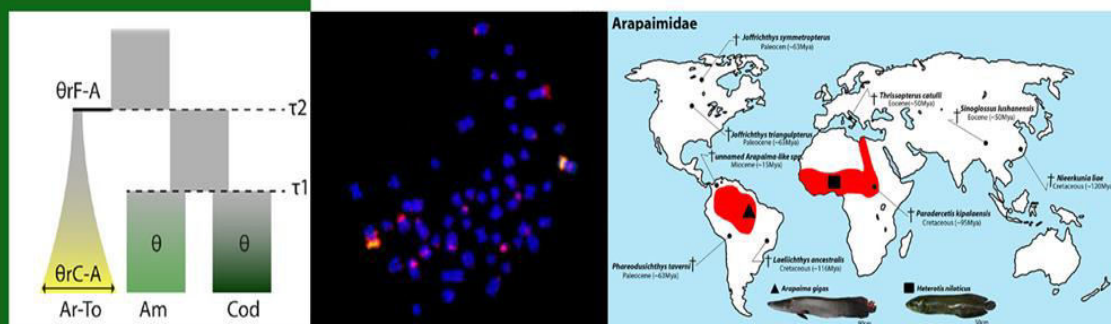


# Tese de Doutorado

## Evolução cromossômica e diversidade genética em espécies de peixes da família Arapaimidae (Teleostei: Osteoglossiformes)



Evolução cromossômica e diversidade genética em espécies de peixes da família Arapaimidae (Teleostei: Osteoglossiformes)

Ezequiel Aguiar de Oliveira

**Ezequiel Aguiar de Oliveira**  
*São Carlos, 2019*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**Ezequiel Aguiar de Oliveira**

**“Evolução cromossômica e diversidade genética em espécies de peixes da família  
Arapaimidae (Teleostei: Osteoglossiformes)”**

**Tese de doutorado**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi**

**SÃO CARLOS – SP, 2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**Ezequiel Aguiar de Oliveira**

**“Evolução cromossômica e diversidade genética em espécies de peixes da família  
Arapaimidae (Teleostei: Osteoglossiformes)”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas). Área de Concentração: Genética e Evolução

**Orientador: Prof. Dr Marcelo de Bello Cioffi**

**SÃO CARLOS – SP, 2019**

De Oliveira, Ezequiel Aguiar

Evolução cromossômica e diversidade genética em espécies de peixes da família Arapaimidae (Teleostei: Osteoglossiformes) / Ezequiel Aguiar De Oliveira. -- 2019.

192 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Marcelo de Bello Cioffi

Banca examinadora: Marcelo de Bello Cioffi, Orlando Moreira Filho, Roberto Ferreira Artoni, Diogo Teruo Hashimoto, Eliana Feldberg

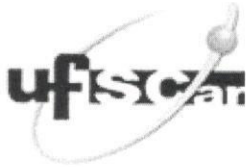
Bibliografia

1. SNPs, peixes. 2. Cromossomos, DNAs repetitivos, citogenética molecular. 3. Gondwana. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

## Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Ezequiel Aguiar de Oliveira, realizada em 12/07/2019:

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi  
UFSCar

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho  
UFSCar

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni  
UEPG

Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto  
UNESP

Profa. Dra. Eliana Feldberg  
INPA

## Identificação Bibliográfica

Nome e sobrenome: **Ezequiel Aguiar de Oliveira**

Título da Tese: **“Evolução cromossômica e diversidade genética em espécies de peixes da família Arapaimidae (Teleostei: Osteoglossiformes)”**

Título da tese em inglês: **“Chromosomal evolution and genetic diversity in fish species of Arapaimidae family (Teleostei: Osteoglossiformes)”**

Programa de estudo: **Genética Evolutiva e Biologia Molecular**

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi**

Ano de início: **2015**

Ano da defesa: **2019**

**Palavras-chave:** Cromossomos, SNPs, peixes, Gondwana, DNAs repetitivos, citogenética molecular.

**Keywords:** Chromosomes, SNPs, fishes, Gondwana, Repetitive DNAs, molecular cytogenetics.





*Todas as minhas conquistas e em especial esta, dedico à memória de minha mãe Amélia Luiz de Aguiar, mulher de valor inestimável que durante toda a sua vida incentivou e contribuiu imensuravelmente com minha educação.*



**“Alguns desejos parecem sonhos inalcançáveis, quando levamos em consideração as intempéries da vida, mas depois de conquistados, percebe-se que nada mais são, do que frutos de muito esforço e dedicação.”**

## **Agradecimentos**

Agradeço a todas as pessoas e instituições que diretamente ou indiretamente contribuíram com a produção deste trabalho. Particularmente gostaria de agradecer:

Primeiramente a Deus força espiritual que me auxilia nos momentos de angústias e dificuldades.

A toda a minha família, em particular à minha esposa Aldeci Moura da Silva e meus filhos Alan Moura de Oliveira e Luana Moura de Oliveira que estiveram comigo incentivando e auxiliando-me nas horas difíceis deste caminhar.

À Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso (SEDUC-MT), pela licença para qualificação profissional concedida, proporcionando condições para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEV) pela infraestrutura disponibilizada para a realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, sem ele seria muito difícil a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, professor e pesquisador extremamente competente que tanto admiro, pois me recebeu com muita atenção e carinho em seu laboratório e proporcionou-me as melhores condições possíveis de conhecimento, aprendizagem e crescimento como pesquisador.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcello de Bello Cioffi, pesquisador muito competente, dinâmico e organizado que contribuiu muito com meu aprendizado e com a realização deste e de vários outros trabalhos realizados no laboratório, obrigado professor pelas cobranças que só me fizeram crescer.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, pelos ensinamentos, orientações, sugestões, apoio e acima de tudo pela amizade durante todos estes anos.

Aos amigos Pétr Ráb e Alexandr Sember (Sassa) da Academy of the Sciences of the Czech Republic, pelos ensinamentos, colaborações e apoio durante a visita à Praga.

A todos os funcionários e professores do DGE/UFSCar que diretamente ou indiretamente contribuíram com a construção deste trabalho.

Ao Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, juntamente com a cooperativa de pescadores do Setor Panta Leão, pelo suporte e auxílio nas coletas de exemplares de pirarucu (*Arapaima*).

Aos Srs. Roberto, Flavio, Carlinhos e Dr. Moacir, piscicultores criadores de pirarucu em São Félix do Araguaia e Alto Boa Vista - MT, pelos indivíduos de pirarucus doados para realização deste estudo.

À Dra. Patrícia Oliveira Maciel pesquisadora da Embrapa Pesca e Aquicultura em Palmas - TO, pelas informações sobre a morfologia e a localização do rim e do baço em *Arapaima*.

Aos amigos e técnicos do laboratório, Piau e Toninho, pelos momentos de descontração e pelo suporte aos trabalhos no laboratório e em campo.

Aos vários amigos que trabalham ou trabalharam comigo durante esses anos no Laboratório de Citogenética de Peixes da UFSCar, Felipe Faix Barby, Cássia Fernanda Yano, Natália Lourenço de Freitas, Francisco de Menezes Cavalcante Sassi, Manolo Fernandez Perez, Geize Aparecida Deon, Renata Luiza Rosa de Moraes, Gustavo Akira Toma, Rafael Barrichello Baggi, Larissa Glugoski, Juliana de Fatima Martinez, Geovana de Cassia Malimpensa, Fernando Henrique Santos de Souza e em especial à amiga, companheira e conselheira Terumi Hatanaka, que sempre mostrou-se muito amável comigo e com todos do laboratório.

Aos meus irmãos, irmãs, cunhados, cunhadas, sobrinhos e sobrinhas que me auxiliaram nas coletas e me incentivaram a realizar este curso, em especial a Jeremias Antônio de Oliveira (Jereba), Ananias Antônio de Oliveira (Nana), Zacarias Antônio de Oliveira (Zaca), Joel Antônio de Oliveira, Amelí Antônio de Oliveira, Alícia Antônio de Oliveira, Silvânia Antônio de Oliveira e Zisa Antônio de Oliveira, irmãos e amigos que sempre me incentivam e estiveram comigo auxiliando nas coletas e processamentos de exemplares de diferentes espécies de peixes na Fazenda Morro do Espia no estado de Goiás e em outros locais dos Estados de Tocantins, Pará e Mato Grosso.

Ao meu sogro e amigo Manoel Moura da Silva, que me apoiou na decisão de realizar este curso e contribuiu juntamente com meu tio Serafim Moura da Silva, diretamente na captura de exemplares de peixes no Estado de Mato Grosso.

Aos meus amigos Ramiro Fabiano Melo, Alex Pablo Schirimbeck, Leonor (Transão), Samuel Silva Chaves (Samuca), Elismar Rodrigues da Silva, Juracy da Silva (Neguito), José Magalhães (Maga), Josimar do correio, Iber (Gauchão), Luiz Carlos (Carote), Roni, Cleiton Almeida da Silva (Cleitim), Valdemar (Bebezão), Jorge Arruda

(Perigoso) e João Fernando Feitosa, dentre outros que incentivaram e de alguma maneira contribuíram com esta produção.

Agradeço também a várias outras pessoas que passaram pela minha vida e de certa forma também contribuíram com a realização deste trabalho, professores, colegas acadêmicos, amigos e familiares.

Muitíssimo obrigado a todos.

## RESUMO

A região Neotropical exhibe a maior diversidade de peixes de água doce do mundo e a história demográfica de vários táxons está relacionada com a história geomorfológica e climática desta região. Duas das principais bacias hidrográficas da região Neotropical, a Amazônica (Am) e a Tocantins-Araguaia (To-Ar) são ecologicamente diversas. Elas são ricas em linhagens de peixes endêmicos, como os Osteoglossiformes, uma das linhagens mais antigas de teleósteos, atualmente difundida em quase todos os continentes, com exceção da Antártida. Entre os Osteoglossiformes a família Arapaimidae é representada por apenas dois gêneros, com um representante Sul-Americano *Arapaima* e outro africano *Heterotis*, um importante grupo ictiológico que ainda apresenta escassez de dados genéticos. Portanto, as presentes investigações com o uso de ferramentas avançadas da genômica de populações, seleção de modelos demográficos por aprendizado de máquina, citogenética clássica, molecular e citogenômica, objetivaram desenvolver um entendimento amplo da diversidade cromossômica, molecular e filogeográfica destas espécies, com o intuito de esclarecer melhor os eventos evolutivos que moldaram a história demográfica deste grupo de peixes. Para tanto, foram examinados representantes sul-americanos e africanos de Arapaimidae, nomeadamente *Arapaima* (quatro populações naturais da bacia Am, três da bacia To-Ar e de três pisciculturas) e *Heterotis niloticus* (uma população do rio Oluwa na Nigéria). Nas abordagens comparativas intercontinentais e intraespecíficas, observou-se que as espécies diferiram significativamente por meio de números cromossômicos diploides, com  $2n = 56$  encontrado em *Arapaima* e  $2n = 40$  exibido por *H. niloticus*. Entretanto, estas espécies apresentaram algumas tendências gerais compartilhadas por outros osteoglossiformes analisados até o momento, como a presença de apenas um par de cromossomos portadores dos sítios de DNAr 18S e 5S e cariótipos dominados por cromossomos acrocêntricos-submetacêntrico, correspondendo assim aos padrões de cariótipo hipotético ancestral para os teleósteos. Além disso, seus genomas apresentam uma divergência notável em termos de conteúdo e distribuição de DNA repetitivos, como revelado por Hibridização Genômica Comparativa (CGH). Por outro lado, a diversidade genômica de sequências de cópia única (SNPs), estudadas através de análises de componentes principais (PCA), baseadas em alelos obtidos pelo procedimento DArTseq, demonstraram uma distância genética muito baixa entre estes gêneros. Estes dados forneceram uma visão clara da diversidade genética entre espécies africanas e sul-americanas de Arapaimidae e foram altamente consistentes com os dados cromossômicos, geográficos e históricos, auxiliando na compreensão de sua diversificação evolutiva. Já nas investigações do gênero *Arapaima* para a América do Sul, observamos um nível geral mais alto de diversidade genética nas populações do Am, quando comparado ao observado na bacia To-Ar. Adicionalmente, uma alta diferenciação genética entre as populações das diferentes bacias foi observada. Ao incluirmos amostras de piscicultura, também conseguimos evidenciar a ancestralidade mais provável dos reprodutores usados, levantando a discussão sobre o uso de reprodutores fora da distribuição de seu agrupamento genético. Não houve diferenciações cromossômicas significativas na estrutura cariotípica e nas composições de DNAs repetitivos mapeados entre as populações de *Arapaima* estudadas. Embora as principais vias para a colonização de *Arapaima* na América do Sul ainda não estejam claras, a seleção de modelo a partir de redes neurais convolucionais (CNN) aplicadas aos nossos dados empíricos indicam um cenário no qual a bacia do Am foi a primeira a ser colonizada, seguida da bacia To-Ar. Outros estudos devem se concentrar em uma reconstrução biogeográfica histórica mais ampla da ordem Osteoglossiformes, que pode potencialmente explicar sua relação com o rompimento do Gondwana e a presença deste táxon na América do Sul.

## ABSTRACT

The Neotropical region exhibits the largest diversity of freshwater fishes in the world and the demographic history of several taxa is related to the geomorphological and climatic history of this region. Two of the main hydrographic basins of the Neotropical region, the Amazon (Am) and the Tocantins-Araguaia (To-Ar) are ecologically diverse. They are rich in endemic fish species, such as the Osteoglossiformes, one of the most ancient ancestral lineages of teleosts, currently widespread on almost all continents, except Antarctica. Among the Osteoglossiformes, the Arapaimidae family is represented by only two genera, with a South American representative *Arapaima* and another African *Heterotis*, an important ichthyological group that still has lacked genetic and cytogenetic studies. Therefore, the present work with the use of advanced population genomics tools, selection of demographic models by machine learning, conventional and molecular cytogenetics analysis, aimed at developing a broad understanding of the chromosomal, molecular and phylogeographic diversity of these species. We aimed to better clarify the evolutionary events that shaped the demographic history of this fish group. For that, South American and African representatives of Arapaimidae, namely *Arapaima* (four natural populations of the Am basin, three of the To-Ar basin and three fish farms) and *Heterotis niloticus* (a population of the Oluwa River in Nigeria) were examined. The species differed significantly by means of diploid chromosome numbers, with  $2n = 56$  found in *Arapaima* and  $2n = 40$  exhibited by *H. niloticus*. However, these species presented some general tendencies shared by other Osteoglossiformes analyzed so far, regarding the presence of only one pair of chromosomes bearing 18S and 5S rDNA sites and karyotypes dominated by acrocentric-submetacentric chromosomes, thus corresponding to hypothetical karyotype patterns ancestral to teleosts. In addition, their genomes showed remarkable divergence in terms of repetitive DNA content and distribution as revealed by Comparative Genomic Hybridization (CGH). On the other hand, genomic diversity of single-copy sequences (SNPs), retrieved through principal component analysis (PCA), based on alleles obtained by the DArTseq procedure, demonstrated a very low genetic distance between these genera. These data provided a clear view of the genetic diversity between African and South American Arapaimidae species and were highly consistent with the chromosomal, geographic and historical data, helping to understand its evolutionary diversification. Concerning the investigations of the genus *Arapaima* in South America, we observed a higher general level of genetic diversity in the Am populations when compared to the one observed in the To-Ar basin. In addition, a high genetic differentiation between the populations of the different basins was observed. By including samples of fish farming, the most likely ancestry of the used breeding herds was revealed, raising concerns about the use of broodstocks outside the distribution of their genetic grouping. No significant chromosome differentiations in the karyotypic structure and repetitive DNA compositions among the studied *Arapaima* populations was observed. Although the main routes for *Arapaima* colonization in South America are still unclear, the model selection from convolutional neural networks (CNN) applied to our empirical data indicated a scenario in which the Am basin was the first to be colonized, followed by the To-Ar one. Other studies should focus on a wider historical biogeographic reconstruction of the order Osteoglossiformes, which may potentially explain its relationship with the Gondwana break-up and the presence of this taxon in South America.

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

- Figura 1.** Tempos geológicos com base em camadas cronoestratigráficas (Cohen et al. 2017)..... 23
- Figura 2.** Mapa paleogeográfico da separação do Gondwana com os respectivos tempos geológicos (círculos em vermelho) - (A) Neotriássico, (B) Eocretáceo-Valanginiano, (C) Eocretáceo-início do Aptiano, (D) Eocretáceo-final do Aptiano, (E) Neocretáceo-Turoniano e (F) Neocretáceo-Paleogeno, (FA – Bacia da Foz do Amazonas; M – Bacia de Marajó; B – Bacia de Barreirinhas; BV – Bacia de Bragança – Viseu; SL – Bacia de São Luís; IN – Bacia de Ilha Nova; PM – Bacia do Pará – Maranhão; ag – Arco de Gurupá; afus – Arco Ferrer – Urbano Santos; at – Arco do Tocantins, figura elaborada com base em SOARES JÚNIOR et al. (2011), tempos geológicos baseados na tabela de Cohen et al. (2017)..... 25
- Figura 3.** Divisão do relevo brasileiro em 28 unidades morfoestruturais classificadas no mapa como: planaltos (vermelho), formações produtos de erosão com altitude acima de 300m, conhecidos como morros, serras e chapadas, depressões (laranja), superfícies entre 100 e 500m de altitude, com inclinação suave, mais plana que o planalto, formadas também por processos de erosão e planícies (amarelo), áreas planas com altitude inferiores a 100m, formadas pelo acumulo recente de sedimentos que definem os cursos d’aguas e, conseqüentemente, os cursos de drenagem dos rios das bacias hidrográficas brasileiras. Contorno dentro do mapa das unidades morfoestruturais evidenciando áreas das bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia, mapa externo ressaltando cada uma dessas bacias. Figura adaptada de Ross (1990)..... 26
- Figura 4.** Mudanças na drenagem da bacia Tocantins-Araguaia a partir do Plio-Pleistoceno, A) Foz do paleo rio Tocantins desaguando no rio Amazonas; B) formação de barreira de sedimentos e desvio da foz do rio Tocantins e C) formação do rio Pará, a partir de um braço do rio Amazonas, erodindo sedimentos em falhas geológicas do Holoceno, com separação da Ilha do Marajó e nova conformação da drenagem da bacia Tocantins-Araguaia desaguando no rio Pará. Adaptado de Rossetti & Valeriano (2007)..... 29
- Figura 5.** Biogeografia histórica de *Osteoglossomorpha* baseada na análise de área ancestral. Estimativa da área ancestral usando filogenia bayesiana, calibrada através de combinações entre tempo, caracteres moleculares e morfológicos de táxons existentes e extintos. Letras de A à F representam as regiões (ver mapa figura A) usado para a reconstrução biogeográfica: A (amarelo) Afrotrópicos; B (verde) Neotrópicos; C (vermelho) Oriente; D (laranja) Austrália; E (azul) Neártico, F (rosa) Nordeste Paleártico (período Cretáceo). As distribuições geográficas dos táxons existentes e extintos são indicadas (figura B). O intervalo ancestral mais provável é fornecido: intervalos ancestrais nos nós indicam as distribuições ancestrais inferidas antes da especiação e as faixas ancestrais nas posições de canto representam as faixas geográficas

	imediatamente após a especiação. Gráficos de pizza pretos e brancos acima da reconstrução da área ancestral específica, mostram a probabilidade (em branco) da reconstrução correspondente, figura adaptada de Hilton & Lavoué (2018).....	36
<b>Figura 6.</b>	Local de coletada de 11 exemplares de <i>Arapaima</i> , lago as margens do rio Javaés, rio circundante do lado direito da Ilha do Bananal, Fazenda Aruanã, Lagoa da Confusão, TO, outubro de 2016.....	41
<b>Figura 7.</b>	Foto de ovário de fêmea de <i>Arapaima</i> (Setor Panta Leão, Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé – AM, 2017) .....	42
<b>Figura 8.</b>	Representação dos diferentes marcadores evidenciados no braço curto do par cromossômico nº 3 do cariótipo de <i>Arapaima gigas</i> (Da Rosa et al. 2009).....	57

## Material e Métodos

<b>Figura 9.</b>	Exemplares representativos de <i>Arapaima</i> (A) e <i>Heterotis niloticus</i> (B) utilizados no presente estudo .....	62
<b>Figura 10.</b>	Mapa Mundial evidenciando em vermelho a distribuição geográfica dos peixes da família Arapaimidae, <i>Heterotis niloticus</i> (círculo preto para o local de coleta) para o continente africano e espécies do gênero <i>Arapaima</i> na América do Sul. Caixa a esquerda ampliando as regiões de ocorrência em ambiente natural para indivíduos do gênero <i>Arapaima</i> , bacia Amazônica evidenciada em verde e bacia Tocantins-Araguaia em vermelho na América do Sul, pequenos círculos evidenciando os pontos de coletas em ambas as bacias, círculos amarelos representam coletas em pisciculturas.....	63

## Capítulo 1

<b>Figura 11.</b>	Distribuição geográfica dos peixes Arapaimidae e os locais de amostragem. Áreas de distribuição das espécies existentes de Arapaimidae (vermelho) e os registros fósseis atualmente descritos (cruzes). Os registros fósseis são baseados em descrições relatadas por Li & Wilson (1996); Newbrey & Bozek (2003); Santos (1985); Wilson & Murray (2008). Os pontos de amostragem são marcados por um triângulo para <i>Arapaima gigas</i> (Brasil) e quadrado para <i>Heterotis niloticus</i> (Nigéria).....	85
<b>Figura 12.</b>	Cariótipos de <i>Arapaima gigas</i> e <i>Heterotis niloticus</i> organizados a partir de cromossomos corados por Giemsa e Bandamento-C. Os pares Ag-NOR são destacados em caixas. Barra = 5 µm.....	89
<b>Figura 13.</b>	Cariótipos de <i>Arapaima gigas</i> e <i>Heterotis niloticus</i> após coloração com cromomicina CMA <sub>3</sub> /DAPI e FISH com DNAr. O FISH dual-color foi realizado usando os DNAs ribossomais 18S (vermelho) e 5S (verde) como sondas. Barra = 5µm.....	90
<b>Figura 14.</b>	Hibridação genômica comparativa em cromossomos metafásicos de <i>Heterotis niloticus</i> , (a) bandas-C; (b) padrão de hibridização com sondas derivadas de DNAg de <i>H. niloticus</i> (verde); (c) padrão de hibridização com sondas derivada de DNAg de <i>Arapaima gigas</i> (vermelho); (d) sobreposição de ambas as sondas de DNAg	



- mostrando as sequências compartilhadas entre as espécies (amarelo)..... 91
- Figura 15.** Hibridização genômica comparativa (CGH) em cromossomos metafásicos de *Arapaima gigas*, (a<sub>1</sub>) bandas-C; (b<sub>1</sub>) padrão de hibridização com sondas derivadas de DNAG de *A. gigas* (vermelho); (c<sub>1</sub>) padrão de hibridização com sondas derivadas de DNAG de *Heterotis niloticus* (verde); (d<sub>1</sub>) sobreposição de ambas as sondas de DNAG mostrando as sequências compartilhadas entre as espécies (amarelo). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (azul). Barra = 5µm..... 91
- Figura 16.** Análise de componentes principais (PCA) dos dados de SNPs de alelos DArT-seq encontrados em sete espécies de osteoglossiformes. Mapa de fatores individuais usando 3074 alelos (alelos de referência e alternativos). Amostras de osteoglossiformes com presença ou ausência de SNPs foram estruturados como observações (individuais) e variáveis, respectivamente, como dados da matriz de entrada. Gêneros Notopteridae (*Papyrocranus*, *Xenomystus*, *Notopterus* e *Chitala*) e gêneros Arapaimidae (*Heterotis* e *Arapaima*), juntamente com sua distribuição geográfica (África, Sudeste Asiático e América do Sul); as variáveis categóricas são resumidas nos quadrados preto (África), verde (Sudeste Asiático) e vermelho (América do Sul)..... 92
- Figura 17.** Idiogramas representando 2n e padrões de distribuição do DNAr em espécies osteoglossiformes. Nos cromossomos, os locais de distribuição do DNAr 18S são destacados em verde, e do DNAr 5S em vermelho e Sítios Teloméricos Intersticiais (ITS) em azul. HNI = *Heterotis niloticus*; AGI = *Arapaima gigas*; PMI = *Petrocephalus microphthalmus*; SWA = *Stomatorhinus walkeri*; MMO = *Marcusenius moorii*; GPE = *Gnathonemus petersii*; RNI = *Gymnachus niloticus*; CBL = *Chitala blanci*; CCH = *Chitala chitala*; COR = *Chitala ornamentado*; CLO = *Chitala lopis*; NNO = *Notopterus notopterus*; XNI = *Xenomystus nigri*; PAF = *Papyrocranus afer*; e PBU = *Pantodon buchholzi*. Os dados são baseados em Barby et al. (2018); Hatanaka et al. (2018)..... 94

## Capítulo 2.

- Figura 18.** a) Mapa do Brasil indicando os locais de coleta de *Arapaima* das bacias Tocantins-Araguaia (amarelo) e Amazônia (verde), codificadas de acordo com a Tabela 1. Os locais de amostragem das pisciculturas são representados por triângulos alaranjados, enquanto as amostragens naturais são mostradas como círculos vermelhos. b) resultados do fastSTRUCTURE para K de 2 a 4 e para K = 3 na análise no GENELAND. Cada amostra é representada como uma barra vertical mostrando a proporção de seu genoma pertencente a cada um dos grupos K. Linhas pretas separam indivíduos de diferentes localidades..... 103
- Figura 19.** Cariótipos de *Arapaima* macho (a, b, c) e fêmeas (d, e, f) arranjados sequencialmente por coloração de Giemsa (a, d), bandeamento C (b, c) e duplo-FISH com DNAr de 5S e 18S rDNA

	(c, f). Barra = 5µm.....	110
<b>Figura 20.</b>	Placas metafásicas de <i>Arapaima</i> da população de Javaé (JAV) (bacia Tocantins-Araguaia) hibridizadas com sequências de DNAs repetitivos, incluindo microssatélites mono di e trinucleotídeos e as famílias multigênicas U2 snDNA. Barra = 5 µm.....	111
<b>Figura 21.</b>	Placas metafásicas de <i>Arapaima</i> da população da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (MAM) (bacia Amazônica) hibridizadas com sequências de DNAs repetitivos, incluindo microssatélites mono di e trinucleotídeos e as famílias multigênicas U2 snDNA. Barra = 5µm.....	111
<b>Figura 22.</b>	Experimentos de hibridização genômica comparativa (CGH) em cromossomos metafásicos de indivíduos de <i>Arapaima</i> das populações Javaé (JAV) (a-d) e Mamirauá (MAM) (e-h). Primeira coluna (a, b): imagens de cromossomos corados com DAPI; segunda coluna (b, f): padrão de hibridização utilizando DNAg de <i>Arapaima</i> da população MAM (vermelho); terceira coluna (c, g): padrão de hibridização utilizando o DNAg de <i>Arapaima</i> da população JAV (verde); quarta coluna (d, h) sobreposição das imagens. As regiões compartilhadas são destacadas em amarelo. As setas indicam a maior abundância de algumas repetições em indivíduos da população MAM. Barra = 5µm.....	112
<b>Figura 23.</b>	Representação gráfica dos cenários simulados testados para <i>Arapaima</i> . O modelo 1 considera a distribuição amostrada como uma população panmítica em todos os momentos; o modelo 2 simula um evento de colonização na bacia amazônica; e o modelo 3 um evento de colonização na bacia Tocantins-Araguaia. Os símbolos representam os parâmetros estimados de theta ( $\theta$ ) nas populações atuais em todos os modelos, bem como os tempos de divergência entre bacias ( $\tau_2$ ) e da população COD ( $\tau_1$ ), tamanhos populacionais durante o evento fundador ( $\theta r_{F-A}$ ) e tamanhos populacionais durante e após o evento fundador ( $\theta r_{C-A}$ ).....	112
<b>Figura 24.</b>	Modelagem da distribuição climática de <i>Arapaima</i> , construída com base nos pontos de distribuição atuais (A). Áreas climáticas adequadas são mostradas de acordo com um gradiente para o presente (B), (C) último máximo glacial (21 mil anos) e (D) último máximo interglacial (120 mil anos) .....	113
<b>Figura 25</b>	Placas metafásicas de <i>Arapaima</i> da população de São Félix do Araguaia, MT (SFA), bacia To-Ar, hibridizadas com sequências de DNAs repetitivos, incluindo microssatélites mono, di e trinucleotídeos e as famílias multigênicas U2 snDNA. Barra = 5µm.....	113
<b>Figura 26</b>	Experimentos de Hibridização Genômica Comparativa (CGH) em cromossomos metafásicos de indivíduos de <i>Arapaima</i> das populações Javaé (JAV) (a-d) e Mamirauá (MAM) (e-h). Primeira coluna (a, b): imagens de cromossomos corados com DAPI; segunda coluna (b, f): padrão de hibridização utilizando DNAg de <i>Arapaima</i> da população MAM (vermelho); terceira coluna (c, g): padrão de hibridização utilizando o DNAg de <i>Arapaima</i> da população JAV (verde); quarta coluna (d, h) sobreposição das imagens. As regiões compartilhadas são destacadas em amarelo. As setas indicam a maior abundância de algumas repetições em	

	indivíduos da população MAM. Barra = 5 $\mu$ m.....	114
<b>Figura 27</b>	Estatísticas sumárias para diversidade genética observada em comparações par-a-par para <i>Arapaima</i> das bacias Am e To-Ar.....	116
<b>Figura 28</b>	Representação gráfica dos cenários simulados testados para <i>Arapaima</i> . O modelo 1 considera a distribuição amostrada como uma população panmítica em todos os momentos; o modelo 2 simula um evento de colonização na bacia amazônica; e o modelo 3 um evento de colonização na bacia Tocantins-Araguaia. Os símbolos representam os parâmetros estimados de theta ( $\theta$ ) nas populações atuais em todos os modelos, bem como os tempos de divergência entre bacias ( $\tau_2$ ) e da população COD ( $\tau_1$ ), tamanhos populacionais durante o evento fundador ( $\theta_{rF-A}$ ) e tamanhos populacionais durante e após o evento fundador ( $\theta_{rC-A}$ ).....	117
<b>Figura 29</b>	Validação cruzada da abordagem de aprendizagem profunda para investigar a história demográfica do gênero <i>Arapaima</i> na América do Sul.....	118
<b>Figura 30</b>	Modelagem da distribuição climática de <i>Arapaima</i> , construída com base nos pontos de distribuição atuais (A). Áreas climáticas adequadas são mostradas de acordo com um gradiente para o presente (B), (C) último máximo glacial (LGM - 21 mil anos) e (D) último máximo interglacial (LGI - 120 mil anos).....	120
<b>Fig. Supl. 5</b>	Esquema de treinamento de redes neurais convolucionais (CNN) aplicadas a dados empíricos de <i>Arapaima</i> da bacia amazônica e da bacia Tocantins-Araguaia.....	108

