6	10547	11069	523	L	<i>NADH dehydrogenase subunit 6</i>
	CYTB	11141	12281	1141	L	<i>Cytochrome b</i>
tRNA	trnI(gau)	580	650	71	L	<i>tRNA-Ile</i>
	trnQ(uug)	649	720	72	H	<i>tRNA-Gln</i>
	trnM(cau)	719	788	70	L	<i>tRNA-Met</i>
	trnW(uca)	1834	1906	73	L	<i>tRNA-Trp</i>
	trnA(ugc)	1908	1977	70	H	<i>tRNA-Ala</i>
	trnN(guu)	1978	2051	74	H	<i>tRNA-Asn</i>
	trnC(gca)	2088	2154	67	H	<i>tRNA-Cys</i>
	trnY(gua)	2155	2225	71	H	<i>tRNA-Tyr</i>
	trnS(uga)	3792	3863	72	H	<i>tRNA-Ser</i>

	trnD(guc)	3866	3936	71	L	<i>tRNA-Asp</i>
	trnK(uuu)	4631	4705	75	L	<i>tRNA-Lys</i>
	trnG(ucc)	6332	6404	73	L	<i>tRNA-Gly</i>
	trnR(ucg)	6753	6822	70	L	<i>tRNA-Arg</i>
	trnH(gug)	8493	8562	70	L	<i>tRNA-His</i>
	trnS(gcu)	8562	8630	69	L	<i>tRNA-Ser</i>
	trnL(uag)	8639	8712	74	L	<i>tRNA-Leu</i>
	trnE(uuc)	11069	11137	69	H	<i>tRNA-Glu</i>
	trnT(ugu)	12282	12354	73	L	<i>tRNA-Thr</i>
	trnP(ugg)	12353	12423	71	H	<i>tRNA-Pro</i>
	trnF(gaa)	13256	13324	69	L	<i>tRNA-Phe</i>
	trnV(uac)	14269	14341	73	L	<i>tRNA-Val</i>
	trnL(uaa)	16026	16100	75	L	<i>tRNA-Leu</i>
rRNA	s-rRNA	13324	14269	946	L	<i>12S ribosomal RNA</i>

	l-rRNA	14342	16026	1685	L	<i>16S ribosomal RNA</i>

Tabela 2. Lista de genes mitocondriais anotados de *Cyprinodon* sp. e seu produto genético. L: . H: *Heavy strand*; L: *Light strand*.

4.2. Redução de estoques de *Arapaima gigas* no Baixo Tocantins

Artigo: *Arapaima gigas* stocks have declined drastically in the lower Tocantins River in the Amazon Microregion (<https://doi.org/10.1590/0001-3765202420231343>) (2024)

Autoria: Daralyns B. Macedo, Jeanderson S. Viana, Hendrya Julianny P. Coelho, Caio Vitor C. Costa, Dárcia Gabriela B. Da Costa, Ádria D. Dos Santos, Regianne M.S. Correa, Rommel Thiago J. Ramos & Marília Danyelle N. Rodrigues



An Acad Bras Cienc (2024) 96(3): e20231343 DOI 10.1590/0001-3765202420231343
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

ECOSYSTEMS

***Arapaima gigas* stocks have declined drastically in the lower Tocantins River in the Amazon Microregion**

DARALYNS B. MACEDO, JEANDERSON S. VIANA, HENDRYA JULIANNY P. COELHO, CAIO VITOR C. COSTA, DÁRCIA GABRIELA B. DA COSTA, ÁDRIA D. DOS SANTOS, REGIANNE M.S. CORREA, ROMMEL THIAGO J. RAMOS & MARÍLIA DANYELLE N. RODRIGUES

Abstract: *Arapaima gigas*, an emblematic species of the Amazon region and a longstanding primary fishing resource, currently holds a "Data Deficient" status on the International Union for Conservation of Nature Red List, and is listed as an endangered species in Brazil. The Tocantins River is the most extensively modified large tributary of the Amazon Basin, and thus can affect the dynamics of ichthyofaunal populations. Over a period of 1 year, representatives of the fishing communities and fishermen from 25 fishing communities from four municipalities in the lower Tocantins River region were interviewed, and the obtained information was evaluated based on the literature to survey the population abundance status of *A. gigas* in the region and its impact on local communities. Among the fishermen interviewed, only one reported still encountering and fishing *A. gigas* on Jaracuera Island. The disappearance of *A. gigas* in the region are viewed as having economically disastrous consequences for the residents. Additionally, other endemic fish species are no longer observed in this locality either. If fishery management officials do not work together with local communities, *A. gigas* could disappear from the northern region of Brazil, where information on the dynamics of *A. gigas* fishing is lacking.

Key words: Amazon Region, Fisheries, Hydroelectric Power Plan, Ichthyodiversity, Pirarucu, Traditional Communities.

INTRODUCTION

The Tocantins River Basin is one of the largest bodies of water in the eastern Amazon. With a total area of 764,996 km², this region is larger than countries such as France and Ecuador (de Jesus et al. 2020), and is the only river valley in the Brazilian Amazon that encompasses more than three states and different biomes, including the Cerrado, Plateau, and Amazon Forest (Oliveira-Filho & Ratterf 1995). Owing to its evolutionary history among the Amazonian tributaries, the lower Tocantins River harbors diverse

ichthyofauna, which are closely associated with Amazonian species, and has high fish species richness (Dagosta & Pinna 2019).

Arapaima gigas (Schinz 1822), known as "Pirarucu" in Brazil and "Paiche" in Peru and Bolivia, is an emblematic fish of the Amazon region (Miranda-Chumacero et al. 2012). Once considered the most important fishing resource in the Brazilian Amazon (Castello et al. 2015), this species plays a crucial role in supporting the livelihoods of traditional communities in the region with regards to ethnopharmacology (Alves & Rosa 2007) and food (Prestes-Carneiro

et al. 2016). Furthermore, *Arapaima* spp. are considered premium fish from which products with a high potential for competition in the fishing market, such as frozen or salted fillets and loins, can be obtained (Mesquita et al. 2022). This provides both employment and a source of income for local fishermen, highlighting the importance of the *A. gigas* chain.

At the end of the 20th century, *A. gigas* was listed in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Fauna and Flora because of commercial fishing pressure in the Amazon River (Castello & Stewart 2010). This has led to efforts by riverside communities to implement local measures aimed at rational utilization of *A. gigas* fisheries, which received legal recognition from the Brazilian government in the late 1990s (Francisco et al. 2015). Currently, *A. gigas* is listed in the “Almost Threatened” category on the Brazilian list of endangered species (MMA 2018); however, in 2016, *A. gigas* was not listed due to insufficient distribution and population abundance data (Castello et al. 2015). Internationally, this species is categorized as “Data Deficient” on the Red List of the International Union for Conservation of Nature (World Conservation Monitoring Centre 1996), highlighting the need for sufficient information to assess the risk of extinction of the species.

Human activities are the main contributor to the global decline in biodiversity. Urban expansion and agriculture have resulted in the destruction, fragmentation, and loss of habitats for several animal and plant species that cannot adapt to the stresses imposed by human-altered environments (Hunter 2007). The decline in biodiversity poses a major risk to the functioning of ecosystems and their capacity to provide society with essential goods and services. Simplified ecosystems only yield short-term gains, but their costs are incurred

by future generations (Cardinale et al. 2012). The inauguration of one of the largest hydroelectric projects worldwide on the Tocantins River has been predicted to have disruptive effects on the local socioeconomy, directly affecting subsistence activities such as fishing (Barrow 1987). Currently, the Tocantins River is the most extensively modified large tributary in the Amazon Basin (Davidson et al. 2012).

Variations in the dynamics of ichthyofaunal populations can be easily identified by traditional communities engaged in subsistence fishing activities. The causes of these variations are identified over the long term because of ethnoenvironmental knowledge that has been developed and passed down over generations (Fainguelernt 2020). To improve our understanding of the future effects of environmental changes in the lower Tocantins River on the local bioeconomy supported by *A. gigas* fishing, we evaluated the environmental perceptions of fishing communities in the lower Tocantins River in terms of the population abundance of *A. gigas* and its relationship with human activity.

MATERIALS AND METHODS

Study area

In this study, fishing communities belonging to the municipalities of Baião, Cametá, Igarapé-Miri, and Mocajuba in the State of Pará, northern Brazil, were interviewed (Figure 1). The study region is located on the banks of the lower Tocantins River.

The region has an average annual temperature of 26 °C, a humid tropical megathermal climate with an annual rainfall of approximately 2,000 mm, and a well-defined climatic period with the highest flows from December to May and lowest from August to November (IDESP 2014).

Localization Map

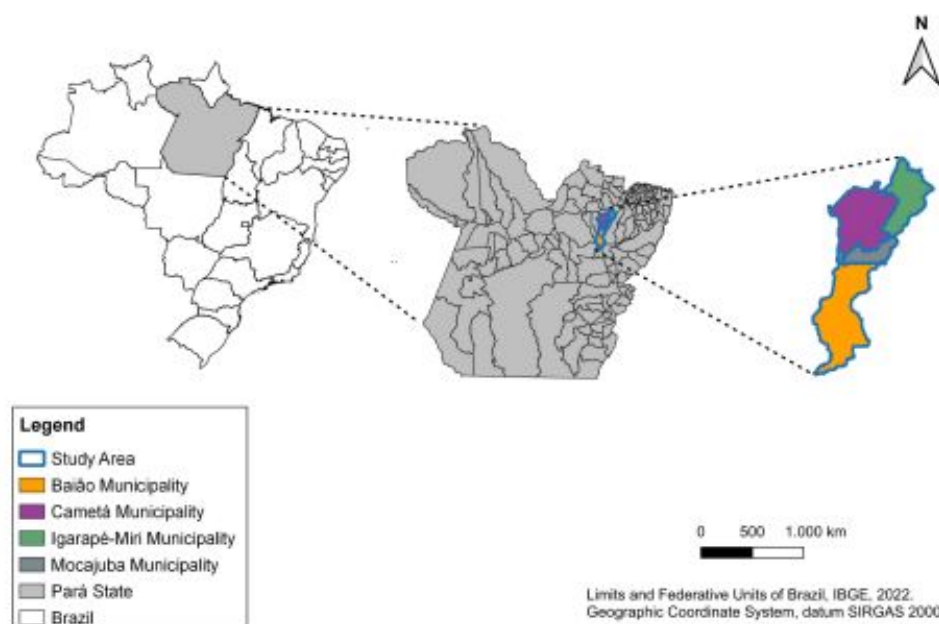


Figure 1. Map of the study area in Amazon municipalities in the State Pará, Brazil.

The Baião, Cametá, Igarapé-Miri, and Mocajuba municipalities have areas of 3,202,399, 3,081,367, 1,996,790, and 871,171 km² and have approximately 49,454, 140,814, 63,367, and 31,917 inhabitants, respectively (IBGE 2021).

Data collection

From December 2017 to December 2018, 25 fishermen from 25 fishing communities in the lower Tocantins River region were interviewed (Table I). Interviews were structured based on personal data, population censuses of *A. gigas* in the region, fishing activities, and related information. Open- and closed-ended questions were also used. Each interview was based on the indications of the representatives of the fishing communities and fishermen according to the non-probabilistic snowball sampling technique (Vinuto 2014).

Open information cited by fishers, such as the species of fish caught and the relationships identified between changes in fish population dynamics and human interventions in the environment, were recorded in a trip report. Fish catalogs from Baixo Tocantins were used (Santos et al. 2004).

Assessment of published and unpublished information

We conducted a survey of the information published in scientific articles on population studies of *A. gigas*, fishing management plans, and conservation of the species in Brazil and globally. The information obtained from the questionnaires was compared to identify new information and predict the population abundance status of *A. gigas* in the lower Tocantins River region and its impact on the local community.

Table I. Number of respondents per fishing community and municipality

Municipality	Fishing community	Number of respondents
Baião	Limão	6
	Vila Iteguara	
	Joana Peres	
	Boa vista	
	Itaperuçú	
	Vila Bom Sucesso	
Cametá	Ilha de Itamduba	9
	Jurmate	
	Ilha Marinteua	
	Ilha Jakacuera-Curuçambaba	
	Ilha Murucu Carmo	
	Ilha Jaracuera	
	Cuxipiarí Carmo	
	Itaúna Baixo	
	Santa Maria do Maracu	
Igarapé-Miri	Joarimbu	6
	Ilha da Santana da Conceição	
	Muritipucu	
	Panacuera	
	Pindobal Grande	
Mocajuba	Ilha do Tauraré	4
	Ilha da Santana	

RESULTS

Fishing activity and social value

The interviewed fishermen were between 33 and 69 years of age and had been fishing since childhood or their youth. Fishing was identified as the main activity of those interviewed, followed by agriculture with the planting of cassava and sugarcane. The number of family members interviewed who depended on fishing reached 55 for a single fisherman whose brothers, children, and grandchildren were

involved in additional activities and trade in the fishing chain in the municipality of Cametá.