## LISTA DE TABELAS

### Material e Métodos

- Tabela 1.** Espécimes de arapaimídeos investigados, com os respectivos locais de coleta, amostras utilizadas e sexo, código de identificação da população, bacias hidrográficas, coordenadas geográficas e números de depósitos em museu..... 64

### Capítulo 1.

- Tab Sup 3.** Lista de todos os dados de SNPs gerados pelo sequenciamento DArTseq. para as espécies *Arapaima gigas*, *Heterotis niloticus*, *Chitala chitala*, *Chitala blanci*, *Notopterus notopterus*, *Papyrocrano afer*, *Xenomistus nigry*, FreqHomRef representa a frequência de homozigotos para o alelo de referência (alelo mais comum), FreqHomSnp representa a frequência de homozigotos para o alelo SNP (alelo menos comum) e FreqHets representa a frequência de heterozigotos..... 00

### Capítulo 2.

- Tabela 2.** Estatísticas sumárias para diversidade genética, calculadas usando o GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen, 2004) para as populações amostrada de *Arapaima* da bacia Am e To-Ar, com estimativas de heterozigosidade esperada (HE), heterozigosidade observada (HO) e coeficiente de endogamia (FIS)..... 115
- Tabela 3.** Estimativa de parâmetros com base nas redes neurais convolucionais (CNN), com base nos testes de modelo. Tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ), tempo de divisão das bacias Am e To-Ar ( $\tau_2$ ), tempo de divergência para a população COD ( $\tau_1$ ), magnitude do evento fundador ( $\theta_{rF-A}$ ) e magnitude do crescimento desde o evento fundador ( $\theta_{rC-A}$ )..... 119
- Tab Sup 4.** Lista de todos os dados de SNPs gerados pelo sequenciamento DArTseq. para as 80 amostras de *Arapaima* FreqHomRef representa a frequência de homozigotos para o alelo de referência (alelo mais comum), FreqHomSnp representa a frequência de homozigotos para o alelo SNP (alelo menos comum) e FreqHets representa a frequência de heterozigotos..... 00

## SUMARIO

<b>Resumo</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1. Deriva Gondwânica .....	23
1.2. Formação das Bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia (Brasil) e Bacia do Rio Níger (África).....	26
1.2.1 Bacia Amazônica.....	27
1.2.2 Bacia Tocantins-Araguaia.....	29
1.2.3 Bacia do Rio Niger.....	31
1.3. Os Osteoglossiformes: considerações quanto à origem e distribuição.....	32
1.4. A família Arapaimidae.....	37
1.4.1 Considerações sobre origem, distribuição e taxonomia.....	37
1.4.2 Aspectos biológicos, ecológicos e econômicos.....	40
1.4.2.1 <i>Arapaima gigas</i> (Schinz, 1822).....	40
1.4.2.2 <i>Heterotis niloticus</i> (Cuvier, 1829).....	44
1.5. Os peixes como material de estudos evolutivos: biodiversidade e conservação.	46
1.6. Os DNAs repetitivos na constituição genômica dos peixes: enfoque nos Osteoglossiformes.....	50
1.7 Investigações genéticas e citogenéticas em Arapaimidae.....	53
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
2.1. Justificativa e objetivo geral.....	59
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
3.1. Amostras do material biológico.....	62
3.2. Métodos.....	65
3.2.1. Obtenção de cromossomos mitóticos.....	65
3.2.2. Estimulação mitótica dos peixes.....	66
3.2.3. Detecção da heterocromatina C-positiva por bandamento-C.....	66
3.2.4. Detecção das bandas cromossômicas GC-ricas.....	67
3.2.5. Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NOR).....	67
3.2.6. Hibridização Genômica Comparativa (CGH).....	68
3.2.7. Hibridização <i>In situ</i> Fluorescente (FISH).....	69
3.2.7.1. As sondas.....	69
3.2.7.2. Marcação das sondas.....	70
3.2.7.3. Preparo das lâminas, hibridização e detecção do sinal.....	70
3.2.8. Análise dos resultados.....	71

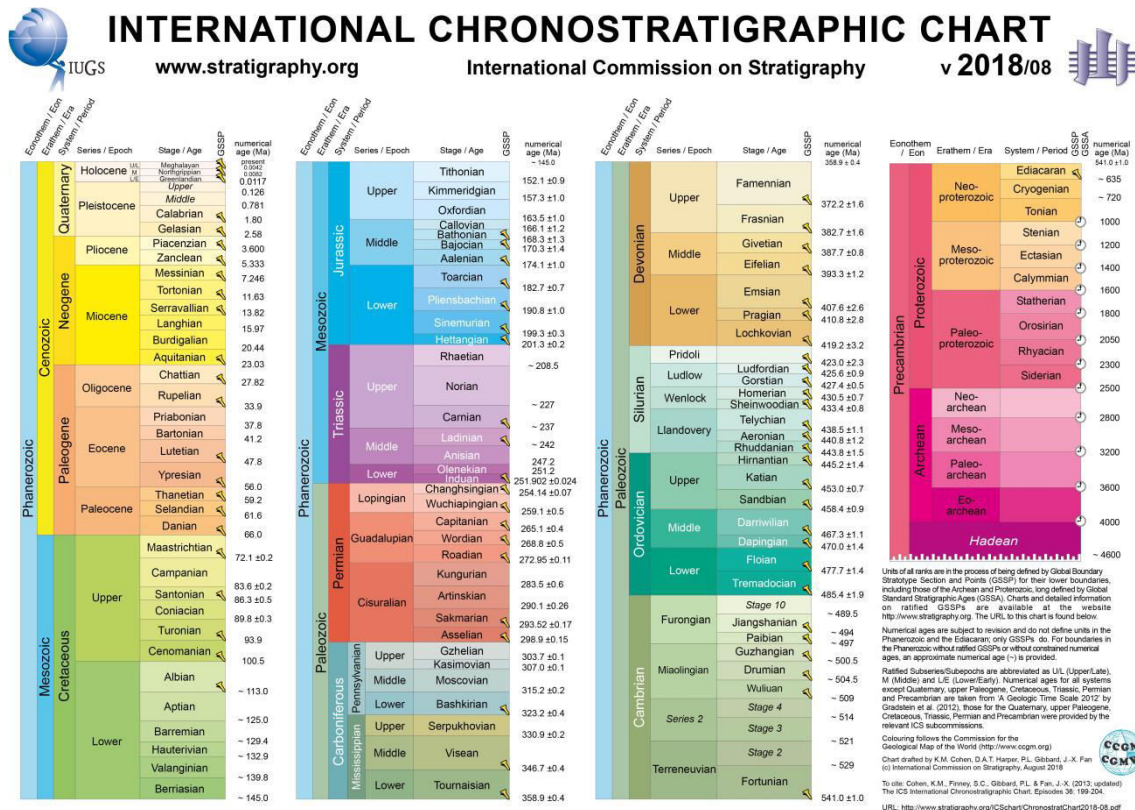
3.2.9. Metodologia DArT-seq e análise dos dados.....	72
3.2.9.1. Extração de DNA e genotipagem.....	72
3.2.9.2. Análise de Componentes Principais.....	73
3.2.9.3 Diversidade Genética e Isolamento por Distância.....	73
3.2.9.4 Estrutura Populacional.....	74
3.2.9.5. Seleção de Modelo Demográfico.....	74
3.2.9.6 Modelagem Paleogeográfica.....	76
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>Capítulo 1.....</b>	<b>79</b>
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>98</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>125</b>
<b>6. BIOGRAFIA.....</b>	<b>129</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>151</b>

# **Introdução**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Deriva Gondwânica

Um dos problemas relacionados a abordagens de eventos ancestrais é a correta identificação do tempo geológico em que eles ocorreram. Nessa perspectiva, adotamos no presente estudo a tabela de tempos geológicos atualizada (**Figura 1**), disponibilizada no site da Comissão Internacional sobre Estratigrafia, com o intuito de estabelecer um padrão global e facilitar comparações e interpretações.



**Figura 1:** Tempos geológicos com base em camadas cronoestratigráficas (Cohen et al. 2017).

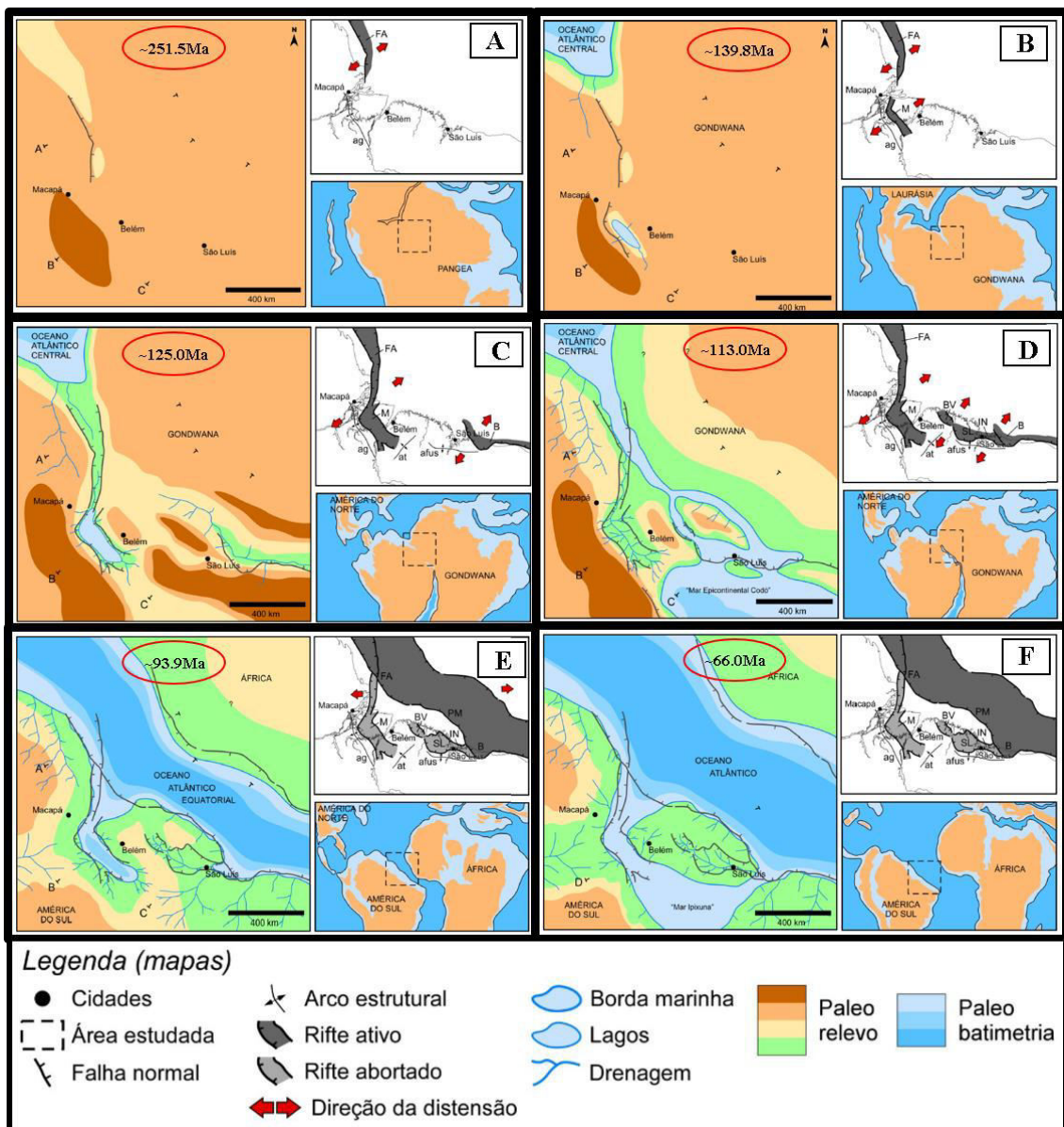
A hipótese mais aceita para a distribuição continental prevê que no início do período Triássico existia um único continente (Pangeia), ocupando quase todo o hemisfério Sul e um megaoceano chamado Pantalassa (Sanmartin & Ronquist, 2004). Nesse período, eventos importantes envolvendo a tectônica global iniciaram mudanças com fortes impactos na paisagem (Soares Júnior et al. 2011). Tais mudanças, tanto na instabilidade quanto na modificação da paisagem, originaram-se a partir do evento magmático CAMP (Central Atlantic Magmatic Province) em torno de 200 Ma, no final do Triássico (Hames et al. 2003; Marzoli et al. 2000; Mchone, 2000; 2002).



Por um certo período, África e América do Sul permaneceram ligadas no antigo continente Gondwana, ao longo do Paleozoico, separando-se no Mesozoico, especificamente no período Triássico. Conforme Alfred Wegner em Goldblatt (1993), principalmente com base em dados paleontológicos, tal separação ocorreu aproximadamente entre 152 e 156 Ma.

Entretanto De Azevedo (2011), sugere que a abertura do Atlântico Sul Equatorial ocorreu nas zonas de fratura oceânica de Ascensão e Bahamas, com estimativa de idade geológica entre o Aptiano-Cenomaniano (entre 125 a 100,5 Ma), ou que que essa abertura ocorreu no final do Jurássico início do Cretáceo entre 145 a 100 Ma (Galvão, 1991; Villegas, 1994; Soares Junior et al. 2011). Também é proposto que o contexto tectônico da América do Sul estabeleceu-se no início do Cretáceo período Aptiano aproximadamente 112 Ma com a separação da África e abertura do Atlântico Sul, e ainda que essa separação iniciou-se no Cretáceo a aproximadamente 35 Ma transcorrendo lentamente e se concretizando com o aumento do Oceano Atlântico, no meio do Cretáceo entre 106 a 84 Ma (Pindell et al. 1988; Rabinowitz & Labrecque, 1979).

Com base na movimentação tectônica e a paleogeografia da região, Soares Junior et al. (2011) sugeriram que a foz do Amazonas, ou seja, a margem Atlântica Equatorial, se formou a partir de um complexo de bacias sedimentares desenvolvidas desde o Neotriássico até o Eocretáceo (Albiano) em três fases distintas. Na primeira delas formou-se a Bacia da Foz do Amazonas, no Neotriássico. Na segunda, ocorreu a formação da Bacia de Marajó, no Berriasiano, além de uma nova fase de rifteamento na Bacia da Foz do Amazonas no Valanginiano e a formação das bacias de Bragança-Viseu, São Luís, Ilha Nova e Barreirinhas, no Aptiano. Finalmente, na terceira fase, houve uma nova movimentação tectônica para formar a Foz do Amazonas atual, envolvendo as bacias de Barreirinha e Pará-Maranhão entre o Aptiano e o Albiano, evoluindo a partir daí para a fragmentação continental da Gondwana (**Figura 2**).

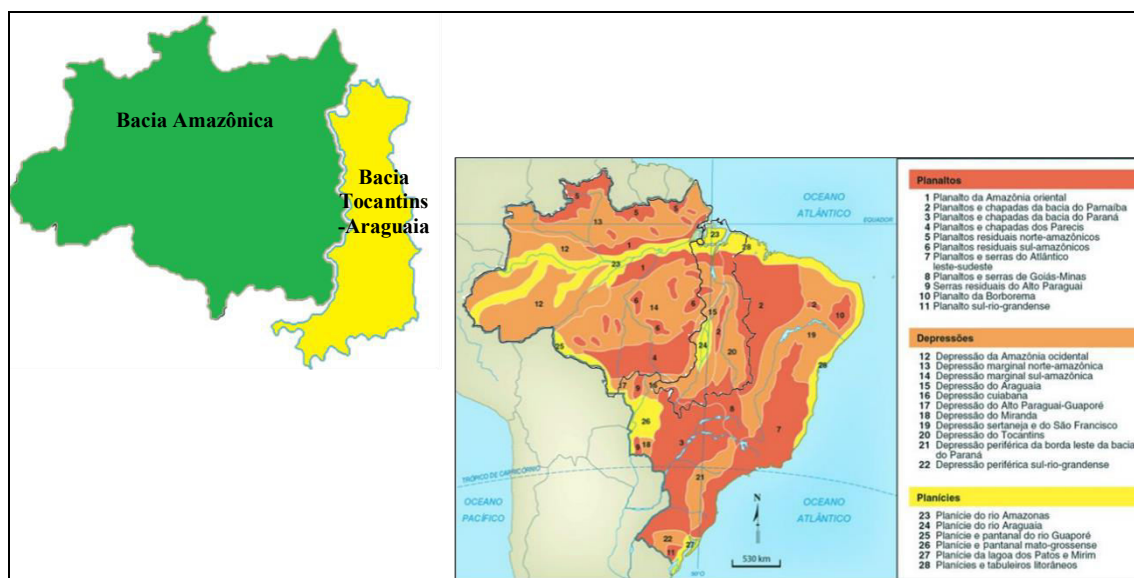


**Figura 2:** Mapa paleogeográfico da separação do Gondwana com os respectivos tempos geológicos (círculos em vermelho) - (A) Neotriássico, (B) Eocretáceo-Valanginiano, (C) Eocretáceo-início do Aptiano, (D) Eocretáceo-final do Aptiano, (E) Neocretáceo-Turoniano e (F) Neocretáceo-Paleogeno, (FA – Bacia da Foz do Amazonas; M – Bacia de Marajó; B – Bacia de Barreirinhas; BV – Bacia de Bragança – Viseu; SL – Bacia de São Luís; IN – Bacia de Ilha Nova; PM – Bacia do Pará – Maranhão; ag – Arco de Gurupá; afus – Arco Ferrer – Urbano Santos; at – Arco do Tocantins, figura elaborada com base em Soares Júnior et al. (2011), tempos geológicos baseados na tabela de Cohen et al. (2017).

## 1.2 Formação das Bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia (Brasil) e Bacia do Rio Níger (África)

Não é possível falar em formação e/ou definição de bacia hidrográfica sem considerar a geomorfologia e a paleogeografia, ponderando a sua relevância para a interpretação das formas e formação do relevo. De fato, ambas constituem condições indissociáveis na formação de divisores de águas, definindo cursos e características físico-químicas que influenciam diretamente a ecologia, a genética e a evolução dos organismos.

Para Ross (2016), o relevo brasileiro é bastante antigo e desgastado, constituído basicamente de planaltos, planícies e depressões que foram formadas a partir dos processos intempéricos de erosão contínuas e permanentemente adaptados. Esse autor divide o Brasil em 28 unidades morfoestruturais (**Figura 3**) que definem os cursos dos rios e das bacias hidrográficas brasileiras, com base em dados de sensoriamento remoto, de morfoclimas e de morfoesculturas.



**Figura 3:** Divisão do relevo brasileiro em 28 unidades morfoestruturais classificadas no mapa como: planaltos (em vermelho), formações produtos de erosão com altitude acima de 300m, conhecidos como morros, serras e chapadas. Depressões (em laranja), superfícies entre 100 e 500m de altitude, com inclinação suave, mais plana que o planalto, formadas também por processos de erosão. Planícies (em amarelo), áreas planas com altitude inferiores a 100m, formadas pelo acúmulo recente de sedimentos que definem os cursos d'água e, conseqüentemente, os cursos de drenagem dos rios das bacias hidrográficas brasileiras. Contorno preto dentro do mapa das unidades morfoestruturais, evidencia as áreas das bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia. Mapa externo ressaltando cada uma dessas bacias. Figura adaptada de Ross (1990).

O curso de uma bacia hidrográfica é objeto de estudo da Geomorfologia Fluvial, e permite, pela análise dos traçados dos rios e vales, bem como da morfologia do relevo, esclarecer inúmeras questões geomorfológicas (Christofolletti, 2001). De acordo com Riccomini et al. (2009), constituem a drenagem de uma bacia hidrográfica seus afluentes, subafluentes e eventuais lagos que drenam para um rio principal, formando um sistema propício ao transporte de matéria e de desgastes das bases litológicas. A grande maioria (93%) dos atuais sistemas fluviais da América do Sul drenam para o Oceano Atlântico, o que foi possível devido aos persistentes escudos continentais, da Guiana e Brasileiro, pela presença dos Andes emergindo nas margens continentais oeste e norte, por vários arcos estruturais e por uma bacia de antepaís a leste dos Andes (Lundberg et al. 1998).

### **1.2.1 Bacia Amazônica**

A bacia Amazônica abrange sete países: Brasil, Colômbia, Bolívia, Equador, Guiana, Peru e Venezuela, ocupando áreas que vão desde os Andes (onde ocorre a cabeceira do rio Solimões) até a foz no Oceano Atlântico. Possui uma área aproximada de 6 milhões de Km<sup>2</sup>, ocupando 45% do território brasileiro (**Figura 3**) onde abrange sete estados: Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima, Amapá, Pará e Mato Grosso. Apresenta extensa rede de grandes rios como o Amazonas, Xingu, Solimões, Madeira e Negro. Apresenta precipitação anual de 2.205mm, ~25% a mais do que a média nacional (1.761 mm). Concentra 81% das águas superficiais disponíveis no país, com vazão média equivalente a 74% da vazão média nacional. Uma boa parte da região ainda se encontra preservada, possuindo 85% da área ainda coberta por vegetação nativa (Agência Nacional de Águas, Brasil, 2015; Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2006).

O sistema fluvial dessa bacia é extremamente abundante, apresentando o maior volume de descarga do mundo (175.000 m<sup>3</sup>/s) e comprimento superior a 6.400 km. Entretanto, ainda são escassas as pesquisas sobre sua drenagem, bem como dos seus tributários (Rossetti & Valeriano, 2007). Todavia, dados geológicos mostram que nem sempre o curso dessa bacia permaneceu como se apresenta atualmente, com vários cenários diferentes moldando o seu curso de drenagem nos últimos milhões de anos (Rossetti & Valeriano, 2007; Sacek, 2014; 2017).

As unidades sedimentares da região do baixo Amazonas são datadas do Cretáceo ou mais recentes (Rossetti & Valeriano, 2007), com o padrão de drenagem da bacia apresentando-se dinâmico ao longo do tempo geológico. Inicialmente a drenagem

do oeste do rio Amazonas fluía para o Caribe, mas em torno de 10 Ma esse padrão de drenagem voltou-se para o leste, onde se encontra atualmente a foz do rio Amazonas, tendo por base a datação de sedimentos provenientes dos Andes encontrados na foz do rio Amazonas (Sacek, 2014; 2017). Gorini et al. (2014), com base em análises sísmicas e de sedimentos, constataram que possivelmente existiu um proto-Amazonas. Os dados de Van Soelen et al. (2017) sobre produtividade marinha primária, pela análise de sedimentos na região próximo a foz do Amazonas, também sugerem que um sistema fluvial anterior ao rio Amazonas, transcontinental, estaria presente nessa região desde antes do Mioceno.

Outras abordagens semelhantes, com base em análises das camadas estratigráficas sedimentares nas regiões próximas a foz do Amazonas, indicam que os sedimentos provenientes dos Andes, no Oceano Atlântico, datam de cerca de 9,4 a 8,7 Ma, evidenciando o início da drenagem do rio Amazonas transcontinental (Hoorn et al. 2017; Van Soelen et al. 2017). Todavia, Figueiredo et al. (2010) sugerem que o rio Amazonas se inicia como transcontinental no Mioceno, entre 11,8 e 11,3 Ma, e completou sua conformação atual durante o final do Pleistoceno.

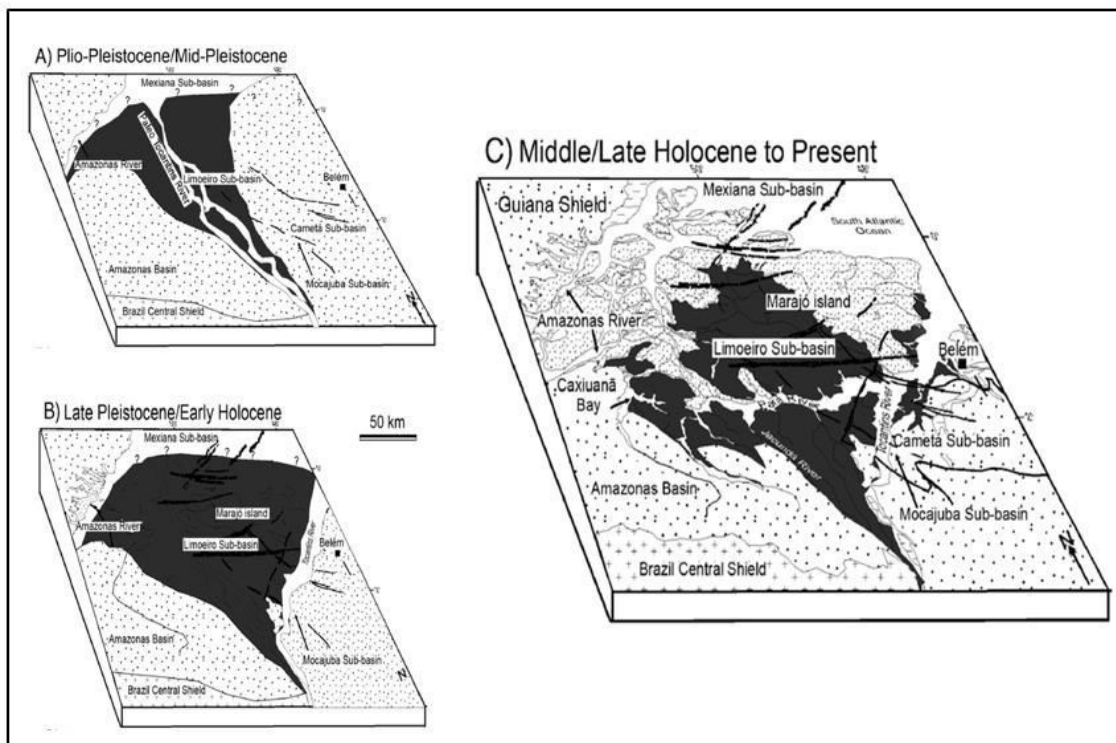
Alguns autores também suportam a ideia de que o rio Paraná, com cabeceira previamente estabelecida no Chile e Argentina por evento de captura de cabeceira de um proto-Amazonas-Orinoco, drenava para o norte até o estabelecimento do divisor de águas moderno entre a bacia do Paraná e Amazonas a ~30Ma (Lundberg et al. 1998). Com o episódio tectônico de inclinação da oroclinal boliviana, formou-se na base dos Andes, uma bacia de antepaís antes do Mioceno tardio e que esta bacia drenou a vasta região da Amazônia Ocidental, Orinoco ocidental e norte do rio Magdalena para o Caribe (Lundberg et al. 1998). Posteriormente, a ~10Ma, com a formação final da Cordilheira Oriental, originou-se o sistema do rio Magdalena e com a continuação da elevação da Cordilheira de Mérida e Cordilheira Oriental da Colômbia (~8.5 – 8.0 Ma) resultou o fechamento do portal caribenho para a drenagem do proto-Amazonas-Orinoco oriental. Por fim, há ~8.0 Ma ocorreu, então, o estabelecimento do atual padrão de drenagem do rio Amazonas, de oeste para leste, em direção ao Oceano Atlântico (Lundberg et al. 1998).