For people who depended solely on fishing for subsistence, the lowest monthly income per family reached 200 reais, and the highest, with government aid, was approximately 1,320 reais. All the local communities stated that they depended on fishing for subsistence, with some fishing only for their own consumption or to sell and buy other sources of protein such as beef and poultry. Statements regarding fishing being essential for family sustenance were common.

Most fishermen reported an increase in the price and demand for fish, but claimed that the quantity caught has decreased drastically in recent years, which has harmed their families' livelihoods.

Perception of population abundance of *A. gigas*

Among all the fishermen interviewed from the four municipalities studied, only one reported still finding and fishing *A. gigas* in Ilha Jaracuera, Cametá municipality, between March and October. Individuals reported fishing for their own consumption. Fishermen from the community located in the Joana Peres extractive reserve (resex ipaú-anilzinho), Baião municipality, reported a decline in *A. gigas* populations over the last 20 years in which they have been practicing fishing. During this period, they observed changes in the way the species was fished, such as the replacement of harpoons with nets, indicating that more fish were captured. The disappearance of *A. gigas* has had economically disastrous consequences for the residents, with one 68-year-old fisherman from Cametá municipality stating "today *A. gigas* is needed, it costs 20.00 reais per kilo," with the value referring to the market for the final consumer in the region.

In addition to the disappearance of *A. gigas* stocks and populations in the Lower Rio Tocantins region, fishermen have noted drastic population declines in other species such as *Piaractus mesopotamicus*, *Piaractus brachipomus*, *Semaprochilodus taeniurus*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Brachyplatystoma filamentosum*, *Prochilodus nigricans*, and *Brycon amazonicus*.

Perception of anthropogenic activities related to the decrease in *A. gigas* stocks

The fishermen suggested several causes for the change in the population dynamics of *A. gigas* (Table II), with the main reason being environmental changes caused by the construction of the Tucuruí hydroelectric plant, and secondary reasons being overfishing and pollution in the Tocantins River and its tributaries. Despite this, there have been no reports of dead fish being found, only their disappearance. According to the ethnoenvironmental knowledge offered by the fishermen, the human activities mentioned have a direct effect on the successful adaptation of *A. gigas* to the altered

environment, which suggests that the pressure induced by overfishing of the species is greater than its resilience to environmental stresses.

Inspection over local fishing was categorized at the national, municipal, and local levels, which fishermen defined as efficient only at the local level through the so-called "fishing agreements" that many fishermen claimed to be part of. They also highlighted the low frequency of inspection and control overfishing by government bodies: "I would be happier if the competent bodies controlled fishing", "People say there is supervision, but I have never seen it", "There is, but it is little...once a year". The quantities caught and demanded, and the price paid for fish are the types of information that communities state to have no public institutional monitoring.

DISCUSSION

Disappearance of *A. gigas*

The absence of *A. gigas* in the lower Tocantins River and its tributaries was the predominant perception of fishermen from

Table II. Ethnoenvironmental knowledge of fishermen associated with the disappearance of *A. gigas* in the municipalities of Igarapé-Miri, Cametá, Mocajuba and Baião in the North of Brazil.

Municipality	Ethnoenvironmental knowledge
Igarapé-Miri	"Catch fish near natural nursery"
Mocajuba	"Lots of people fishing, this can cause fishing problems"
Igarapé-Miri	"The dam caused the fish to be drowned"
Baião	"With the hydroelectric plant, there is not enough water at the right time for the fish to spawn"
Baião	"It is planned to excavate the Tocantins River, Pedral do Lourenço project...no benefit for fishermen...it will scare the fish away to other areas"
Cametá	"Prohibited equipment and use of poison (ant barrage)"
Cametá	"The dam dried up the river and the fish disappeared"
Cametá	"Lots of people fishing in the same place"

all local communities visited. Furthermore, a reduction in the stocks of other fish species was observed. According to them, the most plausible justification for the situation was the construction of the Tucuruí Hydroelectric Plant in the region.

Hydroelectric plants can affect the ichthyofauna of a watercourse, resulting in changes in diet (Agostinho et al. 2008), size reduction (Santos et al. 2018), occurrence of new species (Orsi & Britton 2014), and decreased fishing yield (Carvalho et al. 2021). *A. gigas* is particularly susceptible to environmental changes due to its reproductive behavior, which is characterized by specific requirements and is directly stimulated by variations in water levels (Núñez et al. 2011).

Arapaima gigas is a socially monogamous species that builds nests in shallow, slow-flowing waters, and spawns partially annually or every 2 years (Galvão et al. 2012, Marková et al. 2020). Individuals of this species reach sexual maturity at 5 years of age, when they reach a size and weight of >160 cm and >40 kg, respectively (Imbiriba 2001). Although this species is considered sedentary, researchers have reported that *A. gigas* migrates laterally between rivers and floodplain habitats during periods of high-water levels and flooding to spawn, moving to increasingly higher habitats in flooded forests and returning as water levels decrease (Monteiro et al. 2010, Castello 2008). Fish such as *A. gigas*, which depend on varying water levels for reproduction, are more vulnerable to the environmental effects of hydroelectric dams (Arantes et al. 2019).

After damming, fish stocks will respond differently to habitat modifications depending on the biology and functional characteristics of the species (Arantes et al. 2019). Population changes and their magnitudes can be predicted in investigations that focus on the specific

characteristics of a target species (Balzannikov & Vyshkin 2011). Ethnoichthyological knowledge and the environmental perceptions of fishermen provide critical information to government institutions for defining the best public policy strategies to mitigate anthropogenic effects on *A. gigas* populations in the region. Recommendations for solutions require arguments based on local environmental perceptions and scientific investigations (Mesquita et al. 2022).

Amazon conservation lessons

A misconception of the Amazon region stemming from its history of Portuguese colonization is that it has an overabundance of natural resources, characterized as inexhaustible regardless of human demand (Goulding et al. 2000). This has led to substantial exploitation of the native fauna and severe population declines of several fish species, such as *A. gigas* (He et al. 2017).