No território brasileiro a Região Hidrográfica Amazônica (RH Amazônica) ou bacia Amazônica, limita-se com os divisores de águas da drenagem da bacia Tocantins-Araguaia a oeste, sendo as Serras dos Carajás, da Seringa, dos Gradaús e Roncador, ocorrendo em uma depressão inundada na maior parte do ano, com ocorrência de vários

lagos, pântanos e florestas sazonais, até desaguar no Estuário Amazônico no Oceano Atlântico (Ministério do Interior, Brasil, 1982; Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2006).

### 1.2.2 Bacia Tocantins-Araguaia

Durante o Plio-Pleistoceno a Bacia Tocantins-Araguaia drenava para o rio Amazonas através de um paleo rio Tocantins. Contudo, devido à formação de barreiras por acúmulo de sedimentos na região da foz, o curso da drenagem mudou para o leste da atual Ilha do Marajó. Subsequentemente, com a erosão de partes destes sedimentos por um braço do rio Amazonas formou-se o rio Pará e a Ilha do Marajó. Esse novo braço atualmente recebe a drenagem da bacia Tocantins-Araguaia (**Figura 4**) (Rossetti & Valeriano, 2007).



**Figura 4:** Mudanças na drenagem da bacia Tocantins-Araguaia a partir do Plio-Pleistoceno, A) Foz do paleo rio Tocantins desaguando no Amazonas; B) formação de barreira de sedimentos e desvio da foz do rio Tocantins e C) formação do rio Pará, a partir de um braço do rio Amazonas, erodindo sedimentos em falhas geológicas do Holoceno, com separação da Ilha do Marajó e nova conformação da drenagem da bacia Tocantins-Araguaia desaguando no rio Pará, adaptado de Rossetti & Valeriano (2007).

Essa bacia é a maior bacia totalmente localizada em terras brasileiras, possuindo superfície de  $\sim 918.273\text{km}^2$ , representando 10,8% do território nacional e abrangendo os estados de Goiás (26,8%), Tocantins (34,2%), Pará (20,8%), Maranhão (3,8%), Mato Grosso (14,3%) e o Distrito Federal (0,1%). A maior parte situa-se na região Centro Oeste do país, inclusive a nascente de seus dois principais representantes, rios Tocantins e Araguaia, drenando suas águas para a região Norte do país (**Figura 3**) (Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2006; Agência Nacional de Águas, Brasil, 2015).

Após a confluência do Araguaia com o Tocantins, a bacia fica restrita a um corredor de  $\sim 300\text{Km}$  de comprimento, acompanhando o curso do rio Tocantins e desaguando no rio Pará. Limita-se a oeste com a bacia do rio Xingu e ao norte com o estuário amazônico (ambos pertencentes à bacia Amazônica), ao sul com a bacia do rio Paraná e a leste com a bacia do rio São Francisco. Podem ser também relatados como limites geográficos e possíveis divisores de água ao sul o Planalto Central, a oeste as Serras dos Carajás, da Seringa, dos Gradaús e Roncador, a leste a Serra Geral de Goiás e a Chapada Mangabeiras e ao norte o estuário amazônico. O divisor de água entre os rios Tocantins e Araguaia é representado pela Serra Dourada (Ministério do Interior, Brasil, 1982).

O rio Tocantins possui  $\sim 1960\text{Km}$  de extensão, da nascente no Planalto de Goiás, a 1000m de altitude, até a sua foz no Oceano Atlântico na margem direita da Ilha do Marajó, no estado do Pará. Seus principais afluentes são os rios das Almas e Maranhão, na região de sua nascente, Paranã, Bagage, Tocantinzinho, Dos Sonos, Manoel Alves Grande e Farinha, na margem direita e rios Santa Tereza e Itacaúnas na margem esquerda. Entretanto, seu principal tributário na margem esquerda é o rio Araguaia, com extensão de  $\sim 2600\text{Km}$ , e onde se encontra a Ilha do Bananal, a maior ilha fluvial do mundo, isolada pelo curso principal do rio Araguaia e um dos seus braços o qual, na região dessa ilha, recebe o nome de rio Javaé (Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2006; Agência Nacional de Águas, Brasil, 2015).

O clima na Região Hidrográfica do Tocantins-Araguaia (RH-Tocantins-Araguaia) ou bacia Tocantins-Araguaia é tropical, com temperatura média anual de  $26^\circ\text{C}$ . Ocorrem dois períodos climáticos bem definidos: um chuvoso compreendendo os meses de outubro a abril, com mais de 90% de precipitação, representando em torno de 1.869 mm/ano, e um período seco compreendendo os meses de maio a setembro, com baixa umidade relativa do ar e uma média de evapotranspiração de  $\sim 1.371$  mm/ano. É a segunda maior região do Brasil em termos de disponibilidade hídrica, apresentando uma

vazão média de  $\sim 13.779 \text{ m}^3/\text{s}$ , equivalente a 9.6% do total do país e apresenta predominantemente dois tipos de biomas, a Floresta Amazônica e o Cerrado, este último ocupando mais de 50% da área da região (Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2006; Agência Nacional de Águas, Brasil, 2015).

### **1.2.3 Bacia do Rio Níger**

O rio Níger é o décimo maior rio do mundo, o maior rio da África Ocidental com extensão de aproximadamente de 4.180 km, e o terceiro maior rio da África, sendo menor apenas que os rios Nilo e Congo. Seus principais afluentes são os rios Bani, Mekrou, Sokoto e Kaduna. Apresenta curvatura acentuada a aproximadamente 2.200 Km de seu trajeto e grande parte de sua área na região da foz permanece inundada durante todo o ano. Possui vários lagos de tamanho acentuado, dentre eles os lagos de Faguibine com  $800 \text{ Km}^2$ , Niangaye com  $400 \text{ Km}^2$ , Tanda e Kabara com  $325 \text{ Km}^2$  e Debo e Walado-Debo com  $220 \text{ Km}^2$  (Davies & Walker, 1986).

De acordo com Daget (1954), a bacia do rio Níger apresenta uma história complexa. Até o final do Terciário existiam dois rios, um proto-alto Níger, fluindo para o Golfo de Senegal, que posteriormente foi ligado ao rio Senegal, e um proto-baixo Níger que drenava as terras altas do Saara. No final do Terciário, com as secas mais intensas, os vales ocidentais do Alto Níger foram bloqueados com depósitos eólicos. No início do Quaternário, após estabelecimento de condições mais úmidas, formou-se na região norte do rio um lago. Dunas de areia invadiram novamente o norte da bacia e atingiram o nível do afloramento. Finalmente, no período fluvial subsequente, o aumento das chuvas e o assoreamento do lago forçaram lentamente o rio na direção nordeste onde se juntou ao Baixo Níger, atingindo gradualmente sua forma atual.

A bacia do Níger faz fronteira ao sul com a cordilheira Guineense e a oeste e noroeste com as montanhas Fouta-Djalon e Mandingue respectivamente. Seus sedimentos, nas regiões de planícies na parte setentrional da bacia, são datados do Quaternário (Picouet et al. 2001). As margens são compostas de planaltos e encostas conectadas em áreas mais baixas, frequentemente ocupadas por lagos. Na sua forma atual a bacia é formada por dois subsistemas: um proveniente do Níger propriamente dito, que nasce na Guiné e flui para o sudeste, em uma região de planícies que se ramifica e forma uma rede de canais que durante a chuva transbordam e formam um lago conhecido com Delta Interior do Níger, e outro constituído pelo rio Benue que



nasce no norte de Camarões e flui para o oeste até atingir o Níger a 460 Km da sua região de descarga no grande Golfo da Guiné (Davies & Walker, 1986).

A nascente do rio Níger ainda não é bem definida. Alguns autores, como Fontes et al. (1991), sugerem que sua nascente se situa na Serra Leoa, enquanto Pedinotti et al. (2012), consideram que ele começa nas montanhas da Guiné e termina na Nigéria, passando por um enorme delta interior e deságua no Oceano Atlântico. Atualmente a bacia do Níger contribui significativamente na disponibilidade de água e alimento para a região da África Ocidental que, por ser uma região agrícola, é altamente dependente das práticas de gestão e disponibilidade de água (Pedinotti et al. 2012).

### **1.3 Os Osteoglossiformes: considerações quanto à origem e distribuição**

A superordem Osteoglossomorpha é considerada um grupo monofilético (Betancur-R et al. 2013; Lavoué et al. 2012; Near et al. 2012) e representa uma das primeiras linhagens divergentes dos teleósteos modernos e restritos à água doce (Arratia, 1999; Lundberg, 1993; Near et al. 2012). Compreende várias espécies vivas distribuídas naturalmente ou introduzidas em todos os continentes, com exceção da Antártica (Adite et al. 2005; Hilton & Lavoué, 2018; Hurtado et al. 2018; Nelson et al. 2016). Esta ordem possuem um amplo registro fóssil, com mais de 80 espécies extintas em praticamente todos os continentes (Wilson & Murray, 2008), possui morfologia heterogênea, apresentam fosseis tanto em ambientes de água-doce quanto em ambientes marinhos (Forey & Hilton, 2010; Hilton & Lavoué, 2018). Ainda que alguns autores apoiem o monofiletismo do grupo, suas relações filogenéticas, bem como sua biogeografia, apresentam opiniões divergentes (Buckup, 2003; Hilton, 2003; Hilton & Lavoué, 2018; Lavoué & Sullivan, 2004; Nelson et al. 2016). Com base no total de registros fósseis, é estimado que a sua origem varia do Triássico ao Médio Jurássico (~206.9-167.0 Ma), com média em torno de ~182,4 Ma, tempo este que está intimamente ligado à origem dos primeiros teleósteos (Arratia, 2010; Dornburg et al. 2014; Hughes et al. 2018).

A superordem Osteoglossomorpha é dividida em duas ordens, Osteoglossiformes e Hiodontiformes. Osteoglossiformes são peixes encontrados em diversos rios e lagos encontrados na África, Ásia, América do Sul, Austrália e ilhas do Oceano Pacífico tropical. Em contraste, os Hiodontiformes ocorrem apenas na América do Norte e são provavelmente o grupo mais primitivo de osteoglossomorfos vivos (Nelson et al. 2016). Alguns autores dividem os Osteoglossiformes em cinco famílias

distintas: Pantodontidae, Notopteridae, Gymnarchidae, Mormyridae e Osteoglossidae agrupando todas as espécies conhecidas como aruanãs (*Scleropages* e *Osteoglossum*) e pirarucus (*Arapaima* e *Heterotis*) nesta última família (Nelson et al. 2016). No entanto Ferraris Jr (2003), engloba *Osteoglossum* e *Scleropages* dentro de Osteoglossidae e *Arapaima* e *Heterotis* em uma nova família, Arapaimidae, critério este que está sendo adotado no presente estudo.

Das seis famílias atualmente descritas, três apresentam distribuição restrita ao continente Africano (Pantodontidae, Mormiridae e Gymnarchidae), enquanto as outras três (Arapaimidae, Notopteridae e Osteoglossidae), se apresentam distribuídas em distintos continentes (Nelson et al. 2016). Pantodontidae e Gymnarchidae, contém apenas uma espécie descrita, *Pantodon buchholzi* (peixe-borboleta africano) e *Gymnarchus niloticus* (“aba-aba”). Por sua vez, a família Mormyridae representa a maior família da ordem Osteoglossiformes, com cerca de 200 espécies e 18 gêneros, com a maioria das espécies apresentando um tamanho de 09-50 cm. A família Osteoglossidae é composta de seis espécies, popularmente conhecidas como “aruanãs”, subdivididas em dois gêneros: *Osteoglossum* e *Scleropages*. Dentro do gênero *Osteoglossum*, as duas espécies existentes, *O. bicirrhosum* (aruanã prata) e *O. ferreirai* (aruanã preto) são endêmicas da América do Sul. Por sua vez, o gênero *Scleropages* engloba espécies endêmicas do Sudeste Asiático (*S. formosus* e *S. inscriptus*) e do norte da Austrália e Nova Guiné (*S. jardinii* e *S. leichardti*) (Bloom & Lovejoy, 2012; Nelson, 2006). A família Arapaimidae é constituída por apenas dois gêneros, *Arapaima* e *Heterotis*, sendo encontrados em diferentes bacias hidrográficas da América do Sul e da África, respectivamente. Por fim, a família Notopteridae contém dez espécies popularmente conhecidas como “peixes-faca” e distribuídas em 4 gêneros: *Chitala*, *Notopterus*, *Papyrocranus* e *Xenomystus*. Já os gêneros *Chitala* e *Notopterus* são endêmicos do sudeste asiático, *Papyrocranus* e *Xenomystus* são encontradas exclusivamente no continente africano (Nelson et al. 2016; Roberts, 1992).

Recentemente Vialle et al. (2018) realizaram análises filogenômicas comparativas em 24 espécies de três grandes grupos de peixes ósseos, ou seja, Osteoglossomorpha, Elopomorpha e Clupeocephala, sugerindo que Osteoglossomorpha e Elopomorpha são grupos-irmãos e constituem a linhagem irmã de Clupeocephala. Esses autores consideram que o tempo de divergência entre Osteoglossomorpha e Elopomorpha é de aproximadamente ~30 Ma entre (187,77 à 159,27 Ma) e que a divergência destas duas linhagens em relação a Clupeocephala data de ~245,94 Ma. Paralelamente, outra

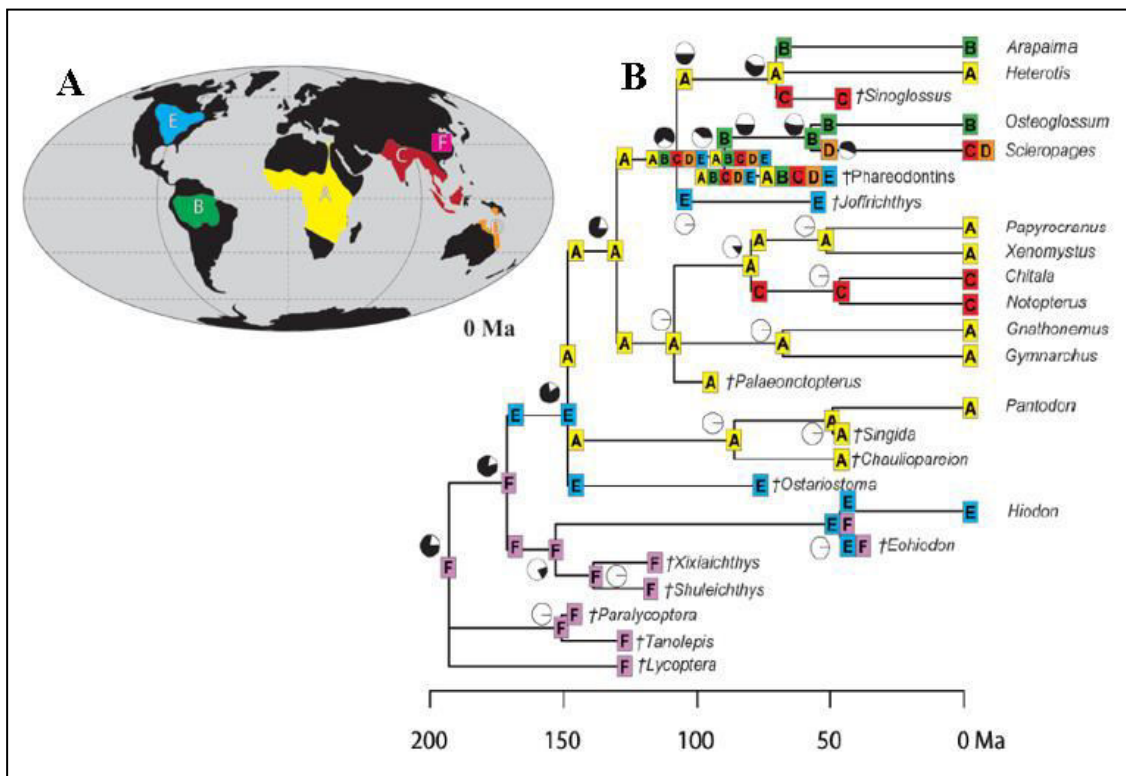
informação relevante advinda desses estudos é que as duas famílias da ordem Osteoglossiformes presentes na América do Sul, Arapaimidae e Osteoglossidae, divergem em aproximadamente ~91,14 Ma, já no final do Cretáceo. Enquanto que os Osteoglossomorpha mais basais podem ter sido afetados pelo rompimento da Gondwana, ou até mesmo da Pangeia, a abundância desse grupo em áreas não ocupadas por linhagens atuais (nordeste asiático), ou atualmente apresentando baixa diversidade (América do Norte), sugere uma história biogeográfica complexa, onde eventos de dispersão e/ou extinção locais desempenharam um papel fundamental (Capobianco & Friedman, 2018). Notopteridae, por exemplo, apresenta registro fóssil indicando que já estava presente na Índia desde o Cretáceo, o que, entretanto, não pode ser usado para estimar o seu tempo ou local de origem. Estimativas moleculares de divergência entre notopterídeos africanos e asiáticos mostram considerável variação do Jurássico Superior ao Cretáceo Superior (Inoue et al. 2009; Lavoué, 2016). Desta forma, nem o cenário considerando um evento de vicariância África-Índia, assim como nem a dispersão da África para a Índia através do Canal de Moçambique, podem ser rejeitados com base nas evidências presentes (Capobianco & Friedman, 2018).

Com base em modelos de dispersão e considerando que todas as principais linhagens de Osteoglossomorpha possuem registro fóssil no continente africano (exceto os Hiodontidae, acredita-se que a África possa ter sido o centro de origem e dispersão desse grupo (Darlington, 1957). No entanto, a maior diversidade de registro fóssil de Osteoglossomorpha é encontrado em formações do Jurássico Superior e Cretáceo Inferior do nordeste asiático, o que, contudo, não esclarece se esse padrão é devido a uma origem asiática ou a um viés geográfico do registro sedimentar no continente (Capobianco & Friedman, 2018). Outro padrão proposto por Kumazawa & Nishida (2000), sugere uma ampla distribuição pangeana durante o Permiano-Triássico, mas sem evidências paleontológicas, mesmo considerando a grande riqueza de fósseis para este período (Romano et al. 2016). Entretanto, para a divergência entre as ordens Osteoglossiformes e Hiodontiformes Cavin (2017), propõe um evento vicariante Laurasia-Gondwana no Jurássico originando os Hiodontiformes Laurasianos e os Osteoglossiformes Gondwânicos.

Dentre os peixes ósseos a ordem Osteoglossiformes constitui um dos grupos mais basais, característica esta que tem despertado o interesse em diferentes áreas de estudo como a sistemática, morfologia, filogenia, biogeografia e evolução (Greenwood et al. 1966; Greenwood, 1973; Hilton, 2003; Lundberg, 1993; Nelson, 1969; Nelson et

al. 2016; Taverne, 1979; Wilson & Murray, 2008). Essa ordem apresenta ampla distribuição geográfica, com pelo menos um representante em cada um dos continentes do hemisfério sul. Esta distribuição cosmopolita, englobando Américas do Norte e do Sul, África, Europa, Ásia Continental, Indo-Malaya e Austrália e ainda representantes marinhos (*Phareodus* do início do Paleogeno) sugere possível dispersão marinha de longa distância (Bonde, 2008; Wilson & Murray, 2008).

Dados atualizados sobre a filogenia e a filogeografia dos Osteoglossiformes são discutidos em Hilton & Lavoué (2018) (Figura 5).



**Figura 5.** Biogeografia histórica de Osteoglossomorpha baseada na análise de área ancestral. Estimativa da área ancestral usando filogenia bayesiana calibrada através de combinações entre tempo, caracteres moleculares e morfológicos de táxons existentes e extintos. Letras de A à F representam as regiões (ver mapa figura A) usadas para a reconstrução biogeográfica: A (amarelo) Afrotrópico; B (verde) Neotrópico; C (vermelho) Oriente; D (laranja) Austrália; E (azul) Neártico, F (rosa) Nordeste Paleártico (período Cretáceo). As distribuições geográficas dos táxons existentes e extintos são indicadas (figura B). O intervalo ancestral mais provável é fornecido: intervalos ancestrais nos nós indicam as distribuições ancestrais inferidas antes da especiação e as faixas ancestrais nas posições de canto representam as faixas geográficas imediatamente após a especiação. Gráficos de pizza pretos e brancos acima da reconstrução da área ancestral específica mostram a probabilidade (branco) da reconstrução correspondente, figura adaptada de Hilton & Lavoué (2018).

Por sua vez, pelo fato de alguns grupos estarem amplamente distribuídos em ambientes de água doce das regiões tropicais, e neotropicais eles estão sempre incluídos nas discussões da biogeografia Gondwânica. No entanto, a ocorrência de Osteoglossiformes atuais e extintos incluindo o hemisfério norte e também ambientes marinhos dificulta a reconstrução da história biogeográfica para este grupo de peixes (Greenwood, 1970; 1973; Hurtado et al. 2013; Inoue et al. 2009; Lauder, 1983; Lavoué, 2016; Lundberg, 1993; Lundberg & Chernoff, 1992; Near et al. 2012; Nelson, 1969; Patterson, 1975; 1981; Soares, 2008; Taverne, 2015). Portanto, alguns grupos monofiléticos que possuem representantes na África e América do Sul podem contribuir significativamente para a melhor compreensão da história biogeográfica e filogenética dos Osteoglossiformes (Goldblatt, 1993; Lundberg, 1993).

## **1.4 A família Arapaimidae**

### **1.4.1 Considerações sobre origem, distribuição e taxonomia**

De acordo com as evidências fósseis, muitos clados endêmicos das terras baixas da Amazônia são muito anteriores às incursões marinhas Mioceno-Plioceno, ou mesmo de formações datadas do Médio-Mioceno da atual bacia Amazônica (Lundberg, 2005; Lundberg et al. 1998; 2007; Lundberg & Aguilera, 2003; Lundberg & Chernoff, 1992). Filogenias moleculares utilizando calibração com relógio molecular sugerem que alguns desses táxons datam do Paleogeno. Além disso, alguns registros de *Lepdosiren* (Dipnoi) e *Arapaima* em planícies inundadas são muito antigos, com origens no Cretáceo Superior, mostrando que a ictiofauna da bacia Amazônica tem origem heterogênea (Lopez-Fernandez et al. 2005; Lovejoy & Albert, 2010; Lovejoy et al. 2006).

Uma característica interessante evidenciada no registro fóssil para a espécie que são consideradas grupo-irmão de Arapaimidae e Osteoglossidae, é que várias espécies foram encontradas em depósitos marinhos (Bonde, 2008; Forey & Hilton, 2010; Taverne, 1998). Isto é notável porque, uma vez que a grande maioria dos fósseis de osteoglossiformes existentes foram encontrados em ambientes de água doce, esta ocorrência de fósseis marinhos sugere que pelo menos partes da história evolutiva dos Osteoglossomorpha ocorreu em ambiente marinho (Bonde, 2008; Forey & Hilton, 2010; Patterson, 1975; Taverne, 1998), indicando uma origem marinha com várias incursões em ambiente de água-doce (Forey & Hilton, 2010). Entre as formas marinhas estão † *Magnigena* (Paleoceno, Arábia Saudita), † *Brychaetus* (Eoceno, Europa, África, sul da

Ásia e possivelmente da América do Norte), † *Heterosteglossum*, † *Furichthys*, † *Xosteglossid*, † *Brychaetoides*, e um Osteoglossiforme não identificado (Início do Eoceno, Dinamarca), † *Monopteros*, † *Thrissopterus* e † *Foreyichthys* (Eoceno, Monte Bolca, Itália), bem como vários táxons não nomeados (por exemplo, particularmente a caixa craniana parecida com o osteoglossídeo do Eoceno de Londres (Forey & Hilton, 2010).

Dentre os Osteoglossiformes, a família Arapaimidae compreende duas linhagens distintas com distribuição intercontinental, ou seja, o gênero africano *Heterotis* (aruanã africano) e o gênero sul-americano *Arapaima* (pirarucu) (Forey & Hilton, 2010). Com base em análises de marcadores moleculares, Betancur-R et al. (2013) sugerem que a separação dessas duas linhagens teria ocorrido entre 136 a 65.5 Ma.

O registro fóssil de Arapaimidae e Osteoglossidae sugere o Cretáceo e início do Eoceno como idade mínima para ambos os clados. Entretanto, tais estimativas baseadas em fósseis não são conclusivas, tendo em vista as dificuldades de compreensão das relações filogenéticas dos fósseis deste grupo (Forey & Hilton, 2010). Por sua vez, (Broughton et al. 2013) consideram que quando se considera fósseis correlacionados ao grupo, como † *Chanopsis*, há certa consistência com datas moleculares, indicando o início do Cretáceo como estimativa da idade desses clados.

O registro fóssil da família Arapaimidae indica que linhagens de *Arapaima*, surgiram na América do Sul antes do Cretáceo (Cesero et al. 1997; Lundberg & Chernoff, 1992). Espécies deste grupo, como o pirarucu (*Arapaima gigas*) podem ser considerados fósseis vivos tendo em vista que resguardam muitas características primitivas presentes nos peixes mais ancestrais. Índícios sugerem que ele viveram no período Paleoceno e sua distribuição geográfica constantemente é relacionada com o evento geológico da deriva continental (Maisey, 2000; Taverne & Maisey, 1999). Considerando a idade dos registros fósseis, a vicariância continental envolvendo a deriva da América do Sul-África, bem como a fragmentação do bloco América do Sul-Antártica-Austrália, podem ter apresentado papel significativo na divergência dos Osteoglossiformes da América do Sul (Capobianco & Friedman, 2018). Entretanto, alguns autores sugerem que a distribuição atual dos Arapaimidae, quando correlacionado com os registros fósseis, pode ser explicada por dispersão marinha seguida pela colonização de ambientes de água doce (Lavoué, 2016; Wilson & Murray, 2008).

Entretanto, mesmo considerando a existência de fósseis marinhos correlacionados com *Arapaima* e *Heterotis*, não há evidência convincente que os ancestrais comuns mais recentes eram marinhos adaptados (Bonde, 2008; Lavoué, 2016; Sparks & Smith, 2005; Taverne, 1998). Desta forma Hilton & Lavoué (2018), consideram que, embora teoricamente seja possível a hipótese de dispersão marinha explicando a distribuição de *Arapaima* e *Heterotis*, isso parece altamente improvável, tendo em vista que requer a combinação de quatro eventos raros de evolução biológica para estes peixes, sendo elas: 1) uma transição “água doce para o ambiente marinho”, 2) uma dispersão marinha a longa distância, 3) uma transição “marinha para água doce” e finalmente, 4) a extinção seletiva de organismos marinhos. Desta forma estes autores sugerem que eventos de dispersão explicam melhor as trocas intercontinentais de peixes de água doce do final do Cretáceo para o Eoceno, mesmo considerando situações que possam parecer improváveis ou inadequadas para peixes de água doce tropicais, como: temperatura temperada para latitudes acima de 30 graus e pontes terrestres intercontinentais, que teriam existido, sustentando ambientes de água doce contínuos, conectando América do Sul e América do Norte, América do Norte e Europa e Europa e África durante o intervalo Cenozoico a Cretáceo-Inferior.