In regions where *A. gigas* has been extirpated, three characteristics have hampered sustainable fishing of the species: the absence of data to identify population decline, overfishing or illegal fishing due to inefficient enforcement of fishing regulations, and geographic heterogeneity that compounds inter-community differences in fishing practices and ecological conditions (Castello et al. 2015). These characteristics are prevalent in tropical countries and lead to unnoticed fishing-induced extinctions (Pauly et al. 1989). The data obtained from the environmental perceptions of fishermen indicate a state of concern regarding the population decline of *A. gigas* in the lower Tocantins River, as the three characteristics of susceptibility to extinction of the species are strongly highlighted by fishermen, among which the lack of data is related to limited inspection and monitoring.

In 1996, the same year that *A. gigas* fishing was banned in the Amazon River (IBAMA 1996), the Mamirauá Ecological Station (MES) was declared a reserve for sustainable development, with the local community aiding in biodiversity conservation through the use of natural resources (Castello et al. 2011). The MES conducts participatory management based on catch quotas per fisherman, salted fillet processing, planned sales, and stock control using a counting method based on the number of times the animal surfaces to breathe (Rosa et al. 2020). In 8 years, the *A. gigas* population increased from 2,200 to 20,650 individuals and collection quotas increased from 120 to 1,249 individuals, resulting in greater monetary returns for fishermen and a growing interest in the activity (Castello et al. 2009). In protected areas with community management, the average annual income from *A. gigas* fishing can reach US\$10,601 per community and US\$1,046.6 per household, as analyzed in the Juruá River of the Western

Brazilian Amazon, in which efficient fisheries management improved the socioeconomic well-being of the local population (Campos-Silva & Peres 2016).

The studied area has a high potential for fishing, as it comprises a large number of communities whose main activity is fishing (Hallwass et al. 2011). However, the low economic returns and lack of young people interested in fishing present major obstacles to economic development and the maintenance of traditional practices in the region based on *A. gigas* fishing (Galvão et al. 2012). In the middle Tocantins River, a region close to the study area, damming caused considerable damage to the working conditions of local fishermen, leading many fishermen to abandon their profession (Santos & Pelicice 2023). Consequently, protected areas with community management (Figure 2), such as the Mamirauá Sustainable Development Reserve, can not only aid in the recovery of *A. gigas* fishing stocks but also prevent rural

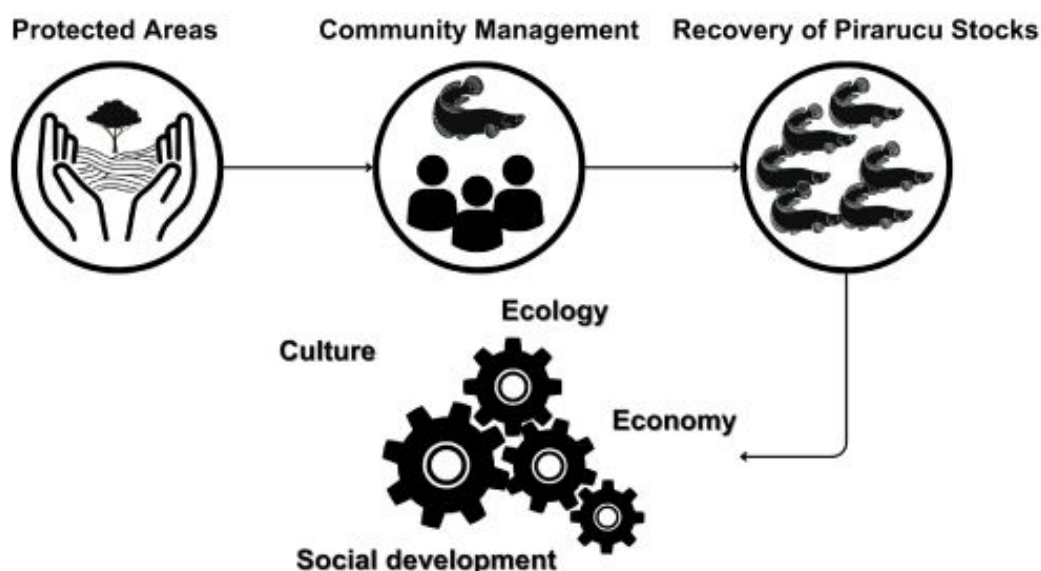


Figure 2. Flowchart of economic, social, and environmental sustainability based on *Arapaima gigas* conservation in native areas.

exodus and the gradual reduction of artisanal fishing in the State of Pará (Fuzetti & Corrêa 2018).

Arapaima and flow of ecosystem services

Ecosystem services (ES) *sensu stricto* are the benefits that people obtain from ecosystems and are coproduced by their interaction with society, and are essential for human survival (Balvanera et al. 2017). ES are divided into four categories: supply services (products obtained for food, subsistence, and commerce), regulation services (services that balance the natural conditions of the environment), cultural services (non-material benefits), and support services (basis for the performance of other services) (Lamarque et al. 2011). The flow of ecosystem services (ESF) represents the quantity of a service used or delivered through transmission channels, regardless of the origin of the service (Bagstad et al. 2020). The ESF is derived from the spatial relationship between the supply and demand of an ES concentrated in its flow from a supply area to a benefiting area (Bagstad et al. 2014). Financing is crucial for the success of species conservation; therefore, the benefits of ES, monitoring population development, and capturing individuals are essential (Plantinga et al. 2023).

Fishing plays an important role in providing goods and services from an ecosystem such as nutrient cycling, biological regulation, social relationships, knowledge systems, and cultural identity (Bladon et al. 2016, Gelcich et al. 2019). In addition to fishing for personal consumption, the Amazonian *A. gigas* fishing chain is directly related to cultural and recreational ecosystem services, offering a tourist opportunity to savor regional dishes prepared with exquisite fish meat and learn about Amazonian mythology surrounding the emergence of *A. gigas*, which describes it as an indigenous warrior who

became a fish (Carvalho et al. 2018). This study may contribute to the exploration of ESs involving *A. gigas* as a basis for multifunctional livelihoods in northern Brazil and other areas of *A. gigas* occurrence in the world.

CONCLUSIONS

A. gigas stocks have declined drastically in the lower Tocantins River after the construction of the Tucuruí Hydroelectric Plant, which fishermen pointed out as the main factor for the decline in the species' population. The lack of adequate fishing management in northern Brazil directly affects the economic well-being of communities that are dependent on fishing, which could lead to the disappearance of traditional artisanal fishing in the area and consequent rural exodus. The urgency of solutions based on environmental protection and community management may return to the population recovery of *A. gigas* and social development in the State of Pará.