Dentro do gênero *Heterotis*, *H. niloticus* representa a única espécie conhecida de Arapaimidae em rios tropicais e lagos de água doce da África central e ocidental (Lévêque et al. 1990; Nelson, 2006). Apesar de ser popularmente conhecida como "aruanã africano", é mais estreitamente relacionada com os pirarucus do que com o aruanã asiático (*Scleropages formosus*) e australianos (*S. leichardtii* e *S. jardnii*), justificando sua recente inclusão na família Arapaimidae (Ferraris Jr, 2003). No que se refere ao gênero *Arapaima*, sua distribuição abrange uma grande parte das bacias Tocantins-Araguaia e Amazônica no Brasil e no Peru (Buckup, 2003; Castello, 2008). Este gênero foi considerado monotípico por muitos anos, possuindo apenas a espécie *A. gigas* como representativa (Ferraris Jr, 2003). Entretanto, estudos recentes vêm considerando a inclusão de possíveis novas espécies válidas nesse gênero. De fato, Stewart (2013a), descreveu uma nova espécie, *Arapaima leptosoma*, coletada na região de confluência dos rios Purus e Solimões, na bacia Amazônica, assim como redescobriu uma antiga espécie, *Arapaima agassizii*, originalmente descrita por Cuvier & Valenciennes (1847), coletado em terras baixas da Amazônia brasileira. Stewart, (2013a) ainda propõem que o gênero *Arapaima* abrigaria pelo menos cinco espécies (*A. gigas*, *A. mapae*, *A. arapaima*, *A. agassizii* e *A. leptosoma*). Entretanto, esta questão tem

sido controversa, visto que outros autores consideram que os espécimes de *Arapaima* presentes nas bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia correspondem a uma única espécie nominal, constituindo uma população panmítica com uma grande área de distribuição (Farias et al. 2015; Hrbek et al. 2005; Hrbek et al. 2007; Hrbek & farias, 2008). Assim sendo, a taxonomia do gênero *Arapaima* ainda permanece obscura, carecendo de maiores análises.

## **1.4.2 Aspectos biológicos, ecológicos e econômicos**

### **1.4.2.1 *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)**

*Arapaima gigas*, também é conhecido como “pirosca” nas proximidades da Ilha do Bananal, na bacia Tocantins-Araguaia nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso e Pará. Mas é mais popularmente conhecido no restante do Brasil como “pirarucu”. Esta espécie possui ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo no Peru, Colômbia, Equador, Guiana e no Brasil nas bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia, em ambientes naturais (Arantes, 2009; Goulding et al. 2003; Hrbek et al. 2005). Entretanto, ocorre também em várias partes do mundo e em várias outras bacias brasileiras como espécie introduzida. É a espécie de água doce que apresenta o maior porte, podendo atingir até 200 Kg de massa corpórea e até quatro metros de comprimento (Castello, 2004; Chu-Koo et al. 2009; Nelson et al. 2016; Roubach et al. 2003).

Apresenta rusticidade, rápido crescimento e ganho de peso, chegando a 10 kg já no primeiro ano, podendo ser cultivado tanto em tanques escavados, de cimento ou em açudes, apresentando excelente qualidade de carne, sem espinhos e boa aceitação pela população (Bard & Imbiriba, 1986; Brandão et al. 2006; Imbiriba, 2001). Esta espécie pode se adaptar a diferentes tipos de águas da região amazônica (água branca, água preta e água clara), mesmo considerando as particularidades relacionadas a pH e condutividade elétrica (Junk, 1983; Sioli, 1967).

Diferentemente da maioria dos peixes teleósteos, que possuem apenas respiração branquial, *A. gigas* apresenta também uma bexiga natatória modificada, altamente vascularizada que possibilita a captura do ar atmosférico, funcionando assim como um pulmão primitivo nesta espécie (Sawaya, 1946), sendo a respiração aérea obrigatória, responsável por 78% do oxigênio consumido. Por outro lado, a maioria da excreção do gás carbônico (de 63 a 85%) é realizada diretamente através das brânquias (Brauner & Val, 1996), Tais características aparentam ser de vital importância, tendo



em vista que esta espécie vive em ambientes de águas quentes, entre 24 a 31 °C, com baixo teor de oxigênio dissolvido (Brandão et al. 2006; Cavero et al. 2003; De Andrade et al. 2007; Henderson, 1999), aspecto evolutivo que pode estar relacionada aos baixos níveis de oxigênio encontrado nas águas amazônicas (Queiroz, 2000).

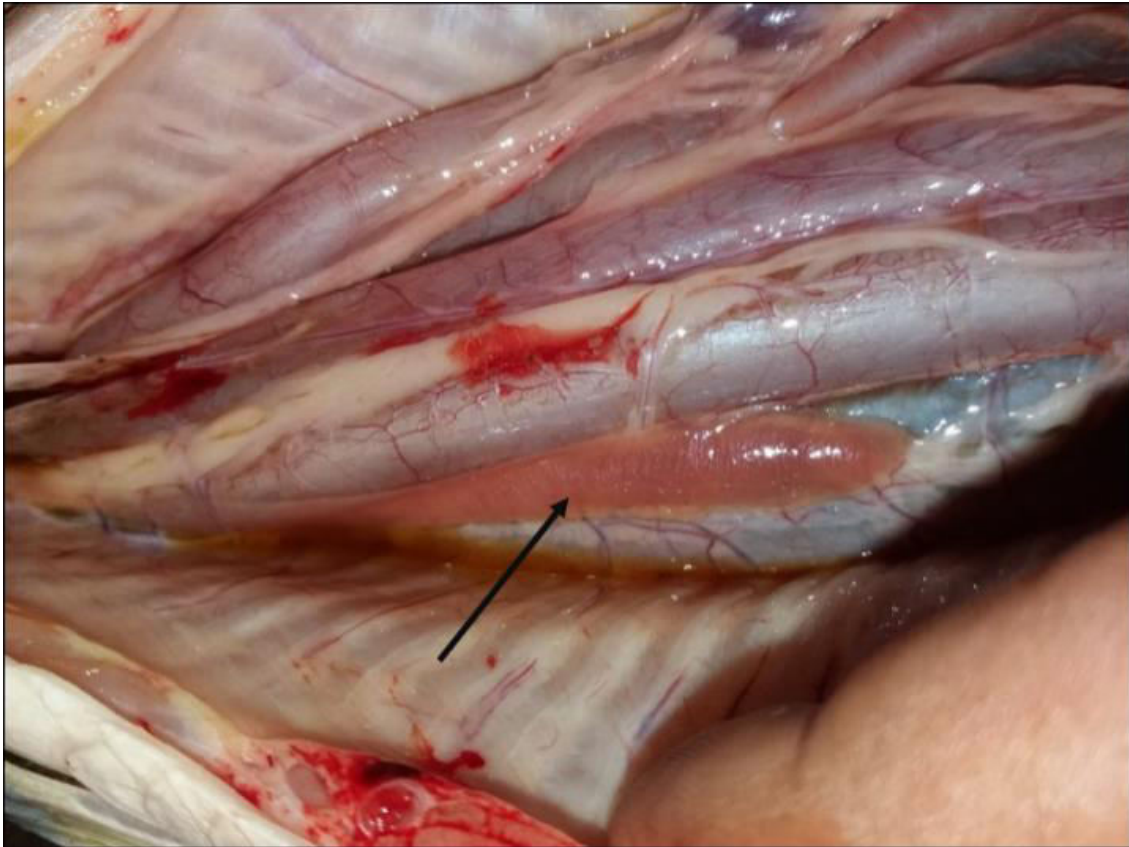
Possui hábito alimentar primariamente piscívoro na fase adulta (Queiroz, 2000; Watson et al. 2013). Nada lentamente ou fica à espera de suas presas para captura mediante pressão negativa, realizada com a oclusão das membranas do opérculo e um forte movimento de sucção com a boca (Fontenele, 1948; Pinese, 1996). Alimenta-se preferencialmente de caracóides e loricarídeos, mas também de espécies de pequeno porte, moluscos, crustáceos e insetos (Oliveira et al. 2005; Queiroz, 2000). Entretanto, mesmo sendo carnívora, a espécie apresenta dentes cônicos diminutos nos maxilares e a apreensão da presa ou alimento é auxiliada pela presença de placas dentígeras na região do palato, em conjunto com a língua óssea (Fontenele, 1948, Watson et al. 2013). Assim, como predador, o pirarucu se encontra no nível trófico mais alto de uma cadeia alimentar (Imbiriba, 2001). Devido ao hábito carnívoro, existem registros sobre a sua introdução, em diferentes barragens do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), com o objetivo de controlar populações de piranhas e pirambeba que proliferavam descontroladamente nos açudes nordestinos na década de 60 (Fontenele & Vasconcelos, 1982).

*A. gigas* vive preferencialmente em áreas de planície alagadas (**Figura 6**), apresentando comportamento sedentário (McConnell & Lowe-McConnell, 1987; Queiroz, 2000). Seu padrão de dispersão é em média 13,7/Km por ano (Queiroz, 2000), com deslocamento em linha reta variando entre 3,9 a 64,2 Km. Apresenta dimorfismo sexual apenas quando adulto, no período da reprodução, quando o macho apresenta uma coloração escura na parte superior da cabeça até o início da nadadeira dorsal, enquanto as laterais do corpo, o ventre e a região caudal adquirem coloração avermelhada. Por outro lado, as fêmeas apresentam coloração castanho claro e são maiores e mais pesadas que os machos (Fontenele, 1953).



**Figura 6:** Local de coleta de 11 exemplares de *Arapaima*, lago as margens do rio Javaé, rio circundante do lado direito da Ilha do Bananal, Fazenda Aruanã, Lagoa da Confusão, TO, outubro de 2016.

Diferente de muitos peixes teleósteos que apresentam dois ovários ou dois testículos funcionais, *A. gigas* possui dois testículos, mas apenas o testículo esquerdo mostra funcionalidade, enquanto o direito é atrofiado (Imbiriba, 2001). Por sua vez, nas fêmeas ocorre apenas um ovário, situado na cavidade abdominal em posição latéro-mediana esquerda (**Figura 7**). Esta espécie apresenta ainda comportamento reprodutivo complexo, com construção de ninhos e cuidado parental com os filhotes (Monteiro et al. 2010). Enquanto alguns autores afirmam que a espécie não apresenta canibalismo (Bard & Imbiriba, 1986; Fontenele, 1948), outros sugerem que em um ambiente com escassez de zooplâncton para alimento pode ocorrer um significativo canibalismo entre pós-larvas (Ono et al. 2004). Realiza desovas parceladas produzindo em torno de 11.000 alevinos por desova (Bard & Imbiriba, 1986; Fontenele, 1948; Ono et al. 2004). Entretanto a quantidade de ovócitos/ovos presentes em fêmeas adultas de pirarucu pode ser muito maior, já tendo sido registrado até 636.000 ovócitos (Fontenele, 1953; Queiroz, 2000; Saint-Paul, 1986).



**Figura 7:** Foto de ovário de fêmea de *Arapaima*, setor Panta Leão, Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé – AM, outubro de 2017.

O período reprodutivo dos pirarucus na Amazônia está relacionado ao ciclo de chuvas da região, com picos entre os meses de outubro-março na Amazônia Central e entre janeiro-maio na Amazônia Oriental (Queiroz, 2000). Ocorre em locais de pouca profundidade, variando de 0,8m a 1,0m (Fontenele, 1953) até 2,0m dependendo da firmeza do substrato (Ono et al. 2004). O aumento do nível da água com o aumento das chuvas pode provocar variações no pH, influenciando o processo de maturação gonadal, algo semelhante ao que acontece com outros peixes amazônicos (Imbiriba, 2001). Na bacia Tocantins-Araguaia, próximos a Ilha do Bananal, em coleta realizada no presente estudo, foi capturada uma fêmea prestes a desovar, no mês de janeiro. Segundo os pescadores, nessa região os pirarucus começam a desovar em dezembro e finalizam a desova em março, quando já pode ser observado o casal nadando junto às larvas e/ou pequenos alevinos.

Os ninhos de pirarucus são construídos em ambiente de fundo argiloso e sem vegetação, apresentam forma esférica, com aproximadamente 0,2m de profundidade por 0,5m de diâmetro (Ono et al. 2004). Após a desova, os machos depositam o líquido seminal sobre os óvulos para fertilizá-los e, após a eclosão, as larvas ainda permanecem

por cinco dias no ninho até a absorção completa da vesícula vitelina (Fontenele, 1948; Bard & Imbiriba, 1986). Inicialmente, acreditava-se que existia a formação de casais apenas monogâmicos (Monteiro et al. 2010). Todavia Farias et al. (2015), analisando populações em cenários de cativo, seminaturais e naturais, constataram que essa relação nem sempre é só monogâmica, visto que entre os filhos de um dado casal ocorriam alguns indivíduos que eram filhos de outro macho. Também é sugerido que enquanto os machos se envolvem muito mais com o cuidado com a prole por até 3 meses, as fêmeas após um mês, deixam a prole e o macho, para se reproduzir novamente com outros machos durante a mesma temporada de reprodução (Du et al., 2019).

*A. gigas*, representa atualmente uma das espécies com maior potencial para a aquicultura (Ono, 2007), uma vez que possui carne de alta qualidade, com coloração levemente rosada, textura firme com baixo teor de gordura (<5%) (Fogaça et al. 2011), sendo considerada como o “bacalhau brasileiro” pelo sabor e aparência (Fontenele & Vasconcelos, 1982; Imbiriba, 2001). Entretanto, um dos grandes problemas que impedem a expansão da criação de pirarucus no Brasil é a não disponibilidade de espécimes juvenis no mercado. Essa falta, em muitos casos, é consequência de problemas de infraestrutura ou de conhecimentos sobre os cuidados necessários com as pós-larvas e juvenis, o que ocasiona taxa de sobrevivência inferior a 20% ou mesmo a perda total da produção (Ono, 2007). Assim, é evidente que um aumento de conhecimento sobre a fisiologia, ecologia e genética do pirarucu é essencial para a melhoria da produção (Ono et al. 2004; Soares & Noronha, 2007).

O pirarucu, juntamente com diversas outras espécies de peixes, tem apresentado diminuição da diversidade genética e declínio populacional em consequência da perda de habitats naturais e da sobre-exploração comercial (Allan et al. 2005; Castello et al. 2011). Em alguns países vizinhos, como o Peru, bem como no nordeste brasileiro, já foram realizadas iniciativas de repovoamento em ambientes naturais (Bardach et al. 1972; Fontenele & Vasconcelos, 1982), o que entretanto, pode trazer consequências no tocante a variabilidade genética da espécie. As iniciativas que visam a proteção e conservação do pirarucu no Brasil ainda são escassas, apesar de normativas do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) impedindo o abate de espécimes com comprimento inferior a 150 cm. Entretanto, tais portarias são frequentemente burladas por pescadores, colocando em risco a continuidade desta espécie. O Decreto Estadual 34.100/2013 proíbe a pesca e

comercialização do pirarucu no Estado do Amazonas, exceto para animais cultivados em cativeiro, devidamente registrados e com origem comprovada. Mesmo a nível internacional, *A. gigas* ainda recebe pouca atenção relacionada à proteção e conservação. Praticamente não existe informações na Lista Vermelha para espécies ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza (IUNC, 1996) sobre *A. gigas*. Entretanto esta espécie, juntamente com *Scleropages formosus* e *Scleropages inscriptus* são os únicos Osteoglossiformes que em 2017 aparecem listados no apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagem em Perigo de Extinção (CITES, 2017).

#### **1.4.2.2. *Heterotis niloticus* (Cuvier, 1829)**

*H. niloticus* pode atingir tamanho próximo de 100 cm e, como os demais Arapaimidae, apresenta também respiração aérea (Nelson, 2006; Nelson et al. 2016). Segundo Moreau (1982), a bexiga natatória é dividida em três partes e se comunica com a faringe, tendo a primeira parte pouco vascularizada e ligada a cabeça e a segunda e terceira partes muito vascularizada, esta última ligada ao rim e formando uma massa esponjosa, vascularizada pela artéria pulmonar e veias cardinais posteriores, permitindo a sobrevivência dos indivíduos em regiões lamacentas com baixo teor de oxigênio e com temperatura até 35 °C. *H. niloticus* é uma das espécies de peixes mais valorizadas na África Ocidental, com ampla distribuição em vários rios e lagos de água doce do continente Africano (Lévêque et al. 1990; Moreau, 1982). Constitui um componente básico na dieta alimentar de vários povos dessa região, com carne dotada de alto teor proteico (Adite et al. 2005). Devido a estas características a espécie foi introduzida em muitos rios, lagos e reservatórios para projetos de aquicultura em várias regiões da África (Monentcham et al. 2009). Esta introdução, contudo, tem configurado desequilíbrios ecológicos em alguns desses ambientes, transformando-se em potencial praga em algumas regiões da África (Froese & Pauly, 2018). Entretanto, ainda são poucas as pesquisas direcionadas visando elucidar as potencialidades dessa espécie para a aquicultura, bem como seus aspectos biológicos (Moreau, 1982; Adite et al. 2005; 2006; Mustapha, 2010). Atualmente encontra-se em declínio em ambientes naturais, possivelmente devido à falta de políticas públicas para preservação e conscientização de sua situação ecológica (Mustapha, 2010). Em alguns desses ambientes, devido a ações antrópicas incluindo poluição por derramamento de óleo e destruição de manguezais, a espécie perdeu 60% de seu habitat, incluindo locais para desovas (Froese & Pauly,

2018). No norte da África, onde costumava ser capturada no alto Nilo egípcio, *H. niloticus* é considerada atualmente extinta, provavelmente em decorrência da represa alta de Assuã (Akinyi et al. 2010).

Os espécimes juvenis são encontrados em lugares pantanosos entre a vegetação aquática, enquanto os adultos vivem nas águas abertas dos rios e lagos, onde podem ser encontrados tanto na zona pelágica como na zona litoral, com tempo de vida estimado entre 5-10 anos (Dankwa et al. 1999; Moreau, 1982). De acordo com Monentcham et al. (2009), *H. niloticus* é classificada como uma espécie onívora, oportunista, consumindo uma variedade de alimentos, desde pequenos organismos bentônicos a peixes, camarões, restos vegetais e insetos terrestres. Por outro lado, Bake & Sadiku (2005) afirmam que *H. niloticus* pode ser considerado predominantemente planctívoro, mas com ampla diversidade e plasticidade trófica.

Três fatores parecem ser essenciais para desencadear o início da reprodução de *H. niloticus*, embora não exclusivos: o aumento do fotoperíodo e, conseqüentemente, da temperatura, o início da estação chuvosa e a diminuição do PH da água, assim como o período reprodutivo pode não estar necessariamente restrito a uma vez ao ano, podendo mudar de época conforme a localidade como, por exemplo, de julho-setembro no rio Níger, setembro-dezembro no rio Nyong, agosto-outubro na bacia do Chade e setembro-outubro no rio Senegal (Moreau, 1982). Semelhantemente ao que ocorre em *A. gigas*, *H. niloticus* também possui uma única gônada localizada no lado esquerdo do corpo (Moreau, 1982; Adite et al. 2006). A maturação ocorre aos dois anos de idade e a razão sexual é de 1/1 (Moreau, 1982). A espécie apresenta cuidado parental, com a construção de ninhos de formato circular e profundidades média de 60 cm para a desova. Quando os ninhos são perturbados ambos os pais carregam os filhotes na boca para uma outra localidade, sendo que tais cuidados seguem do momento do nascimento até os juvenis se dispersarem do ninho (Adite et al. 2005; 2006). Após o nascimento as larvas permanecem juntas com os pais, nadando em cardume. Depois de alguns dias, o cardume de alevinos inicia viagens um pouco mais longe dos pais em busca de alimentos e a partir daí, incursões tendem a se intensificar até os alevinos se desligarem totalmente dos pais (Moreau, 1982).

*H. niloticus* apresenta rápido crescimento (Monentcham et al. 2009) e atinge facilmente 1,0 Kg de peso já no primeiro ano de vida (Dankwa et al. 1999). No entanto, quando criado em regime de cativeiro, onde a disponibilidade de alimento é favorecida, pode atingir 1,0 Kg entre 108 e 220 dias, com ganho de peso variando entre 4,3 a 8,8 g

por dia (Moreau, 1982), ou até mesmo de 3,0 a 4,0 Kg em 12 meses (Monentcham et al. 2009). Entretanto, mesmo diante de tais dados promissores, vários problemas ainda precisam ser solucionados a fim de tornar *H. niloticus* rentável para a aquicultura da África, como conhecimentos mais aprofundados sobre fatores ecológicos, comportamentais e nutricionais que visem solucionar mortalidades maciças que podem ocorrer durante as primeiras fases da vida (Monentcham et al. 2009).

### **1.5. Os peixes como material de estudos evolutivos: biodiversidade e conservação.**

Considerando que os peixes ocupam posição basal na filogenia dos vertebrados, estudos em espécies modelos contribuem significativamente para esclarecer diversas questões relacionadas com a organização do genoma e evolução dos vertebrados como um todo. Particularmente os peixes de água doce constituem um modelo importante para estudos biogeográficos, pois sua evolução pode ser intimamente associada à evolução geológica da Terra (Goldblatt, 1993). Consequentemente, cada continente apresenta uma fauna de peixes de água doce particular, onde os padrões distintos de distribuição são decorrentes de barreiras físicas que interromperam a dispersão de muitas espécies antepassadas, podendo separá-las em espécies distintas (Lundberg et al. 1998; Vari & Malabarba, 1998).

Dentre os vertebrados o grupo dos peixes é considerado o grupo que apresenta maior diversidade, possuindo ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, correspondendo a mais de 50% do total de vertebrados existentes (Nelson et al. 2016). Atualmente existem cerca de 5.196 gêneros com 34.904 espécies válidas, sendo que nos últimos 19 anos foram descritas 7.861 novas espécies (Fricke et al. 2018). Só na região Neotropical, uma das mais ricas e diversificadas do mundo, estima-se que a ictiofauna corresponda a aproximadamente 10% das espécies de vertebrados conhecidas (Albert & Reis, 2011; Mcconnell & Lowe-Mcconnell, 1987; Vari & Malabarba, 1998).

A grande diversidade dos peixes Neotropicais pode estar relacionada à dinâmica das bacias hidrográficas durante a moldagem geológica da América do Sul. Lundberg et al. (1998), afirmam que o grande evento de formação dos Andes, influenciou diretamente na definição dos cursos dos rios da América do Sul, proporcionando incursões e regressões marinhas que proporcionaram vários eventos de vicariância, bem como da combinação de fauna entre vários rios desse continente. Por exemplo, a combinação das faunas com o estabelecimento do fluxo oeste-leste do Amazonas-Orinoco no fim do Mioceno pode representar um grande enriquecimento da

biota. Paralelamente, a emergência de novas terras no Norte da América do Sul e da América Central, possivelmente também proporcionou o aumento da biota Neotropical, à exemplo do isolamento dos sistemas de drenagem periférico do Sul (rio Paraná), Oeste (rio Amazonas) e Norte (rio Orinoco), que deu oportunidade para o aumento das divergências alopátricas, bem como para a extinção de algumas espécies de peixes tropicais com ampla distribuição.

Entretanto toda essa biodiversidade encontra-se ameaçada, tendo em vista que as atividades humanas têm afetado muito o ambiente, ameaçando a manutenção da biodiversidade nativa e a auto regulação dos ecossistemas (Azevedo-Santos et al. 2017; Karam-Gemael et al. 2018; Pelicice et al. 2017).

Segundo Myers & Knoll (2001), estamos vivendo em uma época de altíssimas taxas de extinção de espécies. Estimativas prévias já indicavam que em torno de 300 espécies de peixes seriam extintas no prazo de 20-30 anos (Stiassny, 1999). Entretanto Woodruff (2001), considera que os índices são ainda mais alarmantes, estimando que de 3.000 a 30.000 de um total de 10 milhões de espécies podem estar sendo extintas por ano, em decorrência da pesca excessiva, retirada de água, perda e degradação de habitat, poluição, introdução de espécies exóticas e não nativas. Desta forma, a conservação surge como uma prioridade a nível global em busca de amenizar todos esses impactos (Mustapha, 2010). Ao estabelecer prioridades de conservação, os índices que representam a quantidade de divergência genética, juntamente com as relações filogenéticas, são considerados ótimas ferramentas para tal fim (Mace et al. 2003). Nesta perspectiva, a conservação visa proteger e preservar 3,5 bilhões de anos de história que moldaram a grande diversidade genética hoje existente (Eisner et al. 1995).

De acordo com Woodruff (2001), o sucesso evolutivo de uma espécie está associado intimamente com sua variabilidade genética, visto que a evolução atua com base na diversidade (Hughes et al. 2008; Woodruff, 2001). Por sua vez, a diversidade genética é influenciada diretamente pelo tamanho populacional que varia de acordo com as taxas de natalidade e mortalidade, migração e fluxo gênico entre as populações (Klug et al. 2012). Assim, em populações pequenas onde a taxa de endogamia é alta, altas taxas de homozigose tendem a reduzir a diversidade genética (Frankham et al. 2008; Woodruff, 2001). A popularização de técnicas moleculares que estimam a variabilidade genética através de polimorfismos de DNA tem proporcionado avanços em estudos de genética de populações e filogeografia (Antunes et al. 2010; Moresco et al. 2013). Estes marcadores constituem ferramentas essenciais para estimar parâmetros como



diversidade genética e fluxo gênico das populações (Awise & Hamrick, 1996; Woodruff, 2001). Atualmente são empregadas diversas técnicas para estudo da diversidade genética, usando tanto marcadores de DNA mitocondrial quanto de DNA nuclear. Por sua vez, algumas sequências gênicas do DNA mitocondrial, como a do citocromo C oxidase subunidade I (COI), tem sido o marcador mais utilizado para a identificação de espécies (Hajibabaei et al. 2007; Hebert & Gregory, 2005). Outros marcadores também muito usados, devido principalmente à facilidade, baixo custo e alta sensibilidade, são os do tipo microssatélite SSR (repetições de sequências simples), os quais são utilizados em abordagens de genética de populações e filogeografia (Bornet & Branchard, 2004; Frankham et al. 2008; Luque et al. 2002; Moresco et al. 2013), identificação de peixes híbridos (Almeida-Ferreira et al. 2011; Bignotto et al. 2009; Hashimoto et al. 2012; 2014), variabilidade genética populacional, fluxo gênico e migração (Accioly et al. 2012; Antunes et al. 2010; Ferreira et al. 2017; Gupta et al. 2013; Moresco et al. 2013; Zhang et al. 2017).

Mais recentemente, análises de diversidade genética tem sido realizadas com métodos como genotipagem por sequenciamento de nova geração (GBS), que tem permitido a obtenção de resultados promissores em análises filogenéticas, de diversidade genética e seleção genômica em diversos organismos (Brandolini et al. 2016; Resende et al. 2012; Sánchez-Sevilla et al. 2015; Steane et al. 2011). Entre os protocolos utilizados para realizar a GBS, a abordagem DArT-seq (Diversity Array Technology Sequencing) combina um método de redução de complexidade do genoma, visando predominantemente genes ativos e sequências de número reduzido de cópias e envolvendo plataformas de sequenciamento de nova geração (Jaccoud et al. 2001). O método DArT permite a detecção simultânea de milhares de polimorfismos de DNA resultantes de alterações de base única e pequenas inserções e deleções (InDels), marcando a presença ou ausência de fragmentos de DNA em representações genômicas geradas a partir de amostras de DNA genômico por um processo de redução da complexidade (Jaccoud et al. 2001). Diferentes de outras plataformas de genotipagem de SNP existentes, as plataformas DArT não se baseiam em informações de sequência pré-determinadas. Além disso, uma vez que os marcadores obtidos por essa técnica são enriquecidos para regiões hipometiladas do genoma, principalmente regiões ativas são recuperadas. Com isso, é possível detectar regiões do genoma que podem estar sob o efeito de pressões seletivas.

Ao lado da biologia molecular, a citogenética vem também contribuindo significativamente para a análise da biodiversidade (Cioffi & Bertollo, 2012), possibilitando o mapeamento de diferentes tipos de sequências nucleotídicas nos cromossomos, identificação de cromossomos inteiros, regiões cromossômicas e hibridização genômica comparativa entre as espécies (zoo-fish). De fato, a citotaxonomia tem possibilitado a identificação de espécies crípticas, a exemplo do que ocorre entre os peixes da família Erythrinidae (Bertollo et al. 2000; Cioffi et al. 2012; Moreira-Filho & Bertollo, 1991), assim como grupos apresentando macroestrutura cariotípica heterogênea, com variações cromossômicas tanto numéricas como estruturais, ao lado de outros com padrão mais homogêneo e conservado (De Oliveira et al. 2015; Galetti et al. 1994).