Acknowledgments

To the fishermen of the lower Tocantins River for their reception and willingness to answer the questionnaires. To the Integrated Postgraduate Program in Animal Science in the Tropics from Universidade Federal Rural da Amazônia for the financial support for the translation of the scientific article.

REFERENCES

- AGOSTINHO AA, PELICICE FM & GOMES LC. 2008. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Braz J Biol* 68: 1119-1132.
- ALVES RRN & ROSA IL. 2007. Zotherapy goes to town: The use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. *J Ethnopharmacol* 113: 541-555.
- ARANTES CC, FITZGERALD DB, HOEINGHAUS DJ & WINEMILLER KO. 2019. Impacts of hydroelectric dams on fishes and fisheries in tropical rivers through the lens of functional traits. *Curr Opin Environ Sustain* 37: 28-40.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2021. Estimativas de população. Rio de Janeiro: IBGE, 119 p.

IDESP - INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO, SOCIAL E AMBIENTAL DO PARÁ. 2014. Estatística municipal -baixo Tocantins, 9-10 p.

IMBIRIBA EP. 2001. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazon* 31: 299-316.

LAMARQUE P, QUÉTIER F & LAVOREL S. 2011. The diversity of the ecosystem services concept and its implications for their assessment and management. *C R Biol* 334: 441-449.

MARKOVÁ J, JERIKHO R, WARDIATNO Y, KAMAL MM, MAGALHÃES ALB, BOHATÁ L, KALOUS L & PATOKA J. 2020. Conservation paradox of giant arapaima *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Pisces: Arapaimidae): endangered in its native range in Brazil and invasive in Indonesia. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 421: 1-10.

MESQUITA RCT, OLIVEIRA TE, BARCELLOS JOI, UCZAY M, MORALES US, RODRIGUES RB, BARCELLOS LJG & STREIT JDP. 2022. The Brazilian *A. gigas* supply chain: situation, perspectives, and challenges. *Res Soc Dev* 11: e59911831303.

MIRANDA-CHUMACERO G, WALLACE R, CALDERÓN H, CALDERÓN G, WILLINK P, GUERRERO M, SILES TM, LARA K & CHUQUI D. 2012. Distribution of arapaima (*Arapaima gigas*) (Pisces: Arapaimidae) in Bolivia: Implications in the control and management of a non-native population. *Biol Invasions Rec* 1: 129-138.

MMA. 2018. Livro vermelho da fauna Brasileira ameaçada de extinção, 1ª ed., Brasília: ICMBio, 249 p.

MONTEIRO LBB, SOARES MCF, CATANHO MTJ & HONCZARYK A. 2010. Aspectos reprodutivos e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), em condições de cativeiro. *Acta Amaz* 40: 435-449.

NÚÑEZ J, CHU-KOO F, BERLAND M, ARÉVALO L, RIBEYRO O, DUPONCHELLE F & RENNO JF. 2011. Reproductive success and fry production of the paiche or *A. gigas*, *Arapaima gigas* (Schinz), in the region of Iquitos, Perú. *Aquac Res* 42: 815-822.

OLIVEIRA-FILHO AT & RATTERF JA. 1995. A Study of the Origin of Central Brazilian Forests by the Analysis of Plant Species Distribution Patterns. *Edinb J Bot* 52: 141-194.

ORSI ML & BRITTON JR. 2014. Long-term changes in the fish assemblage of a neotropical hydroelectric reservoir. *J Fish Biol* 84: 1964-70.

PAULY D, SILVESTRE G & SMIT IR. 1989. On Development, Fisheries and Dynamite: a Brief Review of Tropical Fisheries Management. *Nat Resour Model* 3: 307-329.

PLANTINGA AJ, MILLAGE K, O'REILLY E, BIERI T, HOLMES N, WILSON J & BRADLEY D. 2023. How to pay for ecosystem services. *Front Ecol Environ*. <https://doi.org/10.1002/fee.2680>.

PRESTES-CARNEIRO G, BÉAREZ P, BAILON S, RAPP PY-DANIEL A & NEVES EG. 2016. Subsistence fishery at Hatahara (750-1230 CE), a pre-Columbian central Amazonian village. *J Archaeol Sci Rep* 8: 454-462.

IBAMA. 1996. Portaria nº 08, 2 de Fevereiro de 1996. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/mpa/legislacao/A.gigas/portaria-ibama-no-8-de-02-021996.pdf/view>.

ROSA KR, NORNBERG JL, SILVA LKS & KUBOTA EH. 2020. Pirarucu: from its origins to commercial breeding. *Braz J Dev* 6: 6586-6598.

SANTOS GMD, JURAS AA, MÉRONA BD & JÉGUE M. 2004. Peixes do baixo rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí, 1ª ed., Pará: Eletronorte, 2016 p.

SANTOS MAA & PELICICE FM. 2023. The effects of river impoundment on artisanal fishers in the Middle Tocantins River, Brazil. *Acta Limnol Bras* 35: e15.

SANTOS RE, PINTO-COELHO RM, FONSECA R, SIMÕES NR & ZANCHI FB. 2018. The decline of fisheries on the Madeira River, Brazil: The high cost of the hydroelectric dams in the Amazon Basin. *Fish Manage Ecol* 25: 380-391.

VINUTO J. 2014. A amostragem em bola de neve na pesquisa qualitativa: um debate em aberto. *Temáticas* 22: 203-220.

WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE. 1996. *Arapaima gigas*. In IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2.

How to cite

MACEDO DB, VIANA JS, COELHO HJP, COSTA CVC, COSTA DGB, SANTOS AD, CORREA RMS, RAMOS RTJ & RODRIGUES MDN. 2024. *Arapaima gigas* stocks have declined drastically in the lower Tocantins River in the Amazon Microregion. *An Acad Bras Cienc* 96: e20231343. DOI 10.1590/0001-3765202420231343.

Manuscript received on December 18, 2023;
accepted for publication on April 7, 2024

DARALYNS B. MACEDO^{1,3}

<https://orcid.org/0000-0002-0186-8149>

DARALYNS B. MACEDO et al.

Arapaima gigas STOCKS DECLINED IN THE TOCANTINS R.