Pelo fato de apresentarem a maior biodiversidade entre os vertebrados, os peixes constituem um grupo extremamente atraente para o estudo de uma série de questões evolutivas. Tem sido sugerido que toda essa diversidade possa ser decorrente de mudanças genéticas possivelmente mais rápidas no genoma dos peixes do que em outros grupos de vertebrados (Amemiya et al. 2013; Bian et al. 2016, Brawand et al. 2015; Ravi & Venkatesh, 2008). Os peixes apresentam características intrínsecas que podem estar influenciando diretamente na grande diversidade observada, como variação no conteúdo de DNA (Gregory, 2005), ocorrência de poliploidia (Cioffi et al. 2015; Kumar et al. 2013; Saenjundaeng et al. 2018), de diferentes sistemas de cromossomos sexuais (Bertollo, 2007; Carvalho et al. 2017; Cioffi et al. 2011; 2017; De Freiras et al. 2018; Kavalco et al. 2016; Komissarov et al. 2018; Sember et al. 2018; Yano et al. 2016) e a ocorrência de cromossomos Bs (De Oliveira et al. 2015; Moreira-Filho et al. 2004; Utsunomia et al. 2016). Além da poliploidização, vários eventos de duplicações gênicas independentes ocorreram entre os peixes, há evidências substanciais de que um evento antigo de duplicação do genoma (tetraploidização) esteja relacionado com a diversificação de funções dos genes e especiação em várias linhagens (Zhang et al. 2002).

#### **1.6. Os DNAs repetitivos na constituição genômica dos peixes: enfoque nos Osteoglossiformes**

O genoma dos eucariotos apresenta uma grande variação no conteúdo de DNA que, em muitos casos, não apresenta relação direta com a complexidade dos organismos, nível de ploidia e quantidade de genes (Gregory, 2005). Esta variação é

devida principalmente pelo acúmulo de DNAs repetitivos (Petrov, 2002), formado por sequências espalhadas, ou organizadas em tandem no genoma (Sumner, 2003; Wicker et al. 2007). A princípio por não se saber sua real função, esta classe de DNA foi considerada “DNA lixo” (Biémont, 2008; Biémont & Vieira, 2006). Entretanto, há hoje boas evidências de que este tipo de DNA participa da organização estrutural e funcional do genoma, atuando na replicação, reparo do DNA, rearranjo cromossômico, segregação cromossômica, regulação gênica, podendo também estar possivelmente correlacionado com algumas doenças (Biémont & Vieira, 2006, Shapiro & Von Sternberg, 2005).

A maior parte do genoma dos peixes apresenta-se constituída de DNAs repetitivos, representados por muitos tipos específicos na região heterocromática e usualmente organizados em tandem (Cioffi & Bertollo, 2012; De Oliveira et al. 2015; 2018; Sember et al. 2018; Utsunomia et al. 2016). Existem indícios bem documentados que elementos transponíveis e sequências correlacionadas em organismos eucariotos correspondem a mais de um terço do genoma, em mamíferos, por exemplo, essas sequências podem corresponder de 30% a 50% do genoma, com valores ainda mais altos para plantas e anfíbios (Charlesworth et al. 1994).

Avanços no conhecimento da organização cromossômica de distintas sequências de DNA têm mostrado que elas desempenham um papel importante na organização estrutural e funcional dos genomas (Biémont & Vieira, 2006; Schueler et al. 2001). Pesquisas citogenéticas relacionadas ao genoma dos peixes têm focado a distribuição de sequências repetitivas como, por exemplo, os DNAs microssatélites geralmente situados nas regiões de heterocromatina, nos centrômeros e nas regiões teloméricas dos cromossomos. Paralelamente, o mapeamento cromossômico de sequências de DNAs ribossomais e satélites tem fornecido informações importantes sobre a estrutura, funcionamento e evolução do genoma não só dos vertebrados em geral, como também particularmente dos peixes no que se refere aos cromossomos B e sexuais (Biémont & Vieira, 2006; Carvalho et al. 2017; Cioffi et al. 2011; 2017; De Freitas et al. 2018; Kavalco et al. 2016; Motta-Neto et al. 2018; Saenjudang et al. 2018; Sember et al. 2018).

Segundo (Biémont & Vieira, 2006; Tautz & Renz, 1984), muitas pesquisas citogenéticas no genoma dos peixes envolvem o estudo destas sequências repetitivas encontradas no genoma, na atualidade, contam com o auxílio da FISH que tem contribuído significativamente com a evolução da citogenética em peixes, utilizando

sondas de diferentes tipos de DNAs de famílias multigênicas, de rDNAs, de DNAs satélites, DNAs microssatélites e DNAs teloméricos, estes estudos tem apresentado resultados importantes na busca por explicações de diferentes eventos evolutivos ocorridos em diferentes espécies desse grupo de vertebrados (Cioffi & Bertollo, 2012; Sochorová et al. 2018; Ocalewicz, 2013; Symonová & Howell, 2018).

Nos últimos anos a aplicação de ferramentas de citogenética molecular avançada têm sido crescentes em estudos realizados em peixes. Especificamente, Hibridização Genômica Comparativa (CGH) e a pintura cromossômica total (WCP) ganharam um destaque na resolução de várias questões no campo da citogenética comparativa, permitindo acesso a uma série de questões evolutivas (Barby et al. 2019). Tais metodologias têm sido utilizadas para a investigação da divergência genômica entre espécies relacionadas, com o intuito de esclarecer suas relações evolutivas (Barby et al. 2019; Sember et al. 2018).

Além do emprego de técnicas de citogenética molecular, o sequenciamento de nova geração (NGS - Next Generation Sequencing) começa a ser também intensificado entre os peixes, visando responder importantes questões, a exemplo daquelas relacionadas com a diferenciação sexual e de cromossomos B, resposta ao stress e identificação de genes associados ao crescimento e metabolismo (Bian et al. 2016; Biscotti et al. 2016; Forconi et al. 2013; Li et al. 2016; Prado-Lima & Val, 2015; Utsunomia et al. 2016; Watanabe et al. 2018). Tal abordagem tem gerado uma grande quantidade de informações sobre sequências nucleotídicas, disponibilizadas em bancos de dados públicos e possibilitado, por exemplo, o mapeamento de genes a partir da anotação de genomas e transcriptomas.

Entre os Osteoglossiformes, Bian et al. (2016) utilizou o NGS para analisar o transcriptoma entre variedades da espécie *Scleropages formosus* (aruanã) identificando quantidades distintas de genes expressos de acordo com as variantes analisadas, ou seja: 22.016 genes no aruanã dourado, 21.256 genes no aruanã vermelho e 21.524 genes no aruanã verde. Já Watanabe et al. (2018), montando o transcriptoma de fígado e de pele de *Arapaima gigas*, identificou 20.219 genes transcritos, um total de 9.551 no fígado e 16.818 na pele. A grande quantidade de genes expressos mais intensamente na pele, tanto em machos quanto em fêmeas, foram os elementos transponíveis (tcb1 e tf2-1), indicando que eles são transcricionalmente ativos na pele de *Arapaima* (Watanabe et al. 2018). Foram também registradas altas quantidades de elementos transponíveis nos genomas de três variedades de *S. formosus*, correspondendo a 27% no aruanã dourado,

27% no aruanã vermelho e 28% no aruanã verde (Bian et al. 2016; Li et al. 2016). Por sua vez, Vialle et al. (2018) baseado na montagem do genoma de *A. gigas*, conseguiu prever um total de 24.655 genes codificadores para proteínas, proporcionando contribuições importantes para o conhecimento dos processos genéticos e evolutivos que acometem o genoma dos peixes.

Além de localizações de sequências gênicas específicas, identificação de rearranjos cromossômicos, mapeamento de DNAs repetitivos e análises de evolução cromossômica, a grande quantidade de dados gerados pelos sequenciamentos NGS, atualmente permite prever e analisar diferentes cascatas gênicas em diferentes tipos de tecidos e células, que estão ligadas a distintos processos fisiológicos, de reprodução e ecológicos em diferentes espécies de peixes (Bian et al. 2016; Biscotti et al. 2016; Hrbek & Farias, 2008; Vialle et al. 2018; Watanabe et al. 2018).

### **1.7. Investigações genéticas e citogenéticas em Arapaimidae**

Nas duas últimas décadas, ocorreu um aumento nas pesquisas sobre a diversidade genética de populações de *Arapaima gigas*, possibilitando avanços sobre a constituição e diversidade genética e ecologia dessa espécie, melhorando a avaliação do seu status na natureza e a elaboração de estratégias para seu manejo e conservação (Araripe et al. 2013; De Almeida, 2012; Farias et al. 2003; Hamoy et al. 2008; Hrbek et al. 2005; Hrbek & Farias, 2008; Vitorino et al. 2015; 2017).

Os índices de fixação molecular ( $F_{ST}$ ) obtidos para as populações de *Arapaima* tanto da região da bacia Amazônica, quanto da bacia Tocantins-Araguaia, indicam estruturação populacional ( $F_{ST} > 0.25$ ) (Hrbek et al. 2005; 2007; Araripe et al. 2013; Vitorino et al. 2015; 2017). De acordo com Wright (1978), o índice de diferenciação genética entre populações pode variar de 0-1, sendo que para populações naturais valores  $F_{ST} > 0.25$  indicam diferenciação genética muito alta. Adicionalmente, para as populações da bacia Tocantins-Araguaia dados do teste de Mantel ( $r = 0,646$ ;  $p > 0,05$ ) indicaram que, além da distância geográfica, outros fatores como eventos de gargalos populacionais que reduziram acentuadamente o tamanho das populações podem estar contribuindo para a alta diferenciação genética interpopulacional (Vitorino et al. 2015). A fragmentação, redução de habitat e isolamento de populações são fatores que influenciam diretamente na diminuição do fluxo gênico, impactando fortemente o aumento da diferenciação genética (Allendorf & Luikart, 2007). Populações de *A. gigas*

de diferentes locais da bacia Amazônica mostram baixo fluxo gênico entre elas e o consequente aumento da diferenciação genética interpopulacional (Hrbek et al. 2005).

Quatro populações da bacia Tocantins-Araguaia foram analisadas quanto à diversidade genética, utilizando-se cinco pares de primers para marcadores microsatélites do tipo ISSR por Vitorino et al. (2015). As inferências Bayesianas e análises por agrupamento separaram as populações em três grandes grupos Araguaiana, MT, São Félix do Araguaia, MT, Novo Santo Antônio, MT e Itupiranga, PA, sem correlação direta entre distância geográfica e distância genética. Os marcadores ISSRs foram eficientes para determinar a diversidade genética e evidenciando que as populações de *A. gigas* da bacia Tocantins-Araguaia se encontram estruturadas, são endogâmicas e apresentam baixa diversidade genética. Estas características podem ser consequência da sobre-exploração e perda de habitat, restringindo as populações a refúgios isolados com baixos valores de heterozigosidade e aumento de endogamia devido ao isolamento das populações, comportamento sedentário e preferência por hábitos lênticos. Foi também evidenciada a diminuição gradual da diversidade genética de *A. gigas* a montante no rio Araguaia em relação à foz com a bacia Amazônica, indicando maior isolamento e diminuição do fluxo gênico entre as populações da bacia Tocantins-Araguaia em relação às populações da bacia Amazônica (Vitorino et al. 2015). Entretanto, esses resultados diferem um pouco de trabalhos já realizados anteriormente (Hrbek et al. 2005, Hrbek et al. 2007; Araripe et al. 2013), que também identificaram certa estruturação populacional em populações da bacia Amazônica, mas com alto fluxo gênico. Neste caso, a variabilidade hidrológica existente entre as duas bacias pode estar contribuindo com a diferenciação genética interpopulacional encontrada. Neste sentido, a região da bacia Amazônica apresenta ciclos de inundação e vazão mais longos permitindo a migração dos pirarucus por um período mais prolongado, processo conhecido como migração lateral (Castello, 2008). Por sua vez, a bacia Tocantins-Araguaia apresenta duas estações bem definidas (seca e úmida) controlando a vazão de água e sua variação nos rios e nas planícies alagáveis. Durante os períodos de seca os lagos pertencentes às planícies alagáveis perdem a conexão com o rio e outros lagos, isolando populações, reduzindo amplamente o fluxo gênico, aumentando a endogamia, diminuindo a diversidade genética intrapopulacional e aumentando as diferenças interpopulacionais.

Entretanto, essas características devem ser mais bem exploradas, na tentativa de entender se realmente as regulações do ciclo hidrológico estão influenciando ou não

o fluxo gênico. Na realidade, considerando que o período reprodutivo das populações de *Arapaima* na região da bacia Tocantins-Araguaia acontece entre dezembro e março, nesse momento é bastante comum as águas já terem aumentado nessa região e os lagos já estarem conectados entre si e com os rios. Assim sendo, alguma outra característica que talvez possa ser melhor investigada é a monogamia na espécie. Até que ponto esse comportamento poderia estar influenciando na diminuição da diversidade genética entre as populações de *Arapaima*? Entretanto, as ameaças à integridade das populações de *Arapaima* não estão restritas à fragmentação, perda de hábitat e sobre-exploração. Castello & Stewart (2010), consideram que este grupo sofre também ameaças quanto à sua integridade genética pela transposição de espécimes utilizados na piscicultura de uma região para outra, muitas vezes por centenas ou mesmo milhares de quilômetros, o que pode homogeneizar o patrimônio genético ou mesmo eliminar possíveis raças localmente adaptadas. Neste sentido constatamos durante nossos estudos que espécimes originários da bacia Amazônica estão sendo utilizados por piscicultores presentes na bacia Tocantins-Araguaia.

Recentemente Torati et al. (2019), utilizando marcadores RAD-tags, analisaram cinco populações de *A. gigas* da bacia Amazônica e Tocantins-Araguaia, identificando 392 SNPs informativos, o que representa um percentual considerado baixo quando comparado com outros teleosteos, apenas 2,3%. Utilizando dados de estatística sumária para inferir sobre a estrutura das populações, esses autores observaram que as populações estão estruturadas em dois grupos: um englobando os rios Solimões e Amazonas e um outro grupo para o rio Araguaia e um terceiro grupo compreendendo uma zona híbrida na região do rio Tocantins, apresentando índices de diversidade genética variando de alto na populações da bacia Amazônica, intermediário no rio Tocantins e baixo no rio Araguaia. Por fim estes autores sugeriram que os índices intermediários e baixos são reflexos de certo grau de endogamia, devido à diminuição dos estoques de populações naturais nestas regiões mais urbanizadas que as demais regiões da bacia Amazônica e podem estar sendo influenciados pelo comportamento sedentário característico para esta espécie.

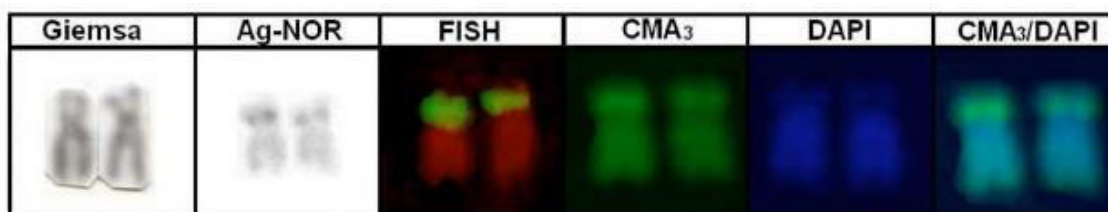
O sequenciamento completo do DNA mitocondrial de *A. gigas*, indicou que o comprimento total desse genoma é de 16.433 pb, com 13 genes codificadores de proteínas, dois genes de RNAr e 22 genes de RNAt. Foi também evidenciada sua estrutura comum à dos vertebrados com a presença de códons e composição de bases, apresentando uma região de controle atípica curta com 767 pb e ainda uma região

conservada ATGTA, semelhantemente a outras regiões controles já publicadas para Osteoglossiformes (Hrbek & Farias, 2008). Analisando o genoma de *A. gigas* utilizando as metodologias BSA (Bulk Segregant Analysis) junto com RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) em busca de sequências sexo-específicas, De Almeida (2012) concluiu que esta espécie não possui um sistema cromossômico para determinação de sexo. Entretanto recentemente foi publicada a primeira versão preliminar do genoma de *A. gigas* (Vialle et al. 2018), utilizando processos de sequenciamento NGS através da plataforma Illumina. Observou-se que o tamanho é de 1,03 Gb, com a fração repetitiva constituindo 21,69% do mesmo. Foram identificados 24.655 genes codificadores de proteínas, com uma média de 9 exons por gene.

Uma segunda anotação do genoma de *A. gigas* foi realizada por Du et al. (2019), esses pesquisadores utilizando sequenciamento (NGS) para genomas de macho e fêmea de *A. gigas* através de análises baseadas em sequências RAD-tag, registraram, o tamanho do genoma de 666Mb e 664Mb para indivíduos macho e fêmea respectivamente, com um percentual de 16,46% constituindo a fração repetitiva do genoma, com boa parte constituída de elementos transponíveis representando um total de 16,21% para machos e 16,77% para fêmeas, já para a fração codificante do genoma foram identificados um total de 26.755 genes, dos quais 21.701 (81,1%) identificados com domínios proteicos conhecidos, além disso foram encontrados sete scaffolds (RAD-tags) macho-específicas, correlacionados com elementos transponíveis (TE) que sugerem a ocorrência de um sistema sexual do tipo XY nesta espécie.

Por sua vez, estudos citogenéticos em Arapaimidae ainda são poucos. Marques et al. (2006) e Da Rosa et al. (2009) analisaram populações de *A. gigas* de diferentes regiões brasileiras (Rio Araguaia – GO, Rio Araguaia – MT e Rio Jamari – RO, respectivamente). Foi evidenciada uma estrutura cariotípica semelhante nessas populações, formada por  $2n=56$  cromossomos, sendo 14 pares meta-submetacêntricos e 14 subtelo-acrocêntricos, sem evidência de cromossomos sexuais heteromórficos entre os sexos. A heterocromatina C-positiva foi observada na região pericentromérica de alguns pares cromossômicos, e sítios Ag-NOR, GC-ricos, localizados na região pericentromérica de um único par de cromossomos. A hibridização com sondas de DNAr 18s/45s evidenciou um pequeno heteromorfismo do tamanho desses sítios entre os cromossomos homólogos (**Figura 8**). Assim, foi evidenciada uma macroestrutura cariotípica semelhante entre as diferentes populações analisadas (Da Rosa et al. 2009).





**Figura 8:** Representação dos diferentes marcadores evidenciados no braço curto do par cromossômico nº 3 do cariótipo de *Arapaima gigas* (Da Rosa et al. 2009).

Nessa perspectiva é importante que uma abordagem cromossômica mais pormenorizada, com a utilização de diferentes procedimentos da citogenética clássica e molecular englobando populações do gênero *Arapaima*, principalmente de localidade diferentes às da bacia Tocantins-Araguaia, bem como de *Heterotis niloticus* seja realizada, a fim de se obter subsídios mais resolutivos para o conhecimento da história evolutiva dos Arapaimidae.

No que se refere a *Heterotis* os estudos citogenéticos ainda são escassos, apenas um único registro para uma população com localidade incerta da África foi realizado por Hirata & Urushido (2000), registrando um  $2n = 40$  com fórmula cariotípica (26m + 10sm e 4a). Hurtado et al. (2013), utilizando lócus de DNAs microsatélites, analisou populações de diferentes bacias hidrográficas e sistemas de várzeas do rio Benim na África Ocidental, constatando altos níveis de diferenciação genética entre as populações, mas baixo nível de diferenciação intrapopulacional, sugerindo que tais características devem ser consideradas nos projetos de manejos realizados com esta espécie em diferentes regiões do continente africano, a fim de preservar a diversidade genética endêmica.

# **Justificativa e objetivos**

## **2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

### **2.1. Justificativa e objetivo geral**

Os Osteoglossiformes oferecem um modelo particular para estudos sistemáticos, biogeográficos e evolutivos. Entretanto, dados informativos e de interesse para estas abordagens, tais como caracteres citogenéticos e genômicos, são ainda deficientes para esta ordem de peixes, impossibilitando caracterizar suas tendências evolutivas do ponto de vista da citogenômica. Parte desta escassez de dados associa-se também à ampla distribuição apresentada pelos Osteoglossiformes, com grupos endêmicos a diferentes continentes, como é o caso da família Arapaimidae, com espécies presentes em diferentes rios e lagos Sul-americanos e Africanos, dificultando um estudo integrativo que possibilite uma visão globalizada do processo evolutivo inerente a este grupo. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi a investigação da evolução cromossômica e da diversidade genética ocorrida na família Arapaimidae, por intermédio da análise de diferentes populações do gênero *Arapaima* e da espécie *Heterotis niloticus* visando uma melhor compreensão dos processos evolutivos que moldaram seus padrões de distribuição atuais, bem como os mecanismos de evolução genômica e cromossômica ocorrido nestas espécies, em consonância com as seguintes propostas investigativas:

#### **A) Evolução cromossômica e inter-relações evolutivas na família Arapaimidae**

Esta proposta visou analisar espécimes de *Arapaima* e *H. niloticus* utilizando procedimentos citogenéticos clássicos e moleculares (bandeamento C, hibridização genômica comparativa (CGH) e mapeamento de sequências repetitivas) destacando características genômicas inter e intraespecíficas, permitindo evidenciar o panorama da evolução cromossômica ocorrida neste grupo. Adicionalmente, as diversidades genéticas nesse grupo através de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram estimadas.

#### **B) Estruturação populacional e filogeografia de *Arapaima***

Distintas populações de *Arapaima*, oriundas das bacias Amazônicas e Tocantins-Araguaia, foram investigadas a fim de se avaliar os padrões da variabilidade genética e cromossômica existentes entre elas. Para isso, abordagens citogenéticas moleculares e análises populacionais foram realizadas usando os SNPs obtidos com o procedimento DarT-Seq. Esses dados permitiram estimar a estrutura populacional

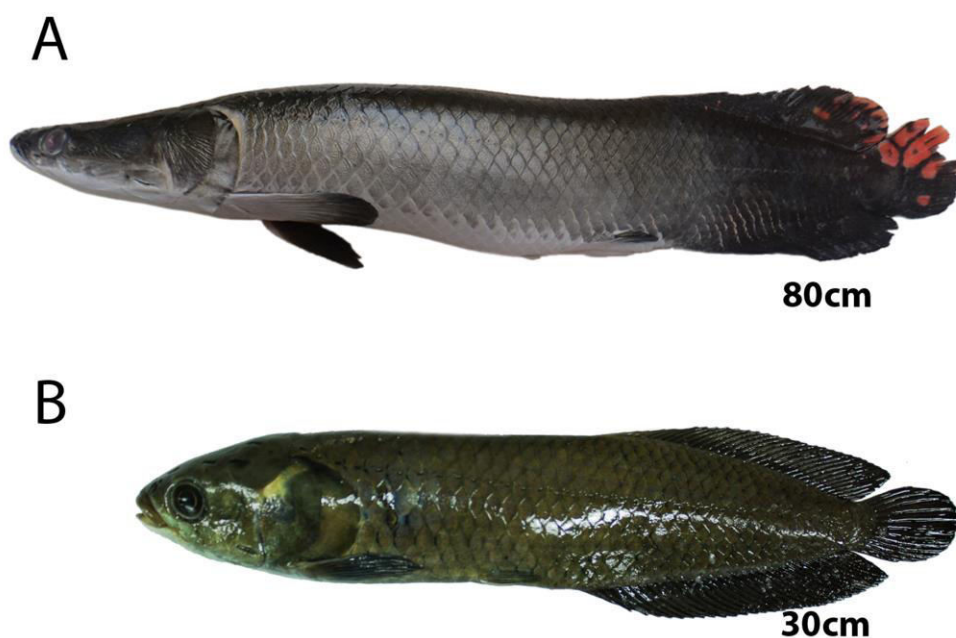
presente nas amostras avaliadas e propiciaram a comparação de modelos demográficos a partir de uma abordagem de aprendizagem profunda (*Deep learning*) para obter informações sobre a história evolutiva deste táxon e reconstruir sua possível história de colonização na América do Sul.

# **Material e Métodos**

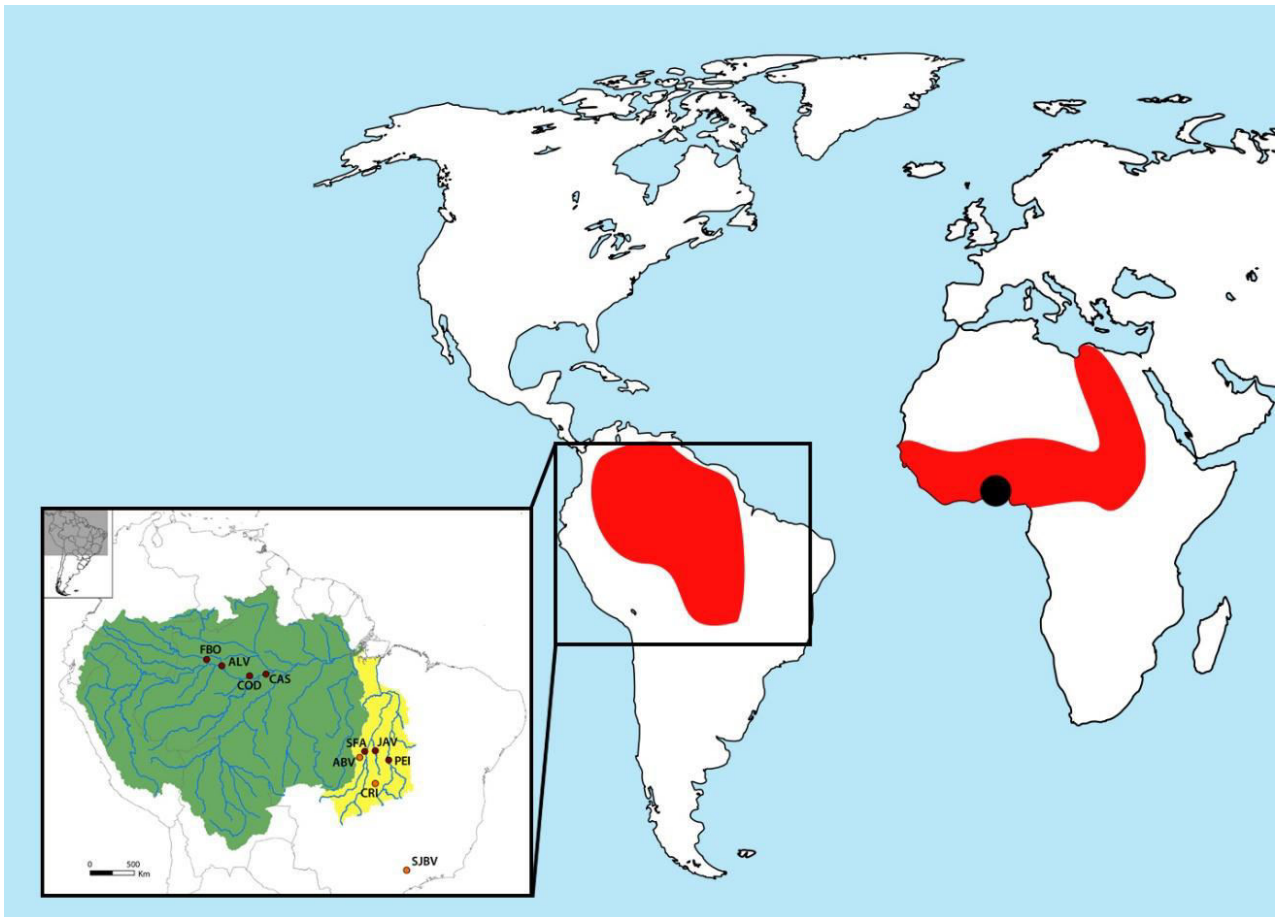
### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Amostragem do material biológico

Foram analisadas populações de *Arapaima* e da espécie *Heterotis niloticus* (**Figura 9**) obtidas de diferentes regiões do Brasil (bacias Amazônica, Tocantins-Araguaia e amostras de pisciculturas) e do continente Africano, conforme especificado na **Tabela 1 e na Figura 10**. As amostras foram coletadas com a autorização do órgão ambiental brasileiro ICMBIO / SISBIO (autorização nº 48290-1).