JEANDERSON S. VIANA²

<https://orcid.org/0000-0001-8880-1053>

HENDRYA JULIANNY P. COELHO¹

<https://orcid.org/0000-0001-6793-6792>

CAIO VITOR C. COSTA¹

<https://orcid.org/0000-0003-3572-4759>

DÁRCIA GABRIELA B. DA COSTA¹

<https://orcid.org/0000-0001-9964-5041>

ÁDRIA D. DOS SANTOS¹

<https://orcid.org/0009-0003-1194-8809>

REGIANNE M.S. CORREA¹

<https://orcid.org/0000-0002-9837-4304>

ROMMEL THIAGO J. RAMOS³

<https://orcid.org/0000-0002-8032-1474>

MARÍLIA DANYELLE N. RODRIGUES¹

<https://orcid.org/0000-0003-0008-0912>

¹Federal Rural University of the Amazon, Applied Genetics Laboratory, Socio-environmental and Water Resources Institute, 2501 Tancredo Neves Avenue, Terra Firme, 66077-830 Belém, PA, Brazil

²Federal Rural University of the Amazon, Tropical Aquaculture Laboratory, Socio-environmental and Water Resources Institute, 2501 Tancredo Neves Avenue, Terra Firme, 66077-830 Belém, PA, Brazil

³Federal University of Pará, Institute of Biological Sciences, Augusto Corrêa Street, nº 01, Guamá, 66075-110 Belém, PA, Brazil

Correspondence to: **Marília Danyelle Nunes Rodrigues**

E-mail: nunes.mdnunes@gmail.com

Author contributions

Daralyns Borges Macedo: original draft writing, review, and editing. *Hendrya Julianny Pereira Coelho*: analysis and interpretation of data. *Caio Vitor Conceição Costa*: analysis and interpretation of data. *Dárcia Gabriela Borcem da Costa*: analysis and interpretation of data. *Ádria Diva dos Santos*: analysis and interpretation of data. *Regianne Maciel dos Santos Correa*: analysis and interpretation of data. *Rommel Thiago Jucá Ramos*: a critical review for important intellectual content. *Marília Danyelle Nunes Rodrigues*: acquisition of data, critical review for important intellectual content, review and editing.



CONCLUSÃO

Este estudo sequenciou, anotou e caracterizou o genoma mitocondrial completo de *Cyprindon* sp., que tem 16.500 pb de comprimento. As características mitocondriais, incluindo conteúdo gênico e composição de nucleotídeos, são consistentes com aquelas observadas em outras espécies da família Cyprinodontidae. Este estudo é o primeiro a descrever o genoma mitocondrial completo de *Cyprindon* sp., fornecendo uma base para futuras pesquisas sobre taxonomia molecular, diversidade genética e estrutura populacional desta espécie. As descobertas contribuem para aplicações no monitoramento, conservação e manejo de estoques pesqueiros desta espécie. No entanto, estudos adicionais são necessários para alcançar resolução e esclarecimento filogenéticos da espécie dentro do gênero *Cyprinodon*. Os estoques de *A. gigas* reduziram drasticamente do Baixo Rio Tocantins após a construção da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, que pescadores apontaram como principal fator para o declínio populacional da espécie. A ausência de gestão pesqueira adequada no Norte do Brasil, impacta diretamente no bem-estar econômico das comunidades dependentes da pesca, podendo levar ao desaparecimento da tradicional pesca artesanal no local e consequente êxodo rural. A urgência de soluções baseadas em proteção ambiental e manejo comunitário podem retornar com a recuperação populacional de *A. gigas* e o desenvolvimento social no Estado do Pará. Dessa forma, ferramentas moleculares, como marcadores mitocondriais, se fazem necessárias para o monitoramento adequado de espécies em declínio na natureza. Possibilitando, assim, a exploração comercial equilibrada e sua efetiva conservação.

REFERÊNCIAS

ADEWALE, B.A. Will long-read sequencing technologies replace short-read sequencing technologies in the next 10 years? **African Journal of Laboratory Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1340, 2020.

AGUIRRE, W.E., ALVAREZ-MIELES, G., ANAGUANO-YANCHA, F., BURGOS, M.R., CUCALÓN, R.V., ESCOBAR-CAMACHO, D., JÁCOME-NEGRETE, I., JIMÉNEZ, P.P., LAAZ, E., MIRANDA-TROYA, K., NAVARRETE-AMAYA, R., NUGRA, S.F., REVELO, W., RIVADENEIRA, J.F., VALDIVIEZO, R.J, ZÁRATE, H.E. Conservation threats and future prospects for the freshwater fishes of Ecuador: A hotspot of Neotropical fish diversity. **Journal of Fish Biology**, v. 99, n. 4, p.1158–1189, 2021.

ALHAKAMI, H., MIREBRAHIM, H., LONARDI, S. A comparative evaluation of genome assembly reconciliation tools. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 93, 2017.

ALI, F.S., ISMAIL, M., ALY, W. DNA barcoding to characterize biodiversity of freshwater fishes of Egypt. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 8, p.5865–5877, 2020.

ALVARENGA M, D'ELIA AKP, ROCHA G, ARANTES CA, HENNING F, DE VASCONCELOS ATR, SOLÉ-CAVA AM. Mitochondrial genome structure and composition in 70 fishes: a key resource for fisheries management in the South Atlantic. **BMC Genomics**, v. 25, n. 1, p. 215, 2024.

ANDERMANN, T. , FAURBY, S., TURVEY, S.T., ANTONELLI, A., SILVESTRO, D. The past and future human impact on mammalian diversity. **Science Advances**, v. 6, p. eabb2313, 2020.

ANSORGE, W., SPROAT, B.S., STEGEMANN, J., SCHWAGER, C. A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. **Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 13, p. 315–323, 1986.

ANTONELLI, A. The rise and fall of Neotropical biodiversity. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 199, n. 1, p. 8–24, 2022.

BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. **Viruses**, v. 6, p. 106–136, 2013.

BOORE, J.L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, 15;27(8):1767-80, 1999

BRASLAVSKY, I., HEBERT, B., KARTALOV, E., QUAKE, S.R. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 3960–3964, 2003.

BURG, G. C., JOHNSON, J., SPATARO, S., O'KEEFE, A., URBINA, N., PUENTEDURA, G., VAN BREUKELLEN, F. Care and propagation of captive pupfish from the genus *Cyprinodon*: insight into conservation. **Environmental Biology of Fishes**, v. 102, p. 1015–1024, 2019.