**Figura 9:** Exemplos de *Arapaima* (A) e *Heterotis niloticus* (B) utilizados no presente estudo.



**Figura 10.** Mapa evidenciando em vermelho a distribuição geográfica dos peixes da família Arapaimidae, *Heterotis niloticus* (círculo preto local de coleta) para o continente africano e espécies do gênero *Arapaima* na América do Sul. Caixa à esquerda ampliando as regiões de ocorrência em ambiente natural para indivíduos do gênero *Arapaima*, com a bacia Amazônica evidenciada em verde e bacia Tocantins-Araguaia em amarelo na América do Sul. Os pequenos círculos evidenciam os pontos de coletas em ambas as bacias e os círculos laranja representam amostragens em pisciculturas, conforme discriminado na tabela 1.

<sup>1</sup> **Tabela 1.** Espécimes da família Arapaimidae investigados, com os respectivos locais de coleta, amostras utilizadas em cada um dos procedimentos, código de identificação da população, bacias hidrográficas, coordenadas geográficas e números de depósitos em museu.

Local de coleta	Amostra submetidas ao procedimento de DarTseq	Suspensões cromossômicas	Código	Bacia	Coordenadas geográficas	Nº de depósito
Rio Oluwa, Nigéria, África	02	04♂04♀	HET	Nig	6°16'60.0"N 4°49'00.0"E	20558
Lago do Castanho, Manaus, AM	03	02♂01♀	CAS	Am	3°42'48.4"S 60°31'11.6"W	123955
Lago Panta Leão, Reserva Mamirauá, Alvarães, AM	14	02?06♂06♀	ALV	Am	2°54'58.1"S 64°49'29.1"W	123953
Lagos do rio Juruá, Setor Mariana, Fonte Boa, AM	10	apenas DNA	FBO	Am	2°19'05.1"S 66°16'39.5"W	-
Lago das Onças, Codajás, AM	10	06♂04♀	COD	Am	3°53'17.1"S 62°07'36.2"W	123954
Lago marginal ao rio Santa Tereza, tributário do rio Tocantins, Peixe, TO.	03	02♂01♀	PEI	To-Ar	11°54'31.7"S 48°38'02.7"W	121642
Lago marginal ao rio Javaés, tributário do rio Araguaia, Lagoa da Confusão, TO	11	03?04♂04♀	JAV	To-Ar	11°00'27.1"S 49°56'01.8"W	121639
Rio Xavantinho, tributário do rio Araguaia, São Félix do Araguaia, MT	05	01?02♂02♀	SFA	To-Ar	11°42'07.2"S 50°50'15.4"W	121643
Piscicultura Liberdade, Uirapuru e Crixás, GO	10	03?03♂04♀	CRI	Pisc	14°05'45.4"S 49°55'18.3"W	121644
Piscicultura do Sr. Roberto, São Félix do Araguaia, MT	03	01♂02♀	ABV	Pisc	11°39'33.1"S 51°26'23.3"W	121641
Piscicultura Rio Doce, São João da Boa Vista, SP	20	05?8♂7♀	SJBV	Pisc	22°01'14.9"S 46°54'08.1"W	121645

**MT = Mato Grosso; GO = Goiás; TO = Tocantins; SP = São Paulo; AM = Amazonas; PA = Pará**



## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Obtenção de cromossomos mitóticos

Foram utilizados dois processos para obtenção dos cromossomos mitóticos, tratamento “in vivo” (Bertollo et al. 2015) e tratamento “in vitro” (Foresti et al. 1993), ambos com algumas modificações, ou seja, mudanças no tipo de tecido utilizado para obtenção cromossômica e adaptação dos tempos de KCl e colchicina para esta espécie.

Tendo em vista que o órgão hematopoiético nesta família não está claro, os animais foram estimulados através do protocolo descrito por Cavallini & Bertollo (1988), a fim de aumentar o índice de divisão mitótica. Porções de diferentes tipos de tecidos (rim, baço, intestino e brânquias) foram obtidos para produção das suspensões cromossômicas. Após as análises, o baço foi o tecido que apresentou a maior quantidade de células em metáfase por lâmina, desta forma foi o tecido utilizado para as posteriores obtenções cromossômicas em *Arapaima*.

No tratamento “in vivo”, os animais foram previamente tratados com solução de colchicina a 0,025% na proporção de 1ml para cada 100 gramas de peso do animal, por intermédio de injeção intra-abdominal e mantidos em aquário aerado durante 40-50 minutos. A seguir foram anestesiados com solução de benzocaína (1g/1000ml), sacrificados e extraídos fragmentos do seu baço. Os fragmentos foram transferidos para uma pequena cubeta contendo 15 ml de solução hipotônica de cloreto de Potássio (KCl) a 0.075M e com o auxílio de uma seringa sem agulha esta solução foi fragmentada com leves movimentos de aspiração e expiração até se obter uma suspensão celular homogênea, depois foi mantida durante 50 a 60 minutos em estufa a 37 °C (no campo à temperatura ambiente). A seguir a suspensão celular foi pré-fixada com dez gotas de fixador, uma mistura (3:1) de álcool metílico e ácido acético glacial respectivamente, depois foi centrifugada a (1000 rpm) por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 15 ml de solução de fixação e centrifugadas por mais duas vezes.

Na técnica de tratamento “in vitro”, os animais foram anestesiados com solução de benzocaína (1g/1000ml), foram sacrificados e porções do seu baço foram retirados e colocados em uma pequena cubeta contendo 15ml de meio de cultura (RPMI 1640), com o uso de pinças e tesouras foram fragmentados, uma seringa sem agulha através de movimentos leves de aspiração e expiração porções do baço foram dissociadas até se obter uma solução celular homogênea, duas gotas de solução de colchicina 0,025% foram pingadas na solução celular, com o auxílio de uma pipeta de

vidro a solução celular foi homogeneizada e mantida na estufa a 37° (em campo à temperatura ambiente) por 20 minutos, depois a solução celular foi centrifugada a (1000 rpm) por 10 minutos, em seguida foi ressuspensa em 15 ml de solução de Cloreto de Potássio (KCl 0.075M) e mantida na estufa a 37° (em campo a temperatura ambiente) por 50 a 60 minutos, posteriormente a solução celular foi pré-fixada com dez gotas de fixador Carnoy I (3:1 metanol/ácido acético), a mistura foi novamente centrifugada a (1000 rpm) e o sobrenadante foi descartado, a solução foi fixada em 15 ml do fixador Carnoy I e novamente centrifugada, esse último passo foi repetido por mais duas vezes.

Lâminas contendo preparações metafásicas foram obtidas conforme o procedimento usualmente utilizado para a metodologia de “air drying”.

Os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Processo no CEUA 1926260315).

### **3.2.2. Estimulação mitótica dos peixes**

Foram injetados intraperitoneal e intramuscular uma mistura contendo, 1 ml de suspensão de levedura (12g de fermento biológico + 12g de sacarose + 100ml de água) para cada 100g de peso do animal adaptado de Cavallini & Bertollo (1988), por um período de 24 à 72 horas, a cada 24 horas os peixes que permaneceram vivos foram reinjetados na mesma proporção.

### **3.2.3. Detecção da heterocromatina C-positiva por Bandamento -C**

Para detecção da heterocromatina C-positiva, seguiu-se o protocolo de Bandamento-C descrito por Sumner (1972), os cromossomos foram corados através do procedimento descrito por Lui et al. (2012), com algumas modificações, principalmente relacionados a padronização do melhor tempo de tratamento com bário e ácido clorídrico para a espécie em estudo.

As preparações cromossômicas foram submetidas à solução diluída de ácido clorídrico (HCl 0,2N) a temperatura ambiente, por 12 minutos, lavadas em água destilada e secadas ao ar. A seguir, o material foi incubado em solução de hidróxido de Bário (Ba(OH)<sub>2</sub> a 5%) a 42°C, durante aproximadamente três minutos, depois as lâminas foram lavadas rapidamente em solução de (HCl 0,2N) e depois em água destilada. Após a secagem ao ar, as preparações foram incubadas com solução salina 2xSSC durante 45 minutos em estufa a 60°C, depois lavadas em água destilada e

novamente secadas ao ar. Os cromossomos foram corados com 20  $\mu$ l da solução antifading e Iodeto de Propídeo 50mg/ml numa proporção de (20 $\mu$ l/0,7 $\mu$ l respectivamente), pingando-se sobre a lâmina, cobrindo com uma lamínula e mantida no escuro por uma hora. Posteriormente as lâminas foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência.

#### **3.2.4. Detecção de bandas cromossômicas GC-ricas**

A coloração dos cromossomos com o corante cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), específico para a detecção de regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC, utilizando como contra corante a distamicina A, seguiu basicamente o protocolo descrito por Schmid, (1980). Foram adicionados 80 $\mu$ l de solução de Cromomicina A<sub>3</sub> sobre cada lâmina e cobriu-se com uma lamínula e foi deixado por 1 hora no escuro, escorreu-se a lamínula e lavou-se a lâmina em água corrente com jatos fortes, esperou-se secar levemente, colocou-se cerca de 80 $\mu$ l de solução de distamicina sobre cada lâmina, cobriu-se com uma lamínula e deixou-se corar por 15 minutos no escuro, escorreu-se a lamínula e lavou-se a lâmina em água corrente, com jatos fortes, deixou-se secar levemente e colocou-se cerca de 15 $\mu$ l de solução de DAPI/antifading sobre cada lâmina, as lâminas foram guardadas na geladeira por no mínimo uma semana para a estabilização do fluorocromo e analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência.

#### **3.2.5. Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs)**

Para detecção das regiões organizadoras de nucléolo (NORs), utilizou-se os procedimentos de Bandamento-NOR, descrito por Howell & Black (1980) com algumas modificações.

Em lâminas contendo cromossomos metafásicos, foi adicionado 100 $\mu$ l de uma mistura proporção de 2:1 de (200 $\mu$ l da mistura de 0,5g de nitrato de prata (Ag NO<sub>3</sub>) dissolvida em 2 ml de Água (H<sub>2</sub>O) destilada + 100 $\mu$ l da mistura de 1g de gelatina sem sabor diluída em 50ml de água destilada a 42°C + 500 $\mu$ l de ácido fórmico). As lâminas foram mantidas em placa aquecedora a 60°C por 2 a 4 minutos, até obterem uma coloração amarelo-queimado, posteriormente foram analisadas em microscópio óptico em aumento de 1000 vezes.

### 3.2.6. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

O DNAg/*Arap* de exemplares de *Arapaima* da população do rio Javaé na bacia To-Ar e *Arapaima* fêmea da Reserva Mamirauá foram marcados com Digoxigenina-11-dUTP usando o kit DIG-nick translation Mix (Roche, Mannheim, Germany) e o DNAg/*Het* da espécie *Heterotis niloticus*, juntamente com espécimes de *Arapaima* macho da Reserva Mamirauá foram marcados com Biotina-16-dUTP usando o kit BIO-nick translation Mix (Roche).

Três experimentos de CGH foram realizados em Arapaimídeos, um comparando os gêneros *Arapaima* e *Heterotis*, outro comparando *Arapaima* das diferentes bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia e por último um experimento comparando indivíduos macho e fêmea do gênero *Arapaima* da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. Para comparação entre os gêneros, foram usados por lâmina 20µl do mix de hibridização contendo 500µg de DNAg de *Arapaima* e 500µg de DNAg de *Heterotis niloticus* ambos marcados e 30µg de Cot<sub>1</sub>-DNA como bloqueio, sendo 15µg diretamente isolados e utilizados para ambas as espécies.

Nas comparações entre as populações de *Arapaima*, foram usados por lâmina 20µl do mix de hibridização contendo 500µg de DNAg de um indivíduo macho de *Arapaima* da população do rio Javaés na bacia To-Ar e 500µg de DNAg de outro indivíduo macho de *Arapaima* da população da Reserva Mamirauá na bacia Amazônica, ambos marcados e 30µg de Cot<sub>1</sub>-DNA como bloqueio, sendo 15µg, diretamente isolados de ambas os espécimes de cada bacia.

Na Hibridização comparativa entre macho e fêmea de *Arapaima*, foram usados por lâmina 20µl do mix de hibridização contendo 500µg de DNAg de macho, 500µg de DNAg de fêmea e 30µg de Cot<sub>1</sub>-DNA como bloqueio, nos experimentos nas lâminas contendo cromossomos de indivíduos fêmeas apenas COT<sub>1</sub>-DNA de macho foi utilizado como bloqueio, já nas lâminas de indivíduos machos o bloqueio foi realizado com apenas o COT<sub>1</sub>-DNA de fêmea. Todos os COT<sub>1</sub>-DNA foram preparados diretamente a partir do DNA dos indivíduos doadores dos DNAGs para cada experimento, de acordo com Zwick et al. (1997).

Os experimentos de realização de CGH foram conduzidos conforme descrito em Symonová et al. (2015), com algumas modificações. As preparações cromossômicas foram desidratadas, envelhecidas em estufa a 60°C por uma hora, após foram desidratadas em série alcoólica (70%, 85% e 100%), por 2 min em cada banho, em seguida foram submetidas ao pré-tratamento de 1h com RNase (1µl RNase 10mg/ml +

1ml 2XSSC) e 5 min a 37°C com pepsina (50ng/μl). O DNA cromossômico foi desnaturado em formamida 75%/ 2 × SSC por 3 min e 15s a 74 °C. A seguir, o material foi desidratado em etanol 70% gelado, e 85 e 100% à temperatura ambiente, por 2 min em cada banho. O mix de hibridização foi desnaturado a 86 °C por 10 min, adicionado a 0°C (no gelo) por 10 min e a 37°C por 30 min, após foi aplicado sobre as lâminas e a hibridização foi realizada por um período de 3 dias, a 37 °C, em câmara úmida.

Depois da hibridização, as lâminas foram lavadas, uma vez em formamida 50%/2×SSC a 42 °C for 14 min, 7min sem shake e 7min com shake, por três vezes em 1×SSC a 42 °C por 5 min e em 2× SSC por 1min a temperatura ambiente. Os sinais de hibridização foram detectados usando uma solução composta por anti-digoxigenina-FITC (Roche), diluída em albumina sérica bovina 0.5% /PBS, e estreptavidina-CY3 (Invitrogen Life Technologies, San Diego, Calif., USA) diluída em PBS contendo soro de cabra normal a 10%.

As lâminas foram lavadas três vezes em 4×SSCT à 42 °C, por 5 min em cada lavagem, uma vez em 1XPBS e desidratado em série alcoólica (70%, 85% e 100%) por 2 min cada. Depois de totalmente secas as lâminas com cromossomos metafásicos, foram coradas com 20μl de uma mistura de antifading contendo (1.5 μg/ml) de DAPI (Cambio, Cambridge. United Kingdom).

### **3.2.7. Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH)**

#### **3.2.7.1. As Sondas**

Foram utilizadas diferentes sondas de sequências de DNAs repetitivos para mapeamento citogenético e obtenção de possíveis marcadores específicos nos cromossomos das espécies em estudo:

a) DNAr 5S, incluindo 120 pares de bases do gene codificante do RNAr 5S e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito (NTS), isoladas diretamente do genoma de *H. malabaricus* (Martins et al. 2006).

b) Segmento de 1.400 pares de bases do gene de RNAr 18S obtido por PCR a partir do DNA nuclear de *H. malabaricus* (Cioffi et al. 2009).

c) O elemento retrotransponível Rex<sub>1</sub> obtido usando primers descritos em Volf et al. (1999).

d) As sequencias de U2 snDNA produzida por PCR, de acordo com Úbeda-Manzanaro et al. (2010).

e) Oligonucleotídeos enriquecidos com sequências microssatélites: d(GA)<sub>15</sub>, d(CA)<sub>15</sub>, d(CAA)<sub>10</sub>, marcadas diretamente com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese, segundo Kubat et al. (2008), com pequenas modificações.

### **3.2.7.2. Marcação das sondas**

As sondas foram marcadas com biotina-14-dUTP, utilizando o kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche) ou com DIG-11-dUTP, utilizando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche), conforme as instruções do manual do fabricante. Os produtos destas reações foram precipitados com acetato de Potássio e etanol durante 16h à -20 °C. Posteriormente, os materiais foram centrifugados por 15 minutos a 13000 rpm, lavados novamente em álcool 70%, centrifugados a 1000 rpm, descartado os sobrenadantes e os DNAs marcados foram secados completamente em estufa a 37 °C, posteriormente foram ressuspensos no mix (10mg/ml de sulfato de dextrano, 2XSSC e 50% de formamida).

### **3.2.7.3. Preparo das lâminas, hibridização e detecção do sinal**

A preparação das lâminas para hibridização seguiu o protocolo descrito por Yano et al. (2017) com algumas modificações, principalmente relacionados a tempo de tratamento em diferentes substâncias durante a realização do protocolo.

As lâminas contendo as preparações cromossômicas foram inicialmente colocadas em uma estufa a 60°C por 60 minutos, depois incubadas com 100 µl do mix de RNase (1µl RNase 10mg/ml + 1ml 2XSSC) por 1h à 37°C em câmara úmida. Após foi lavada durante 5 minutos em uma solução de 1xPBS e secas em temperatura ambiente. Depois foi adicionado 100µl de pepsina 0.005% (495 µl + 5 µl HCl 1M + 1.5 µl de pepsina (20mg/ml) em cada lâmina e coberto com uma lamínula por 10 minutos a temperatura ambiente, lavada durante 5 minutos em solução 1XPBS em temperatura ambiente, fixadas com formaldeído 1% por 10 minutos em temperatura ambiente. Foram lavadas por 5 minutos em 1xPBS por duas vezes, desidratadas em série alcoólica etanol 70%, 85% e 100% dois minutos cada e secas em temperatura ambiente.

Posteriormente as lâminas foram desnaturadas em uma solução (formamida 70% + 30% 2xSSC) por 3 minutos e 15 segundos à 72°C. Em seguida foram desidratadas em etanol 70% gelado por 2 minutos e depois em etanol 85% e 100% por 2 minutos cada em temperatura ambiente e secas em temperatura ambiente. Em paralelo as sondas foram desnaturadas em aparelho termociclador a 85 °C por 10 minutos, depois foram adicionadas no gelo por mais 10 minutos. Foram adicionados 20µl de solução de

mix de hibridização em cada lâmina, coberto com uma lamínula 20/50mm e mantidas em câmara úmida a 37 °C por aproximadamente 16 horas. As lavagens pós-hibridização foram realizadas durante 5 minutos em 2xSSC a 42 °C e 5 minutos em 1xSSC em temperatura ambiente.

Nas sondas com marcação direta após este último passo as lâminas foram lavadas rapidamente em 1xPBS, desidratadas em etanol 70%, 85% e 100% dois minutos cada em temperatura ambiente e coradas com 15µl de solução DAPI + antifading e cobertas com uma lamínula. E nas sondas com marcação indireta foram aplicadas 100µl de solução de detecção em cada lâmina, cobertas com uma lamínula por uma hora a 37 °C.

A detecção das sondas foi realizada com conjugado avidina-FITC 0,07% (Sigma) em tampão C (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,15 M NaCl), por 1h, para sondas previamente marcadas com biotina ou com anti-digoxigenina-rhodamina (Roche) em tampão C (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,15 M NaCl), também por 1h, para sondas previamente marcadas com digoxigenina. Após uma hora de detecção as sondas foram então lavadas três vezes em solução 4xSSCTween (100ml de 20xSSC + 400ml de H<sub>2</sub>O + 250ul de Tween), após as lâminas foram lavadas por um minuto em 1xPBS, desidratadas novamente em série alcoólica 70%, 85% e 100% e secas em temperatura ambiente. Os cromossomos foram contracolorados com 20 µl de uma mistura de DAPI + antifading (1 µl de DAPI 0,2mg/ml em 1 ml de antifading (Vector Laboratories).

### **3.2.8. Análise dos Resultados**

Foram analisadas no mínimo 30 metáfases por espécie/marcador. As preparações foram analisadas em microscópios ópticos com aumento de 1000 vezes e microscópio de epifluorescência com os filtros apropriados, sendo as imagens capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetic). Foi mantida uma padronização quanto à apresentação do cariótipo das espécies, para possibilitar uma análise comparativa mais apropriada entre elas.

Os cromossomos foram agrupados e classificados em metacêntricos ou submetacêntricos (m/sm), subteloicêntricos ou acrocêntricos (st/a), considerando as relações de braços proposta por Levan et al. (1964). Os dados obtidos foram empregados para uma abordagem comparativa entre as diferentes espécies analisadas, juntamente com dados já existentes na literatura para as espécies de Arapaimidae, testando a hipótese sobre a diversidade cromossômica de DNAs repetitivos presentes

no genoma de *Arapaima* influenciando em sua diversidade cromossômica, contrastando com a menor diversidade cromossômica em *H. niloticus*, influenciada pela diferença da diversidade de DNAs repetitivos presentes em seu genoma, considerando também nestas análises, estudos genéticos em outros osteoglossiformes.

### **3.2.9 Metodologia DArT-seq e análise dos dados**

#### **3.2.9.1 Extração de DNA e genotipagem**

Fragmentos de fígado foram obtidos e armazenado em etanol a 100% para extração de DNA, através do protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001). Além de *H. niloticus* e *A. gigas*, DNA de outras espécies de Osteoglossiformes da família Notopteridae, *Chitala blanci*, *C. ornata*, *C. lopis*, *Notopterus notopterus*, *Xenomystus nigri* e *Papyrocranus afer*, também foram extraídos e usados para análise de DArT-seq. Os DNAs foram analisados sob a tecnologia DArT-seq (Kilian et al. 2012), pela Diversity Arrays Technology Company (Canberra, Austrália).

Utilizou-se uma combinação de enzimas PstI e SphI para construir as bibliotecas usando métodos descritos por Lambert et al. (2016), que foram sequenciadas na plataforma de nova geração Illumina HiSeq2500. Estas enzimas foram selecionadas uma vez que ambas apresentam regiões de corte de 6 bases tendo como alvo regiões ricas em AG e GC. Além disso, a enzima PstI é sensível à metilações CG (Wenzl et al. 2006) e, assim, seleciona regiões ricas em genes do genoma. Duas bibliotecas foram construídas para cada amostra de DNA e todo o processo de geração de dados foi feito com replicação técnica completa (desde a etapa de digestão / ligação até a marcação de marcadores). Aproximadamente 2,5 milhões de sequências foram geradas por amostra para a construção da matriz final de marcadores. Os marcadores foram extraídos usando o pipeline analítico proprietário DArT PL's, que, além da chamada de alelos e do relatório de metadados dos dados dos marcadores, avalia a consistência da chamada de alelo entre as réplicas técnicas. Os dados brutos gerados por sequenciamento para todas as amostras foram filtrados, processados e convertidos em genótipos de alta qualidade pela empresa, utilizando o software de propriedade DArT. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram extraídos das sequências de representações genômicas (bibliotecas), foram transformados para o formato “duas linhas”, cada linha representando um alelo específico de cada locus de SNP. Os genótipos foram codificados como uma matriz de SNP com *loci* nas linhas e indivíduos nas colunas. Para



cada genótipo, os dados foram armazenados como 0 para o estado ancestral e 1 para o estado alternativo.

### **3.2.9.2 Análise de Componentes Principais**

A partir da matriz de dados SNP DArTseq filtrada, uma matriz de similaridade genética par-a-par baseada em Dice (1945), foi computada e aplicada para a análise de diversidade genética usando pacotes em linguagem R. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com o pacote FactorMineR (Lê et al. 2008), enquanto a clusterização hierárquica com p-values (AU, Approximately Unbiased p-value and BP, Bootstrap Probability value) foi realizada com o pacote pvclust (Suzuki & Shimodaira, 2006) usando a distância euclidiana.

### **3.2.9.3 Diversidade Genética e Isolamento por Distância**

As estatísticas sumárias para diversidade genética foram calculadas usando o programa GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen, 2004) para cada localidade amostrada, a partir de estimativas de heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ). Uma matriz de  $F_{ST}$  par-a-par (Weir & Cockerham, 1984) também foi calculada entre os locais de amostragem, com significância avaliada usando 10.000 permutações.

O isolamento por distância (IBD) foi testado apenas para populações de ocorrência natural e para cada bacia separadamente. A distância geográfica simples foi usada para populações no To-Ar, já que elas se conectam na estação chuvosa. Para a bacia Am, distâncias acompanhando a extensão dos rios foram usadas. Foi realizado um teste de Mantel (Mantel, 1967) e análise de redundância canônica (RDA), um método que combina PCA e regressões múltiplas, decompondo a variância genética com base nas frequências alélicas (Orsini et al. 2012). Para o RDA, as distâncias de fluxo na bacia de Am foram transformadas em coordenadas com o comando `cmdscale` no R. Ambos os conjuntos de coordenadas espaciais foram então convertidos em polinômios ortogonais de terceiro grau, com uma versão modificada dos scripts de Meirmans (2015). Também obtivemos o componente espacial da variação genética total multiplicando a porcentagem de variação restrita pelo valor global do  $F_{ST}$ , como sugerido por Meirmans (2015).

### 3.2.9.4 Estrutura Populacional

A estrutura populacional para todos os locais de amostragem coletados foi investigada com o método não espacial fastSTRUCTURE v. 1.0 (Raj et al. 2014), uma variação do popular método de agrupamento bayesiano STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) otimizada para grandes conjuntos de dados genotípicos. A preparação e a análise de dados foram realizadas com o auxílio do pipeline “lizards-are-awesome” (Melville et al. 2017). A estrutura populacional das localidades naturais também foi avaliada com a estratégia espacial implementada no GENELAND (Guillot et al. 2005), usando frequências correlacionadas por 500.000 interações amostradas a cada 200. As corridas do fastSTRUCTURE foram repetidas para um intervalo de K (número de populações) de 1 a 11 e no GENELAND de 1 a 8. Os resultados de ambas as análises foram processados com a ferramenta online CLUMPAK (Kopelman et al. 2015), que simplifica o uso de DISTRUCT (Rosenberg, 2004) e CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg, 2007) para resumir e plotar os resultados.

### 3.2.9.5 Seleção de Modelo Demográfico

Simulamos dados genéticos similares ao conjunto de dados amostrados para localidades de ocorrência natural no programa ms (Hudson, 2002). Foram considerados três cenários possíveis para a história demográfica de *A. gigas*: (1) uma população panmítica abrigando todas as amostras coletadas nas duas bacias, (2) colonização da bacia do Am, simulada como evento fundador seguido de expansão populacional exponencial e (3) colonização da bacia To-Ar.

Para realizar nossas simulações de coalescência, adotamos um tempo padrão de geração, amostrado de uma distribuição uniforme de 4 a 5 anos (Hrbek et al. 2005). Foi utilizada uma taxa de mutação de  $1,25 \times 10^{-9}$  substituições por sítio por ano, calculada a partir dos tempos de divergência e quantidade de diferenças genômicas entre *A. gigas* e *Scleropages formosus* (Vialle et al. 2018). Realizamos simulações de dados (20.000 para cada modelo) com scripts modificados de (Perez et al. 2016). Os valores de  $\theta$ , o parâmetro que mede o equilíbrio mutação-deriva, foram calculados para cada simulação usando a taxa de mutação e o tamanho efetivo populacional, amostrado a partir de uma distribuição uniforme de 100 a 500.000 indivíduos, (Hrbek et al. 2005) sugerem cerca de 150.000 fêmeas mortas por ano na transição dos séculos 19 a 20, com base em indivíduos comercializados. O tempo de divergência para a bacia Am e To-Ar ( $\tau_2$ ) foi amostrado a partir de uma distribuição uniforme entre 200 mil anos atrás (kya) a 2

milhões de anos atrás (Mya), que inclui a estimativa de idade do rio Tocantins para alcançar seu curso moderno (limite entre Plioceno e Pleistoceno, (Rossetti & Valeriano, 2007), 1,8 Mya (Silva-Santos et al. 2018). Para o tempo de divergência da população de Codajás em relação às outras localidades da bacia Am, foi utilizada uma distribuição uniforme entre 0-200 kya. A magnitude do efeito fundador durante a colonização (usada nos modelos 2 e 3) foi calculada como a taxa de contração durante a colonização ( $\theta_{rF-A}$ ), estimada como a razão entre o valor  $\theta$  durante o evento e esse mesmo valor na população ancestral (com distribuição variando de 0,001 a 0,1). A intensidade de expansão da população após a colonização ( $\theta_{rC-A}$ ) foi estimada como a razão entre o valor atual de  $\theta$  e o  $\theta$  da população ancestral (amostrada de 0,1 a 1).