BLACK, A. N., SNEKSER, J. L., AL-SHAER, L., PACIOREK, T., BLOCH, A., LITTLE, K., ITZKOWITZ, M. A review of the Leon springs pupfish (*Cyprinodon bovinus*) long-term conservation strategy and response to habitat restoration. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, 26, 410–416, 2016.

BLACK, A., SNEKSER, J.L., ITZKOWITZ, M. Preservation of behavior after fifteen years of isolation: comparisons of wild and captive endangered pupfish in their natural habitat. **Environmental Biology of Fishes**, v. 100, p. 1517–1525, 2017.

BLACK A.N., WILLOUGHBY, J.R., BRÜNICHE-OLSEN, A., PIERCE, B.L., DEWOODY, J.A. The endangered White Sands pupfish (*Cyprinodon tularosa*) genome reveals low diversity and heterogenous patterns of differentiation. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n. 7, p. 2520–2532, 2021.

COMPEAU, P.E., PEVZNER, P.A., TESLER, G. How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 987–91, 2011.

DOWLING, D.K., WOLFF, J.N. Evolutionary genetics of the mitochondrial genome: insights from *Drosophila*. **Genetics**. v. 224, n. 3, p. iyad036, 2023.

ECHELLE, A.A., CARSON, E.W., ECHELLE, A.F., VAN DEN BUSSCHE, R.A., DOWLING, T.E., MEYER, A. Historical Biogeography of the New-World Pupfish Genus *Cyprinodon* (Teleostei: Cyprinodontidae). **Copeia**, n. 2, 320-339, 2005.

EID, J. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. **Science**, v. 323, p.133–138, 2009.

EISENSTEIN, M. Oxford nanopore announcement sets sequencing sector abuzz. **Nature Biotechnology**, v. 30, p.295–296, 2012.

FILIP, E., STRZAŁA, T., STĘPIEŃ, E., CEMBROWSKA-LECH, D. Universal mtDNA fragment for Cervidae barcoding species identification using phylogeny and preliminary analysis of machine learning approach. **Scientific report**, v. 13, p. 9133, 2023.

FINCH, B.E., STUBBLEFIELD, W.A. Photo-enhanced toxicity of fluoranthene to Gulf of Mexico marine organisms at different larval ages and ultraviolet light intensities. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 35, n. 5, 1113–22, 2016.

GOLDBERG, C. S., TURNER, C. R., DEINER, K., KLYMUS, K. E., THOMSEN, P. F., MURPHY, M. A., TABERLET, P. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. **Methods in ecology and evolution**, v. 7, p. 11, 1299–1307, 2016.

GUALBERTO, J.M., NEWTON, K.J. Plant Mitochondrial Genomes: Dynamics and Mechanisms of Mutation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, p. 225–252, 2017.

HAQUE, F., LI, J., WU, H.C., LIANG, X.J., GUO, P. Solid-state and biological nanopore for real-time sensing of single chemical and sequencing of DNA. **Nano Today**, v.8, p.56–74, 2013.

HYMAN, E.D. A new method for sequencing DNA. **Analytical Biochemistry**, v. 174, p.423–436, 1988.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2023-1, 2024.
<<https://www.iucnredlist.org>> Acessado em 21 de abril de 2024.

IWASAKI, W., FUKUNAGA, T., ISAGOZAWA, R., YAMADA, K., MAEDA, Y., SATOH, T.P., SADO, T., MABUCHI, K., TAKESHIMA, H., MIYA, M., NISHIDA, M. MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. **Molecular Biology Evolution**, v. 30, n. 1, p.2531–40, 2013.

KRZYWINSKI, M., SCHEIN, J., BIROL, I., CONNORS, J., GASCOYNE, R., HORSMAN, D., JONES, S.J., MARRA, M.A. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1639–45, 2009.

KUANG, W.M., YU, L. [Mitogenome assembly strategies and software applications in the genome era]. **Yi Chuan**, v. 41, n. 11, p. 979–993, 2019.

LADOUKAKIS, E.D., ZOUROS, E. Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: rules and exceptions. **Journal of Biological Research - Thessaloniki**, v. 24, n. 2, 2017.

LAVROV, D.V., PETT, W. Animal mitochondrial DNA as we do not know it: mt-genome organization and evolution in nonbilaterian lineages. **Genome Biology Evolution**, v. 8, p. 2896–2913, 2016.

LI, D., LIU, C.M., LUO, R., SADAKANE, K., LAM, T.W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**. v. 31, n. 10, p. 1674–6, 2015.

LIAO, X., LI, M., ZOU, Y., WU, F. X., WANG, J. Current challenges and solutions of *de novo* assembly. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 90–109, 2019.

MCKERNAN, K.J. Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. **Genome Research**, v. 19, p.1527–1541, 2009.

MAGNUSON, J.T., KHURSIGARA, A.J., ALLMON, E.B., ESBAUGH, A.J., ROBERTS, A.P. Effects of Deepwater Horizon crude oil on ocular development in two estuarine fish species, red drum (*Sciaenops ocellatus*) and sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 186–191, 2018.

MARGULIES, M., EGHOLM, M., ALTMAN, W., ATTIYA, S. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, p.376–380, 2005.

MARTIN, C. H., WAINWRIGHT, P. C. A remarkable species flock of *Cyprinodon* pupfishes endemic to San Salvador Island, Bahamas. **Bulletin of the Peabody Museum of Natural History**, v. 54, p. 231–241, 2013a.

MARTIN, C. H., WAINWRIGHT, P. C. On the measurement of ecological novelty: scale-eating pupfish are separated by 168 my from other scale-eating fishes. **PLoS ONE**, v. 8 p. e71164, 2013b.

MAXAM, A.M., GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p.560–564, 1977.

MELSTED, P., HALLDÓRSSON, B.V. KmerStream: streaming algorithms for k-mer abundance estimation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 24, p. 3541–7, 2014.

MENG, G., LI, Y., YANG, C., LIU, S. MitoZ: a toolkit for animal mitochondrial genome assembly, annotation and visualization. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 11, p. e63, 2019.

MOREY, M., FERNÁNDEZ-MARMIESSE, A., CASTIÑEIRAS, D., FRAGA, J.M., COUCE, M.L., COCHO, J.A. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 110, n. 1–2, p. 3–24, 2013.

MUNASINGHE, M., ÅGREN, J. A. When and why are mitochondria paternally inherited? **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 80, 2023.

NYRÉN, P.L., LUNDIN A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. **Analytical Biochemistry**, v. 509, p.504–509, 1985.

PELICICE, F.M., AZEVEDO-SANTOS, V. M., VITULE, J. R., ORSI, M. L., LIMA JUNIOR, D. P., MAGALHÃES, A. L., POMPEU, P.S., PETRERE, M. J., AGOSTINHO, A.A. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. **Fish and fisheries**, v. 18, n. 6, 1119–1133, 2017.

PELICICE, F.M., BIALETZKI, A., CAMELIER, P., CARVALHO, F.R., GARCÍA-BERTHO, E., POMPEU, P.S., TEIXEIRA, M.F.T., PAVANELLI, C.S. Human impacts and the loss of Neotropical freshwater fish diversity. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 3, p. e210134, 2021.

RAMBAUT, A. FigTree version 1.3.1, 2009. <<http://tree.bio.ed.ac.uk>> Acessado em 25 de abril de 2024.

ROCCARO M, BINI C, FAIS P, MERIALDI G, PELOTTI S, PELI A. Who killed my dog? Use of forensic genetics to investigate an enigmatic case. *International Journal of Legal Medicine*. v. 135, n. 2, 387–392, 2021.

RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, 1572–4, 2003.

SANTANA, P., MARTINS, T., LUTZ, Í., MIRANDA, J., DA SILVA, R., MESQUITA, D., MARTINS, R., VENEZA, I., VALLINOTO, M., SAMPAIO, I., EVANGELISTA-GOMES, G. DNA barcode reveals occurrence of threatened species and hidden diversity on Teleost fish trade in the Coastal Amazon. **Science Reports**, v. 13, n. 1, p. 19749, 2023.

SATAM, H., JOSHI, K., MANGROLIA, U., WAGHOO, S., ZAIDI, G., RAWOOL, S., THAKARE, R.P., BANDAY, S., MISHRA, A.K., DAS, G., MALONIAM, S.K. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. **Biology**, v. 12, n. 7, p. 997, 2023.

SATOH, T.P., MIYA, M., MABUCHI, K., NISHIDA, M. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 719, 2016.

SANGER F. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**. v. 265, p. 687–695, 1977.

SANGER, F., BROWNLEE, G., BARRELL, B. A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p.373–IN4, 1965.

SANGER F., COULSON A. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, p. 441–448, 1975.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.

SAYERS, E.W., BOLTON, E.E., BRISTER, J.R., CANESE, K., CHAN, J., COMEAU, D.C., FARRELL, C.M., FELDGARDEN, M., FINE, A.M., FUNK K. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 51, 29–38, 2023.

SCHULZ, C., SCHENDZIELORZ, A., REHLING, P. Unlocking the presequence import pathway. **Trends in Cell Biology**, v. 25, p. 265–275, 2015.

SCHROETER, J. C., MALOY, A. P., REES, C. B., BARTRON, M. L. Fish mitochondrial genome sequencing: expanding genetic resources to support species detection and biodiversity monitoring using environmental DNA. **Conservation Genetics Resources**, v. 12, n. 3, 433–446, 2020.

SHARBROUGH, J., BANKERS, L., COOK, E., FIELDS, P.D., JALINSKY, J., MCELROY, K., E., NEIMAN, M., LOGSDON, J., M., BOORE, J.L. Single-molecule Sequencing of an Animal Mitochondrial Genome Reveals Chloroplast-like Architecture and Repeat-mediated Recombination. **Molecular Biology and Evolution**, v. 40, n. 1, p. msad007, 2023.

SLOAN, D.B., WARREN, J.M., WILLIAMS, A.M., WU, Z., ABDEL-GHANY, S.E., CHICCO, A.J., HAVIRD, J.C. Cytonuclear integration and co-evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 10, p. 635–648, 2015.

SOHN, J., JIN-WU NAM, J.W. The present and future of de novo whole-genome assembly. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 23–40, 2018.

ŠTORCHOVÁ, H., KRÜGER, M. Methods for assembling complex mitochondrial genomes in land plants. **Journal of Experimental Botany**, p. erae034, 2024.

SWERDLOW, H., GESTELAND, R. Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 1415–1419, 1990.

TAMURA, K., STECHER, G., KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.

THEISSINGER K, FERNANDES C, FORMENTI G, BISTA I, BERG PR, BLEIDORN C, BOMBARELY A, CROTTINI A, GALLO GR, GODOY JA, JENTOFT S, MALUKIEWICZ J, MOUTON A, OOMEN RA, PAEZ S, PALSBOELL PJ, PAMPOULIE C, RUIZ-LÓPEZ MJ, SECOMANDI S, SVARDAL H, THEOFANOPOULOU C, DE VRIES J, WALDVOGEL AM, ZHANG G, JARVIS ED, BÁLINT M, CIOFI C, WATERHOUSE RM, MAZZONI CJ, HÖGLUND J; EUROPEAN REFERENCE GENOME ATLAS CONSORTIUM. How genomics can help biodiversity conservation. **Trends in Genetics**, v. 39, n. 7, p. 545–559, 2023.

VEENSTRA, T.D. Omics in Systems Biology: Current Progress and Future Outlook. **Proteomics**, v. 21, n. 3, p. e2000235, 2021.

TONELLA, L.H., RUARO, R., DAGA, V.S., GARCIA, D.A.Z., VITORINO, O.B.J., LOBATO, M. T., DOS REIS, R.E., DI DARIO, F., PETRY, A.C., MINCARONE, M.M., DE ASSIS MONTAG, L.F., POMPEU, P.S., TEIXEIRA, A.A.M. NEOTROPICAL FRESHWATER FISHES: A dataset of occurrence and abundance of freshwater fishes in the Neotropics. **Ecology**. v. 104, n. 4, p. e3713, 2023.

TUCKER, T., MARRA, M., FRIEDMAN, J.M. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. **American Journal of Human Genetics**, v. 85, p. 142, 2009.

VAN DIJK, E.L., AUGER, H., JASZCZYSZYN, Y., THERMES, C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trend in Genetics**, v. 30, n. 9, p. 418–26, 2014.

VOELKERDING, K.V., DAMES, S.A., DURTSCHI, J.D. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. **Clinical Chemistry**, v. 55, p.641–658, 2009.

WARD, R.D., HANNER, R., HEBERT, P.D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 2, p. 329–56, 2009.

WATSON, J.D., CRICK, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, p.737–738, 1953.