Os diferentes cenários demográficos foram comparados usando uma abordagem recente descrita em Flagel et al. (2018). Essa estratégia é baseada na conversão das matrizes de SNPs em imagens e na extração de informações através de redes neurais convolucionais (CNNs; para detalhes do método, ver Flagel et al. (2018). Utilizando um script em python, convertimos nossos dados simulados no ms para matrizes NumPy contendo indivíduos nas linhas e loci como colunas. Então, para cada simulação, agrupamos os indivíduos por distância genética e transposemos a matriz para manter cada indivíduo em uma coluna e os marcadores como linhas. Os arranjos NumPy resultantes foram então embaralhados e 10.000 simulações aleatórias foram separadas para serem usadas como conjunto de validação, enquanto os 50.000 restantes foram usados como dados de treinamento. Os dados de treinamento foram submetidos a uma CNN baseada na arquitetura sugerida por Flagel et al. (2018) com ligeiras modificações (**Figura suplementar 5**). Resumidamente, foram utilizadas três camadas convolucionais 1D com um tamanho de kernel de 2 (a primeira camada contendo 250 e as outras duas 125 neurônios), intercaladas com camadas de agrupamento por média, seguido por duas camadas totalmente conectadas com 125 neurônios e uma camada de saída sigmoide com 3 neurônios, correspondentes aos 3 cenários utilizados para simular os dados. A CNN foi executada com um tamanho de mini-lote de 250, com funções de ativação de unidade linear retificada e um dropout de 25% e 50% de neurônios aleatórios nas camadas convolucionais e densamente conectadas, respectivamente. Uma função de perda de entropia cruzada categórica foi usada, juntamente com a otimização de Adam (Kingma & Ba, 2015).

### 3.2.9.6 Modelagem Paleogeográfica

O nicho climático para *Arapaima* foi estimado a partir de 85 ocorrências naturais, baseadas em nossas coletas (8 pontos), em estudos publicados previamente Hrbek et al. (2007) 11, Torati et al. (2019) 4, Vitorino et al. (2015) 4, Vitorino et al. (2017) 1 e 57 ocorrências disponíveis na Global Biodiversity Information Facility (GBIF), que foram checados manualmente para evitar inconsistências. Foi realizada uma combinação de nove algoritmos de distribuição com o pacote biomod2 (Thuiller et al. 2009). Foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM; (McCullagh & Nelder, 1989)), ranhuras de regressão adaptativa multivariada (MARS; (Friedman, 1991), análise de árvore de classificação (CTA; (Breiman, 1984), análise discriminante de mistura (MDA; (Hastie et al. 1994)), redes neurais artificiais (ANN; (Ripley, 2014), modelos generalizados impulsionados (GBM; (Ridgeway, 1999), florestas aleatórias (Breiman, 2001), envelope de superfície (SRE; (Busby, 1991)) e Máxima Entropia (Phillips et al. 2006). A calibração do modelo foi realizada com as condições climáticas atuais, com resolução de 30 arco-segundos, enquanto projeções para o último máximo glacial (LGM, 21 kya) e último máximo interglacial (120 kya) foram realizadas com uma resolução de 2,5 arco-minutos. Foi adotado um método conjunto com 5 simulações para cada algoritmo, mantendo apenas simulações com TSS maior que 0,7. Das 19 variáveis bioclimáticas disponíveis no WorldClim (Hijmans et al. 2004), 15 foram avaliadas (as variáveis 8, 9, 18 e 19 foram omitidas por terem intervalos artificiais; (Bonatelli et al. 2014)) para evitar correlação. Para variáveis com alta correlação (índice de Pearson  $> 0,85$ ), apenas a variável com maior capacidade explicativa foi mantida, após uma rodada preliminar.

# **Resultados e Discussão**

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo e a sua discussão, encontram-se subdivididos na forma de 2 capítulos, os quais correspondem aos artigos científicos listados abaixo que já se encontram publicados (Capítulo 1) e em fase de submissão (Capítulo 2). A versão publicada do 1º artigo encontra-se anexada ao final da tese.

**Capítulo 1:** De Oliveira EA, Bertollo LAC, Rab P, Ezaz T, Yano CF, Hatanaka T, et al. (2019) Cytogenetics, genomics and biodiversity of the South American and African Arapaimidae fish family (Teleostei, Osteoglossiformes). **PLoS ONE** 14(3): e0214225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214225>.

**Capítulo 2:** De Oliveira EA & Perez MF, Bertollo LAC, Souza FHS, Rab P, Olivera EHC, Feldberg E, Viana PF, Hatanaka T, Cioffi MB. Chromosomal stability, population structure and historical demography in the bony-tongue *Arapaima* (Teleostei, Osteoglossiformes): Deep Learning model comparison suggest colonization of the Tocantins-Araguaia from the Amazonas basin.

# Capítulo 1

**Citogenética, genômica e biodiversidade de peixes africanos  
e da América do Sul da família Arapaimidae (Teleostei,  
Osteoglossiformes)**

**De Oliveira EA, Bertollo LAC, Rab P, Ezaz T, Yano CF, Hatanaka T,  
Jegade OI, Tanomtong A, Liehr T, Sember A, Maruyama SR, Feldberg E,  
Viana PF, Cioffi MB  
PloS ONE 14(3): (2019)**

## Resumo

Osteoglossiformes representa uma das linhagens mais ancestrais de teleósteos, atualmente difundida em quase todos os continentes, com exceção da Antártida. No entanto, dados envolvendo citogenética molecular ou genômica comparativa ainda são muito escassos para este grupo de peixes. Portanto, as presentes investigações enfocam nos osteoglossiformes da família Arapaimidae, estudando um grupo de peixes modelos, com ferramentas avançadas de citogenética e genômica. O objetivo é explorar e esclarecer melhor certos eventos e fatores que tiveram impacto na história evolutiva deste grupo de peixes. Para tanto, foram examinados representantes sul-americanos e africanos de Arapaimidae, nomeadamente *Arapaima gigas* e *Heterotis niloticus*. Ambas as espécies diferiram significativamente por meio de números cromossômicos diploides, com  $2n = 56$  encontrado em *A. gigas* e  $2n = 40$  exibido por *H. niloticus*. A citogenética convencional, juntamente com a hibridização fluorescente in situ, revelou algumas tendências gerais compartilhadas por espécies osteoglossiformes analisadas até o momento, como a presença de apenas um par de cromossomos portadores dos sítios de DNAr 18S e 5S e cariótipos (ex: *A. gigas*) com metade dos cromossomos acrocêntricos-submetacêntrico, correspondendo assim aos padrões de cariótipo hipotético ancestral para os teleósteos. Além disso, os genomas de *A. gigas* e *H. niloticus* apresentam uma divergência notável em termos de conteúdo e distribuição de DNA repetitivo, como revelado por Hibridização Genômica Comparativa (CGH). Por outro lado, a diversidade genômica de sequências de cópia única (SNPs), estudadas através de análises de componentes principais (PCA), baseadas em alelos SNP genotipados pelo procedimento DArTseq, demonstraram uma distância genética muito baixa entre as espécies sul-americanas e africana de Arapaimidae; esse padrão contrasta fortemente com o cenário encontrado em outras espécies de osteoglossiformes. Estes dados forneceram uma visão clara da diversidade genética entre espécies africanas e sul-americanas de Arapaimidae e foram altamente consistentes com os dados cromossômicos, geográficos e históricos, auxiliando na compreensão de sua diversificação evolutiva.



## Introdução

Peixes de água doce representam um importante grupo modelo para estudos biogeográficos, já que sua evolução é frequentemente afetada, pelo desenvolvimento geológico da Terra, que molda as redes de água doce (Bănărescu, 1995; Lundberg, 1993). Conseqüentemente, cada continente apresenta faunas de peixes de água doce específicas, onde os padrões de distribuição são moldados por barreiras físicas que bloqueiam a dispersão de ancestrais e de muitas espécies atuais. A ordem Osteoglossiformes, com seus representantes de água doce, é um modelo importante para estudos biogeográficos (Kumazawa & Nishida, 2000; Lavoué, 2016), pois representa uma das linhagens de peixes teleósteos mais antigas (Betancur-R et al. 2017; Nelson et al. 2016), que mostra uma distribuição intercontinental, com pelo menos um representante em cada continente do hemisfério sul, exceto para a Antártida. De acordo com a taxonomia atual, Osteoglossiformes engloba as subordens Osteoglossoidei (incluindo as famílias Osteoglossidae, Arapaimidae, Pantodontidae) e Notopteroidei (incluindo as famílias Gymnarchidae, Mormyridae e Notopteridae), (Li et al. 1996; Nelson et al. 2016).

Arapaimidae inclui o gênero sul-americano *Arapaima* e o gênero africano *Heterotis*. *Heterotis* é supostamente representado até o momento por uma única espécie *H. niloticus*, mas a real diversidade de espécies é desconhecida, com alguns relatórios preliminares indicando possível diferenciação genética e rápida evolução (Adite et al. 2005; Hurtado et al. 2013). O Arapaimidae *H. niloticus* africano, pode atingir até 1 m de comprimento e, devido à demanda e popularidade de sua carne (Adite et al. 2005), esta espécie experimentou uma enorme diminuição populacional e recentemente foi incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção (Mustapha, 2010).

O pirarucu foi considerado monotípico desde que Günther agrupou *A. arapaima*, *A. mapae* e *A. agassizii* em um único táxon, *A. gigas* (Günther 1867; Stewart, 2013a). No entanto, estudos recentes levaram à conclusão de que todos os três táxons são válidos como espécies separadas, bem diagnosticadas e uma nova espécie adicional, *A. leptosoma*, foi descrita, com mais indicações de que a lista de espécies de Arapaima provavelmente continuará a crescer (Stewart, 2013a; 2013b). Assim, o gênero *Arapaima* perdeu o status monotípico, englobando mais espécies, diferente do que foi observado por mais de um século. O principal problema pode ser representado pelo fato de que dessas espécies são conhecidas apenas os seus holótipos e sua distribuição real é desconhecida, porque todos os indivíduos de *Arapaima* são reconhecidos como *A.*

*gigas*, popularmente conhecidos como “pirarucus”. A distribuição natural desses peixes abrange grande parte das bacias brasileiras do Tocantins-Araguaia e Amazonas (Castello, 2008; Reis et al. 2003). Vivem preferencialmente em ambientes lânticos como várzeas e lagos, com comportamento sedentário significativo (McConnell & Lowe-McConnell, 1987; Queiroz, 2000), exibindo estratégias reprodutivas complexas, incluindo a construção de ninhos e um alto nível de cuidado parental (Monteiro et al. 2010). Sendo um dos maiores peixes de água doce do planeta, com indivíduos medindo até 4 m de comprimento, eles foram submetidos a intensas atividades pesqueiras no último século (Nelson et al. 2016).

A separação do Gondwana tem sido discutida como sendo a força motriz para a especiação e distribuição intercontinental dos Arapaimidae existentes. Com base no registro fóssil, os ancestrais comuns dos Arapaimidae vivos possuíam distribuição global, habitando tanto a Laurásia quanto o Gondwana (**Figura 11**). Isso também é consistente com evidências moleculares sugerindo que a diversificação em (sub) famílias de Osteoglossiformes começou antes do término da separação do Pangeia (Kumazawa & Nishida, 2000; Lavoué, 2016). As espécies de Arapaimidae existentes são representadas por apenas dois gêneros, nomeadamente *Heterotis* o africano, que é nativo de todas as bacias do Sahelo-Sudão, Senegal, Gâmbia, Corubal, Volta, Ouémé, Níger, Bénoue, Chade e Nilo, e *Arapaima* da América do Sul, amplamente distribuído pelas terras baixas da Amazônia, bacia Tocantins-Araguaia, Peru e Guiana. Conseqüentemente, surge uma questão intrigante: como os Arapaimidae ocuparam o território sul-americano? Nesse sentido, especulações sobre o papel dos eventos vicariantes no processo divergente entre essas espécies são plausíveis. No entanto, enquanto dados geológicos sugerem que a África e a América do Sul começaram a se separar no início do Cretáceo aproximadamente 135 Ma (Pindell et al. 1988), de forma lentamente até o meio do Cretáceo entre 120 a 110 Ma com o aumento do Oceano Atlântico ao Sul (Rabinowitz & Labrecque, 1979). Usando marcadores nucleares e mitogenômicos e calibração com registros fósseis, estimou-se que o tempo de divergência entre estas duas linhagens ocorreu dentro da faixa de 85 a 50 de Ma (Lavoué, 2016), exigindo hipóteses biogeográficas alternativas para explicar a atual distribuição intercontinental desses peixes. Portanto, abordagens diversificadas, incluindo análises cariotípicas e de sequenciamento de alta resolução, têm sido empregadas e interpretadas dentro do contexto da história biogeográfica de Arapaimidae, a fim de fornecer uma nova e mais completa evidência sobre este assunto.

Avanços em técnicas citogenéticas forneceram evidências de que sequências repetitivas de DNA desempenham um papel importante na organização estrutural e funcional dos genomas (Biscotti et al. 2015; Schueler et al. 2001). Nas últimas duas décadas, grandes quantidades de dados foram geradas em relação ao mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em várias espécies de peixes (Cioffi & Bertollo, 2012). Entretanto, os dados citogenéticos para os representantes de Osteoglossiformes ainda são escassos e, quando disponíveis, são de estudos realizados no início da década de 1970 e restritos principalmente à descrição do número diploide ( $2n$ ) e da estrutura cariotípica. Uma tabela de resumo com essa informação pode ser encontrada em (Ráb et al. 2016). Dentro dos Arapaimidae, apenas dois estudos relatando a distribuição da heterocromatina constitutiva e o mapeamento das sequências de DNAr 45S nos cromossomos foram realizados até o momento (Da Rosa et al. 2009; Marques et al. 2006).

A hibridação genômica comparativa (CGH) é um método baseado em FISH que utiliza DNAs genômicos totais (DNAg) dos organismos investigados como uma sonda de hibridização. Através do CGH, é possível comparar o conteúdo genômico de duas (ou mais) fontes diferentes no nível da composição molecular bruta, uma vez que as sondas são simultaneamente hibridizadas em preparações cromossômicas de interesse (Kallioniemi et al. 1992; Mahelka et al. 2011). O princípio do método baseia-se na distribuição diferencial de classes de DNA repetitivos específicos dos genomas já divergentes, uma vez que essa fração genômica altamente abundante apresenta uma taxa evolutiva mais rápida do que as regiões de cópia única (Biscotti et al. 2015; Chester et al. 2010; Kato et al. 2005). Essa metodologia foi aplicada, com sucesso na identificação de genomas parentais em híbridos/alopoliplóides, na delimitação de oito regiões sexo específicas em cromossomos sexuais homomórficos e heteromórficos e em comparações genômicas entre espécies correlacionadas, para referências veja Sember et al. (2018).

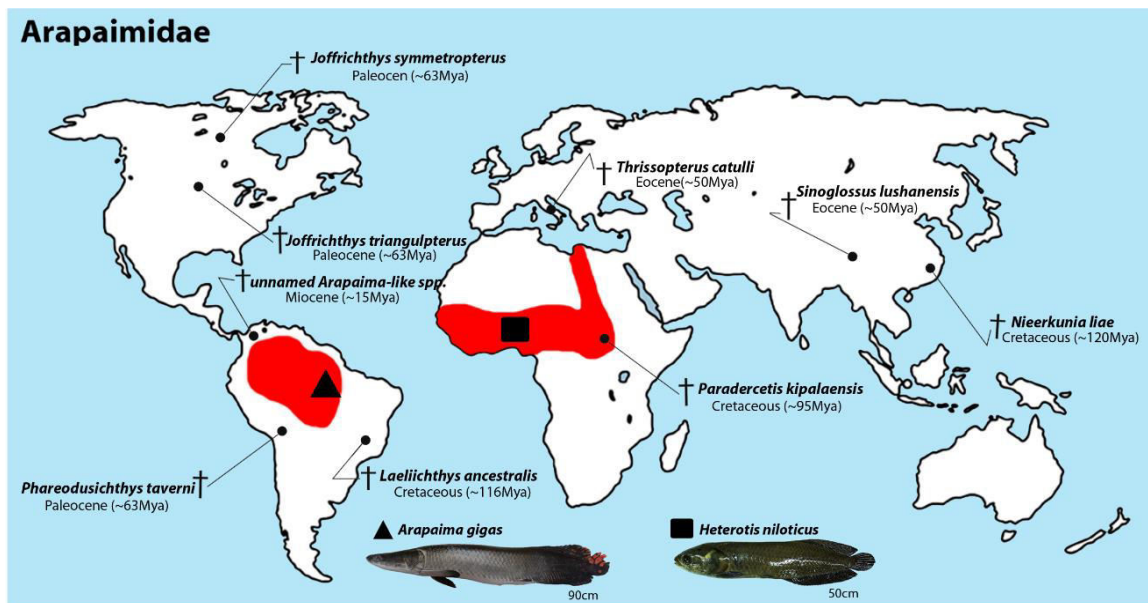
Aqui nós realizamos análises citogenéticas moleculares abrangentes dentro da família Arapaimidae aplicando métodos citogenéticos diferenciais, tais como bandeamento-C, bandamento-NOR, coloração com corantes base específicos ( $CMA_3$ ), CGH e mapeamento físico de algumas classes de DNAs repetitivos através de FISH, completamos com análise molecular de DArT-seq usando polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). O objetivo principal foi investigar e comparar padrões de evolução do genoma cromossômico e macroscópico em dois representantes de Arapaimidae de dois

continentes diferentes e interpretá-los dentro do contexto de dados conhecidos de outros peixes Osteoglossiformes, trazendo novas visões sobre as tendências evolutivas dentro do grupo. Os resultados apontaram divergências cromossômicas e genômicas geralmente altas entre as duas espécies no nível de mudança cariotípica macroestrutural e distribuição e conteúdo de DNAs repetitivos, enquanto, ao mesmo tempo, observamos conservadorismo incomum de regiões de cópia única preservadas apesar da profunda divergência evolutiva entre as espécies.

## **Material e métodos**

### **Animais, preparações de cromossomos mitóticos e bandamentos cromossômicos**

Foram analisados oito indivíduos de *Heterotis niloticus* (quatro fêmeas e quatro machos, do rio Oluwa, África) e 15 indivíduos de *Arapaima gigas* (sete fêmeas e oito machos; rio Javaé, América do Sul) (**Figura 11**). Os espécimes foram depositados na coleção de peixes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP, vouchers 20558, 121641 e 121642). As amostras foram coletadas com a autorização do órgão ambiental brasileiro ICMBIO / SISBIO (autorização nº 48290-1). A identidade de *A. gigas* foi determinada de acordo com os caracteres diagnósticos fornecidos por (Stewart, 2013a; 2013b). A fim de aumentar o número de células mitóticas, os animais foram primeiramente estimulados com suspensões de levedura por 24 a 72 h (Cavallini & Bertollo, 1988). Em seguida, foram eutanasiados com uma overdose de benzocaína (1g/L) e sacrificados para preparação do cromossomo (Bertollo et al. 2015), de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Processo no CEUA 1926260315). Procedimentos de impregnação com nitrato de prata (Bandamento Ag-NOR), coloração com cromomicina A3 (CMA3) e Bandamento-C foram realizadas seguindo protocolos descritos por (Howell & Black, 1980; Schmid, 1980; Sumner, 1972), respectivamente.



**Figura 11.** Distribuição geográfica dos peixes Arapaimidae e os locais de amostragem. Áreas de distribuição das espécies existentes de Arapaimidae (vermelho) e os registros fósseis atualmente descritos (cruzes). Os registros fósseis são baseados em descrições relatadas por Li & Wilson (1996); Newbrey & Bozek, (2003); Santos (1985) e Wilson & Murray (2008). Os pontos de amostragem são marcados por um triângulo para *Arapaima gigas* (Brasil) e quadrado para *Heterotis niloticus* (Nigéria).

### Sondas e hibridização in situ fluorescente (FISH)

Os fragmentos 18S e 5S do DNAr foram obtidos por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers e perfis térmicos descritos em Cioffi et al. (2009) e Martins et al. (2006) respectivamente. A sonda 5S DNAr consistia em cópias de 120 pares de bases (bp) do gene codificador 5S RNAr e 200 pb do espaçador não transcrito (NTS), enquanto a sonda 18S rRNA era composta de cópias de um segmento longo de 1400 pb correspondendo o gene 18S RNAr. A sonda de DNAr 18S foi marcada com Spectrum Orange-dUTP (Vysis, Downers Grove, IL, EUA) enquanto a sonda 5S DNAr foi marcada com Spectrum Green-dUTP (Vysis, Downers Grove, IL, EUA), ambos por kit tradução nick, de acordo com as recomendações do fabricante (Roche, Mannheim, Alemanha).

A hibridização fluorescente in situ foi realizada seguindo Yano et al. (2017). As lâminas cromossômicas foram incubadas com RNase (200 µg/ml, 90 min a 37 °C em câmara úmida), tratadas com pepsina (50 µg/ml em HCl 10 mM 3 min, 37 °C), fixadas em formaldeído 1% por 10 min. Após desnaturação do DNA cromossômico por 3 minutos e 15 segundos em 70% de formamida / 2xSSC a 72 °C, em seguida as lâminas foram desidratadas em uma série de etanol (70, 85 e 100%), 2 minutos cada. Então, 20 ml da mistura de hibridização (100 ng sondas, 50% de formamida deionizada, 10% de

sulfato de dextrano) foram colocadas nas lâminas e a hibridação foi realizada por 16 h a 37 °C em uma câmara úmida contendo 2×SSC e água. A lavagem pós-hibridação foi realizada com 1×SSC durante 5 min a 42 °C. Uma lavagem final foi realizada à temperatura ambiente em 4xSSC durante 5 min. Finalmente, os cromossomos foram contra corados e montados com uma mistura de DAPI + antifading (1,2 µg/ml) (Vector, Burlingame, CA, EUA).

### **Hibridização genômica comparativa (CGH)**

O experimento CGH foi realizado segundo Symonová et al. (2015). Ou seja, para cada sonda, 1 mg de DNAG foi usado no procedimento de marcação. O DNAG de *A. gigas* foi marcado com Digoxigenina-11-dUTP utilizando DIG-nick-translation Mix (Roche), e o *H. niloticus* DNAG foi marcado com biotina-16-dUTP utilizando BIO-nick-translation Mix (Roche). A solução de hibridização para cada lâmina (20 µl) foi composta por 500ng de cada sonda e 30 µg de DNA C0t-1 não marcado (ou seja, fração de DNA genômico enriquecido para sequências altamente e moderadamente repetitivas). A fração repetitiva de DNA C0t-1 foi diretamente isolado de ambas as espécies de acordo com Zwick et al. (1997). A proporção escolhida entre a sonda e a quantidade de DNA de C0t-1 foi estabelecida com base nas experiências obtidas durante experimentos análogos realizados em nossos estudos anteriores em peixes (Hatanaka et al. 2018; Sember et al. 2018). A proporção escolhida de 1:60 reflete alta severidade em relação ao bloqueio da fração repetitiva do DNA e ainda prováveis hibridizações inespecíficas das sondas nos cromossomos, evitando falsos positivos (Sember et al. 2018; Symonová et al. 2015).

As lâminas com cromossomos metafásicos foram armazenadas a -20 °C durante 24h, foram desidratadas em série alcóolica (70, 85 e 100%, 2 min cada) antes e depois do armazenamento. Depois disso, as lâminas foram envelhecidas por 1 h a 60 °C e tratadas gradualmente com RNase (200 µg/ml, 90 min a 37 °C em câmara úmida) e com pepsina (50 µg/ml em HCl 10 mM 3 min, 37 °C). Finalmente, os cromossomos foram desnaturados em formamida a 75%/2xSSC a 72 °C durante 3-4 minutos e após passaram imediatamente através de séries alcoólica a 70% (-20°C), 85% e 100% em temperatura ambiente (2 min cada). A mistura de sonda (20 µl) foi primeiramente desnaturada a 86 °C por 10 minutos, colocada em gelo por 10 minutos, em seguida, aplicada sobre as lâminas, que foram então incubadas a 37 °C em uma câmara úmida escura por 72 h. As lâminas foram então lavadas duas vezes em formamida a

50%/2xSSC durante 10 minutos e incubadas com 500µl de albumina de soro bovino a 3% (BSA) 4xSSC/Tween (20 min, 37 °C). Os sinais de hibridização foram detectados com anti-Digoxigenina-Rodamina (Roche) diluído em BSA a 0,5% e PBS e avidina-FITC (Sigma) diluído em PBS contendo soro de cabra normal a 10% (NGS). As lavagens finais foram realizadas a 44 °C em 4x SSC/Tween a 0,01%: três lavagens, 7 min cada. Finalmente, os cromossomos foram contra corados com DAPI (1,2 µg / ml) como descrito acima.

### **Análises microscópicas e processamento das imagens**

Pelo menos 30 metáfases por indivíduo foram analisadas para confirmar o número 2n, a estrutura cariotípica e os resultados para os diferentes tipos de bandamentos cromossômicos, FISH e CGH. As imagens foram capturadas usando um microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão) com CoolSNAP, e as imagens foram processadas usando o software Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos ou submetacêntricos (m/sm) e subtlocêntricos ou acrocêntricos (st/a) de acordo com Levan et al. 1964).

### **Extração de DNA e análises das sequencias DArT-seq**

Fragments de fígado foram coletados e armazenados em etanol a 96% para extração de DNA (Sambrook & Russell, 2001). Além de *H. niloticus* e *A. gigas*, DNA de outras espécies da família Notopteridae, *Chitala blanci*, *C. ornata*, *C. lopis*, *Notopterus notopterus*, *Xenomystus nigri* e *Papyrocranus afer*, também foram extraídos e usados para análise de DArT-seq (Barby et al. 2018). Os DNAs foram analisados sob a tecnologia DArT-seq (Kilian et al. 2012), pela Diversity Arrays Technology Company (Canberra, Austrália). Uma combinação de enzimas PstI e SphI foram utilizadas para construir as bibliotecas seguindo as orientações descritas por (Kilian et al. 2012) e sequenciadas no sequenciador de nova geração Illumina HiSeq2500. Estas enzimas foram selecionadas uma vez que ambas visam regiões ricas em GC e indiretamente objetivam regiões ricas em genes do genoma. Duas bibliotecas foram construídas para cada amostra de DNA e todo o processo de geração de dados foi feito em replicação da técnica completa (desde a etapa de digestão/ligação até a marcação de marcadores). Aproximadamente 2,5 milhões de sequencias foram utilizadas por amostra para produzir os dados dos marcadores. Os marcadores foram extraídos usando o pipeline

analítico de propriedade do DArT PL, que, além de relatórios de metadados de dados de marcadores de alelos, avalia a consistência da chamada de alelo entre as réplicas.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e marcadores SilicoDArTs foram extraídos das sequências de representações genômicas (bibliotecas). Os dados in-sílico que representam presença/ausência de fragmento de restrição específico nas representações genômicas, foram pontuados como “1” para o alelo “presente” e “0” para ausência do fragmento/sequência. Os SNPs foram pontuados no formato “duas linhas” - cada linha representando um alelo específico no locus do SNP. A ausência do alelo foi pontuada como '0' e '1' foi relatada para a presença do alelo (**Tabela Suplementar 1**)

### **Análise da diversidade genética entre as espécies**

A partir da matriz de dados filtrada SNP DArT-seq, uma matriz de similaridade genética baseada em pares, baseada em Dice (1945), foi computada e utilizada para as análises de diversidade genética através de pacotes do R. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com FactorMineR (Lê et al. 2008), enquanto a análise de agrupamento hierárquico com valores de p (AU, valor de p Aproximadamente Imparcial e BP, valor de Probabilidade de Bootstrap) foi realizada com pvelust (Suzuki & Shimodaira, 2006) usando distância Euclidiana.

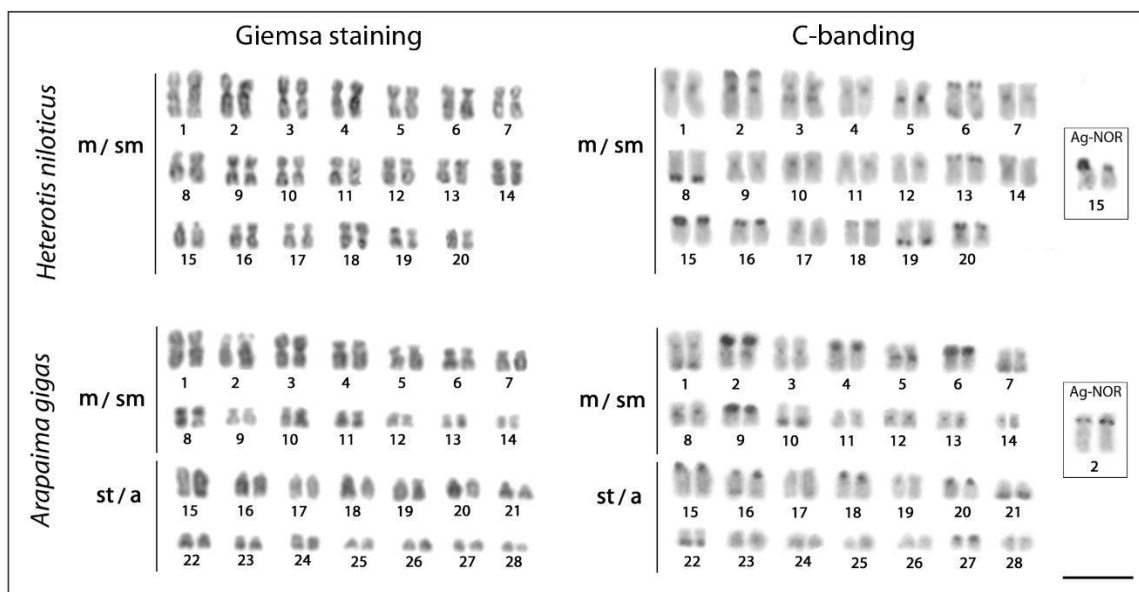
## **Resultados**

### **Análise cariotípica e distribuição da heterocromatina constitutiva**

Ambas as espécies exibiram cariótipos idênticos para machos e fêmeas, sem heteromorfismos cromossômicos relacionados ao sexo. Os indivíduos de *A. gigas* possuem  $2n = 56$ , com cariótipo composto por 28 cromossomos metacêntricos-submetacêntricos (m-sm) e 28 subtelocêntricos-acrocentrico (st-a) e número Fundamental (NF) sendo igual a 84. Por outro lado, *H. niloticus* tem  $2n = 40$ , com todos os cromossomos metacêntrico ou submetacêntrico (m-sm) e NF = 80. Em ambas as espécies, as bandas heterocromáticas C-positivas estão presentes preferencialmente na região centromérica e pericentroméricas de todos os cromossomos, com blocos teloméricos adicionais visíveis em um subgrupo de pares de cromossomos. Especificamente, segmentos terminais conspícuos de heterocromatina constitutiva, foram observados nos pares 2, 3, 6, 8, 13, 15, 16, 18, 19 e 20 em *H. niloticus* e pares 2, 4, 6, 9, 10, 21 e 22 em *A. gigas*, com as bandas dos pares 15 (*H. niloticus*) e 2 (*A. gigas*)



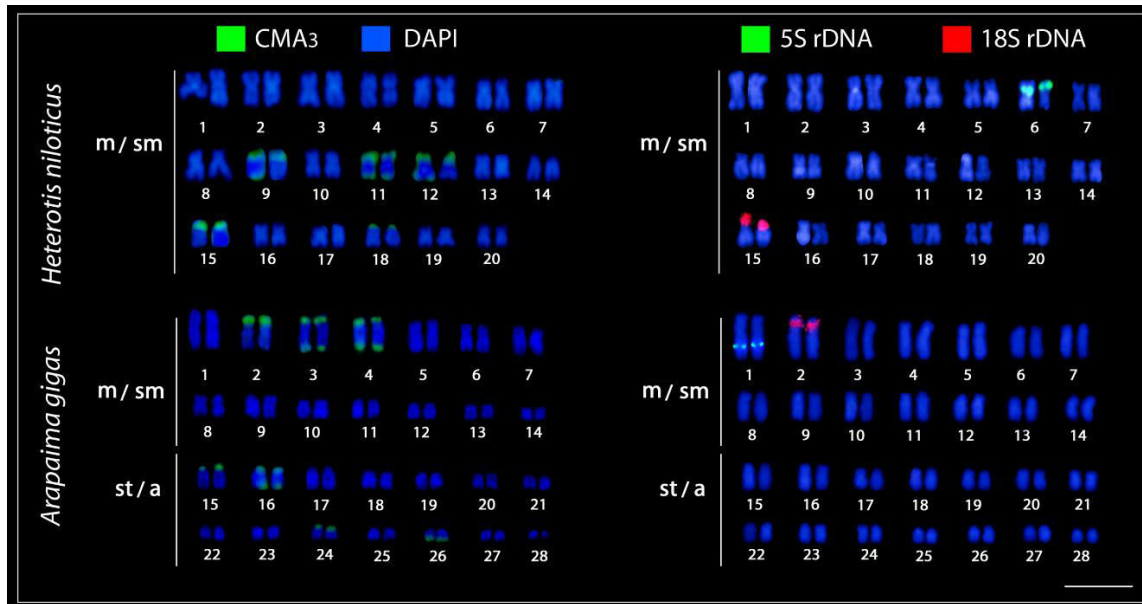
correspondendo às localizações das NORs reveladas pela impregnação com nitrato de prata (ver Figura 12).



**Figura 12.** Cariótipos de *Arapaima gigas* e *Heterotis niloticus* organizados a partir de cromossomos corados por Giemsa e Bandamento-C. Os pares Ag-NOR são evidenciados em caixas. Barra = 5  $\mu$ m.

### Padrões de distribuição de sítios positivos para 5S / 18S DNAr e CMA3

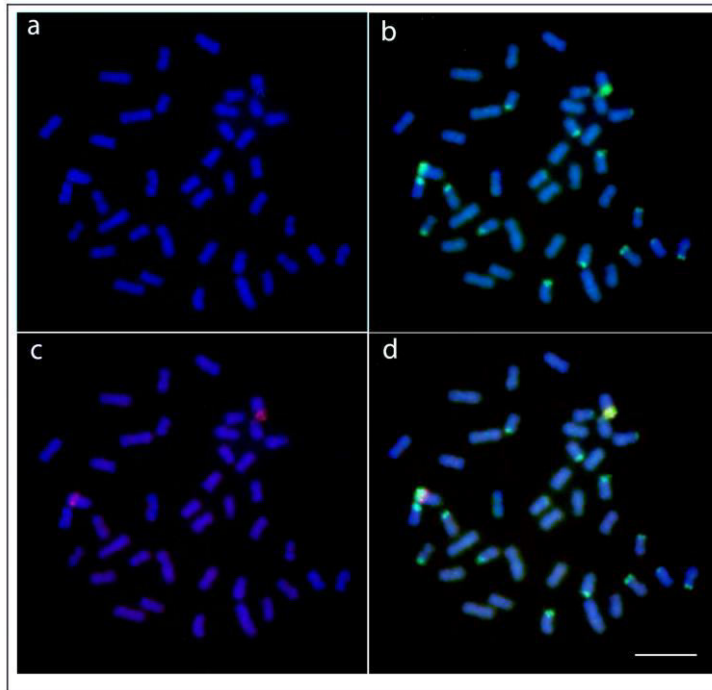
FISH com as sondas 5S DNAr mostraram sinais evidentes na região pericentromérica do par cromossômico 6 em *H. niloticus*, enquanto em *A. gigas* esses sinais foram evidenciados intersticialmente nos braços q do par cromossômico 1. As sondas de DNAr 18S identificaram um único locus com sinal muito intenso localizado no braço p distal do par 15 em *H. niloticus* e no braço p proximal do par 2 em *A. gigas*, correspondendo aos sítios Ag-NOR em ambas as espécies (**Figura 13**). A coloração com corantes fluorescentes base específicos detectou múltiplas bandas positivas para CMA3 nos genomas de ambas as espécies, particularmente na região telomérica de cinco pares de cromossomos em *H. niloticus* (cromossomos 9, 11, 12, 15 e 18) e de sete pares de cromossomos em *A. gigas* (cromossomos 2, 3, 4, 15, 16, 24 e 26), além dos sítios Ag-NOR positivos para CMA3 (**Figura 13**).



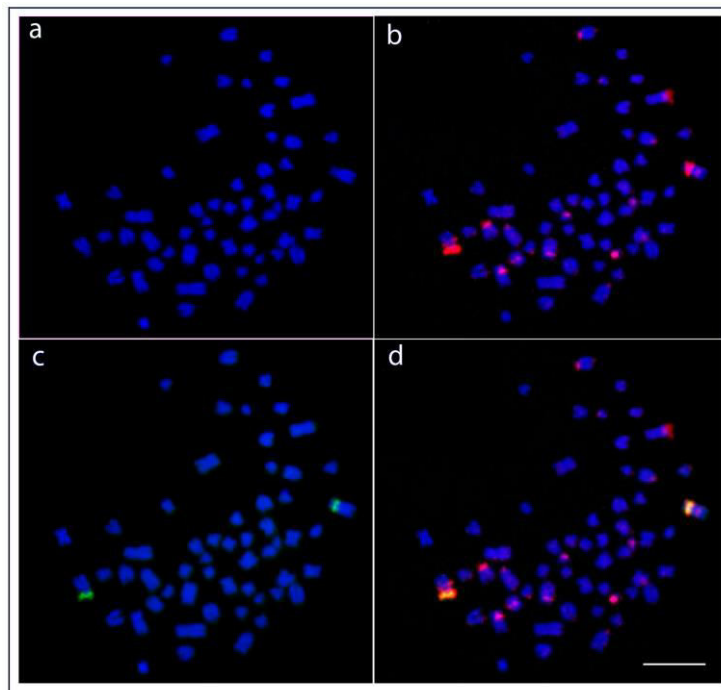
**Figura 13.** Cariótipos de *Arapaima gigas* e *Heterotis niloticus* após coloração com os DNAs ribossomais 18S (vermelho) e 5S (verde) como sondas. Barra = 5µm

### Padrões de hibridização genômica comparativa interespecífica

O experimento de CGH forneceu informações sobre as principais diferenças entre os genomas analisados quanto à quantidade e distribuição da fração repetitiva de DNA. Como esperado, ambos os genomas compartilharam apenas uma porção menor do conteúdo de DNA repetitivo, especificamente apenas um segmento relacionado com regiões de DNA positivas para CMA3/NOR/18S, marcadas como sinais amarelos, isto é, combinação de verde e vermelho, (Lim et al. 2007; Symonová & Howell, 2018). Adicionalmente, em ambos os delineamentos experimentais, a sonda derivada do DNA das espécies cujos cromossomos são submetidos à análise (ou seja, a hibridização contra seu próprio complemento cromossômico), hibridizou preferencialmente em blocos heterocromáticos abundantemente presentes nas regiões cromossômicas terminais (como evidenciado pela análise sequencial com Bandamento-C), mesmo apesar da alta quantidade de DNA competitivo/bloqueador (**Figuras 14 e 15**). No entanto, deve ser observado que, apesar de menos intensamente, a sonda genômica co-específica, também hibridizou ao longo do restante do material cromossômico. Nossas descobertas estão de acordo com os padrões gerais observados em relatórios anteriores baseados em CGH, (Traut & Winking, 2001; Valente et al. 2009), no sentido de hibridização tendenciosa em regiões heterocromáticas e apontam para o fato de que mesmo uma quantidade alta de DNA C0t-1 é frequentemente insuficiente para bloquear completamente as regiões altamente repetitivas (heterocromáticas) para discussão relacionada, ver Trifonov et al. (2009).



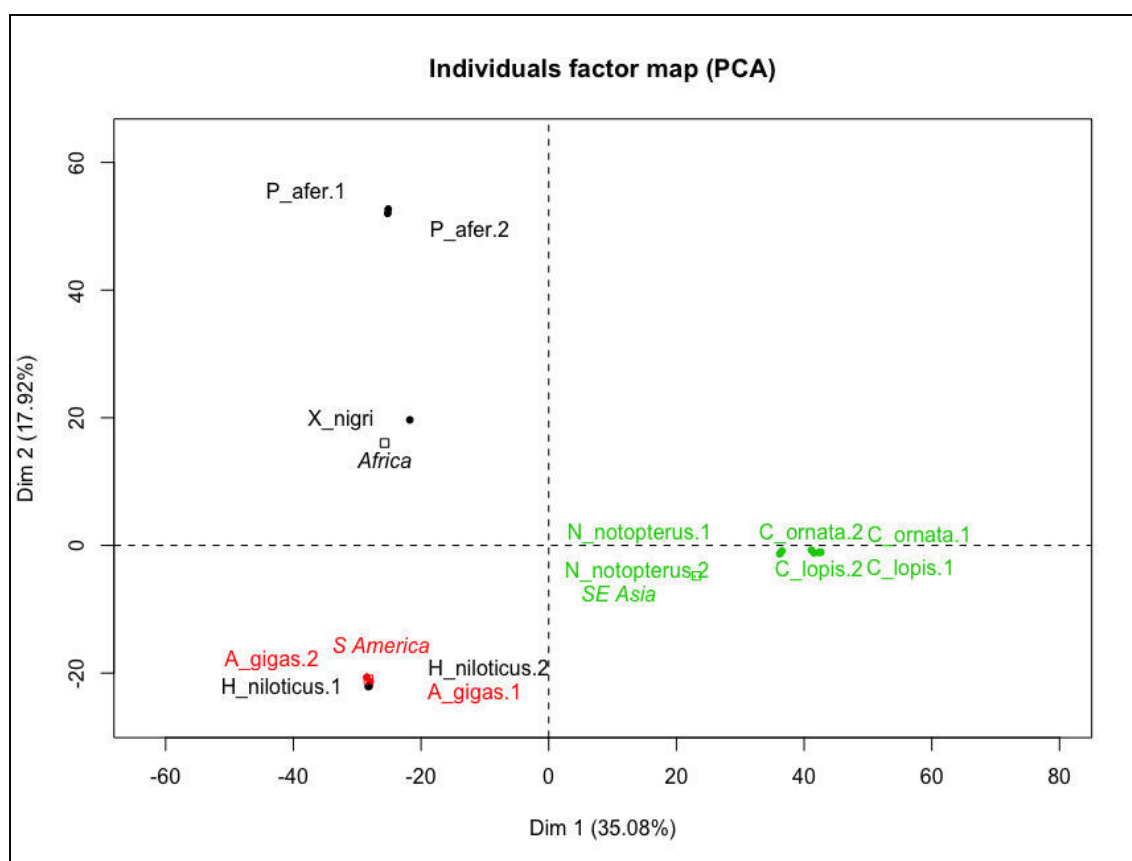
**Figura 14.** Hibridação genômica comparativa em cromossomos metafásicos de *Heterotis niloticus*, (a) DAPI; (b) padrão de hibridização com sondas derivadas de DNAG de *H. niloticus* (verde); (c) padrão de hibridização com sondas derivada de DNAG de *Arapaima gigas* (vermelho); (d) sobreposição de ambas as sondas de DNAG mostrando as sequências compartilhadas entre as espécies (amarelo). Barra = 5  $\mu$ m



**Figura 15.** Hibridização genômica comparativa (CGH) em cromossomos metafásicos de *Arapaima gigas*, (a) DAPI; (b) padrão de hibridização com sondas derivadas de DNAG de *A. gigas* (vermelho); (c) padrão de hibridização com sondas derivadas de DNAG de *Heterotis niloticus* (verde); (d) sobreposição de ambas as sondas de DNAG mostrando as sequências compartilhadas entre as espécies (amarelo). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (azul). Barra = 5  $\mu$ m

## Análises de diversidade genética usando os dados DArT-seq

Produção de genotipagem DArT-seq (**Tabela 1 suplementar**) consistindo em uma matriz “ausência/ presença” (0/1) para cada espécie de Arapaimidae e Notopteridae (colunas) para um dado alelo ID (linhas), em que os SNPs foram classificados com bases em diferentes medias estatísticas. Uma visão geral dos dados de genotipagem mostrou que dos 1537 alelos SNPs encontrados, 57% apresentaram mutações do tipo transição, 88% apresentaram apenas um SNP ao longo da sequência e 19% foram encontrados em heterozigose (**Tabela 1 Complementar**). Análises de componentes principais (PCA) utilizando apenas os alelos SNP, mostraram espécies de Notopteridae e Arapaimidae agrupadas de acordo com sua distribuição geográfica. Resultados parciais para Notopteridae também foram discutidos em Barby et al. (2018) (**Figura 16**).



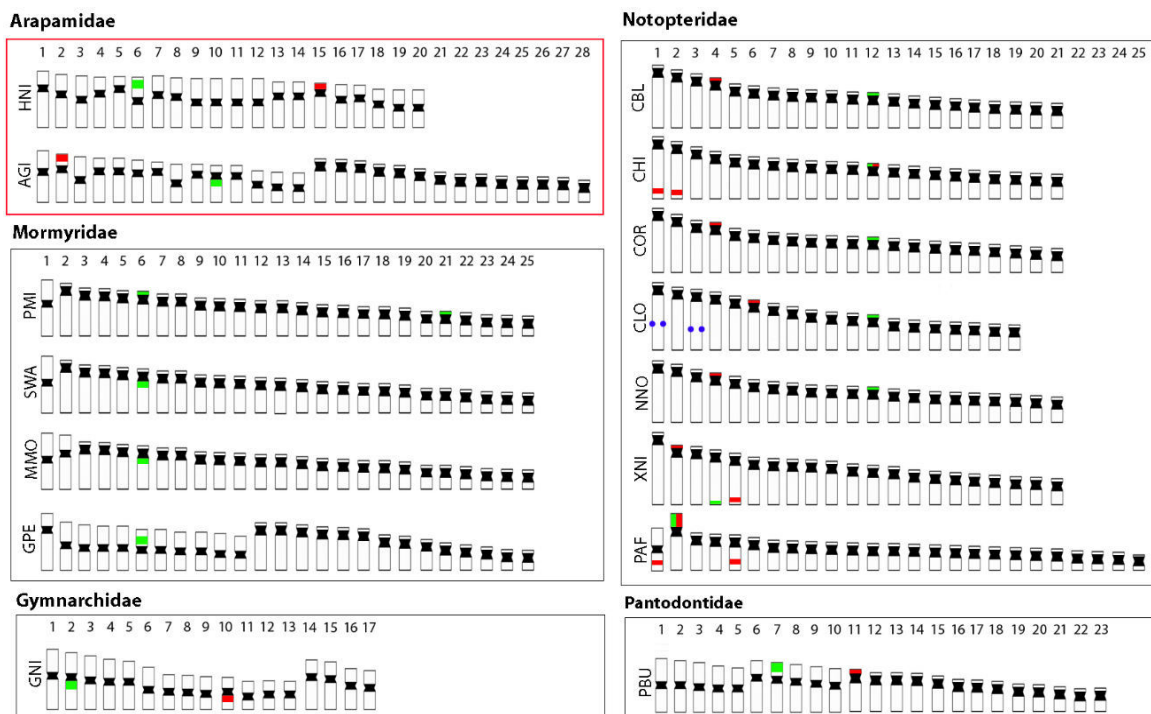
**Figura 16.** Análise de componentes principais (PCA) dos dados de SNPs de alelos DArT-seq encontrados em sete espécies de Osteoglossiformes. Mapa de fatores individuais usando 3074 alelos (alelos de referência e alternativos). Amostras Osteoglossiformes e presença/ausência de SNPs foram estruturados como observações (individuais) e variáveis, respectivamente, como dados da matriz de entrada. Gêneros Notopteridae (*Papyrocranus*, *Xenomystus*, *Notopterus* e *Chitala*) e gêneros Arapaimidae (*Heterotis* e *Arapaima*), juntamente com sua distribuição geográfica (África, Sudeste Asiático e América do Sul); as variáveis categóricas são resumidas nos quadrados preto (África), verde (Sudeste Asiático) e vermelho (América do Sul).

## Discussão

Osteoglossiformes representam uma das linhagens de teleósteos mais ancestrais, ainda que pouco estudadas, está presente em todos os continentes, exceto na Antártida. Os poucos dados provavelmente estão associados à ampla distribuição geográfica desse grupo, com táxons endêmicos a diferentes continentes, dificultando um estudo integrativo que permitiria uma visão globalizada de seus processos evolutivos. Portanto, o presente estudo enfoca na família Arapaimidae, com o objetivo de investigar esse modelo exclusivo de peixes com ferramentas de citogenética molecular avançada e citogenômica, na perspectiva de explorar e tentar esclarecer alguns eventos que moldaram a sua história evolutiva e de distribuição.

Os dados citogenéticos ainda são escassos e bastante incompletos para os Osteoglossiformes em geral, limitando o progresso na compreensão das tendências evolutivas que operam neste grupo. Apesar disso, os dados mostram que esses peixes possuem números cromossômicos diversificados, variando de 34 em *Gymnarchus niloticus* a 56 em *A. gigas* e *Osteoglossum bicirrhosum* e cariótipos dominados por cromossomos acrocêntricos na maioria das espécies osteoglossiformes (Barby et al. 2018; Da Rosa et al. 2009; Hatanaka et al. 2018). No entanto, alguns representantes das famílias Mormyridae, Gymnarchidae e Notopteridae compartilham certas características cariotípicas, como a redução do número diploide e cariótipos com a presença de cromossomos de dois braços, indicando uma relação mais próxima entre elas (Ráb et al. 2016). Por outro lado, enquanto a maioria das espécies de osteoglossiformes tendem a manter os cariótipos com cromossomos acrocêntricos, como dito anteriormente, os membros de Arapaimidae e Gymnarchidae representam exceções a esta regra geral. De fato, nossos dados demonstram  $2n = 56$  e um cariótipo composto por  $28\ m/sm + 28$  cromossomos *st/a* para *A. gigas* ( $NF = 84$ ), concordando com alguns relatos anteriores de Da Rosa et al. (2009) e Marques et al. (2006), mas diferindo de Urushido (1975). Por sua vez, *H. niloticus* apresenta  $2n = 40$  e um cariótipo composto de  $40\ m/sm$  cromossomos ( $NF = 80$ ), também diferindo do único registro de Hirata & Urushido (2000), que encontraram o mesmo número diploide ( $2n = 40$ ) mas inferiu a composição cariotípica distinta ( $26m + 10sm + 4a$  cromossomos) para uma população da África Ocidental. Alguns problemas técnicos na classificação dos cromossomos, ou mesmo para a diferenciação geográfica de *H. niloticus*, podem explicar essas discrepâncias (**Figura 13**). Além disso, a sonda DNAr 18S identificou um único locus cromossômico em ambas as espécies, com um sinal muito conspícuo e, portanto, indiscutivelmente

muito evidenciado no par 15 de *H. niloticus* e no par 2 de *A. gigas*, correspondendo aos sítios Ag-NOR em ambas espécies. A maioria das espécies de peixes Osteoglossiformes analisadas, possuem apenas um par de cromossomos contendo sequências de DNAr 18S e 5S, com algumas exceções, observadas em *C. Chitala*, *P. afer*, *X. nigri* e *Petrocephalus microphthalmus* (para referências e informações mais detalhadas sobre distribuição das sequências de DNAr 18S e 5S disponíveis até à data em outras espécies de osteoglossiformes (**Figura 17**).



**Figura 17.** Idiogramas representando  $2n$  e padrões de distribuição do DNAr em espécies osteoglossiformes. Nos cromossomos, os locais de distribuição do DNAr 18S são destacados em verde, 5S DNAr em vermelho e Interstitial Telomeric Sites (ITS) em azul. HNI = *Heterotis niloticus*; AGI = *Arapaima gigas*; PMI = *Petrocephalus microphthalmus*; SWA = *Stomatorhinus walkeri*; MMO = *Marcusenius moorii*; GPE = *Gnathonemus petersii*; RNI = *Gymnachus niloticus*; CBL = *Chitala blanci*; CCH = *Chitala chitala*; COR = *Chitala ornamentado*; CLO = *Chitala lopis*; NNO = *Notopterus notopterus*; XNI = *Xenomystus nigri*; PAF = *Papyrocranus afer*; e PBU = *Pantodon buchholzi*. Os dados são baseados em Barby et al. (2018); Hatanaka et al. (2018) e Ozouf-Costaz et al. (2015).

Um único sítio (isto é, um par de loci) para cada agrupamento de DNAr parece ser também a tendência geral relatada para a maioria dos teleósteos (Gornung, 2013; Sochorová et al. 2018) e para os antigos peixes actinoptérigeos não teleósteos (Majtánová et al. 2017; Symonová et al. 2017). A localização de tais sequências em posições semelhantes de cromossomos semelhantes podem ser evidências de

cromossomos homeólogos, veja mais em Milhomem et al. (2013). Entre os Arapaimidae, os sítios de DNAr 18S estão associados à heterocromatina rica em GC (**Figura 13**), uma característica também compartilhada com outras espécies de Osteoglossiformes, como as pertencentes às famílias Notopteridae e Gymnarchidae (Barby et al. 2018; Hatanaka et al. 2018), apoiando a visão de que provavelmente representa o padrão ancestral de peixes actinoptérgios (Symonová et al. 2017). Entretanto, além de um único sítio 18S DNAr/CMA3+, múltiplos sinais adicionais de CMA3+ também foram observados para ambas as espécies, similarmente ao padrão observado em *P. buchholzi* (Ráb et al. 2016), tornando assim seus genomas uma notável exceção aos teleósteos em geral.

Para obter uma visão mais profunda da dinâmica subcromossômica em escala bruta no nível de composição e distribuição de sequências repetitivas de DNA, realizamos experimentos de CGH de maneira comparativa interespecífica. Essas comparações com CGH mostraram uma divergência genômica geral alta entre as duas espécies em estudo, como seria de se esperar, devido ao seu estágio avançado de divergência evolutiva (**Figuras 14 e 15**). De fato, ambas as sondas genômicas colocalizaram-se apenas nas regiões da NOR que geralmente mantêm um alto conservadorismo de sequências (Hillis & Dixon, 1991). Portanto, quando basicamente apenas as regiões da NOR são evidenciadas de maneira mais intensa após a hibridização cruzada, ela aponta para uma grande divergência genômica entre as duas espécies. Tal cenário também foi observado em muitas plantas e outros grupos de animais. (Por exemplo: Lim et al. (2007); Symonová et al. (2018)).

Em resumo, os genomas de *A. gigas* e *H. niloticus* apresentam notável divergência cromossômica, em termos de sua macroestrutura cariotípica, conteúdo e distribuição de DNA repetitivo. Em contraste marcante, os estudos de diversidade genômica através de análises de PCA, demonstraram uma distância genética muito baixa entre esses peixes no nível de regiões de sequências de cópia única (**Figura 16**). Este cenário contrasta ainda mais profundamente com o encontrado para os representantes africanos e asiáticos dos antigos knifishes, família Notopteridae, onde um padrão oposto foi descoberto, ou seja, cariótipos altamente conservados, apesar de pelo menos 80 Ma de isolamento entre as espécies (Barby et al. 2018). Assim, o que teria contribuído para essa enorme diversidade cromossômica e a baixa distância genética entre as espécies de Arapaimidae?

Embora separados por mais de 50 a 80 Ma (Lavoué, 2016), *A. gigas* e *H. niloticus* ainda mantêm algumas características morfológicas, fisiológicas e comportamentais semelhantes, como respiração branquial e aérea obrigatória, preferência por ambientes lênticos pouco oxigenados, baixa atividade migratória e atividades de cuidado parental com a prole. Conseqüentemente, ambas as espécies são sedentárias, vivendo em pequenas populações com alto grau endogamia (Adite et al. 2005; Hrbek et al. 2005). Estudos moleculares de espécimes da bacia amazônica utilizando marcadores microssatélites e genes mitocondriais mostraram que diferentes populações de *A. gigas* apresentam um pequeno grau de isolamento por distância e fragmentação apenas em populações separadas por distâncias maiores que 1000 km (Araripe et al. 2013; Hrbek et al. 2005). De fato, a maior variabilidade cariotípica geralmente está presente em grupos de peixes com baixa mobilidade e estabelecimento de pequenas populações isoladas, em contraste com espécies de peixes caracterizadas por maior mobilidade e densidade populacional (Bertollo et al. 1986). Nesse contexto, os rearranjos cromossômicos se espalham e se instalam mais facilmente em pequenas populações, onde a probabilidade de gerar formas rearranjadas homozigotas, livres de problemas de segregação meiótica, é maior do que em grandes populações (Pellestor et al. 2011). A especiação tem sido vista como resultado de processos aleatórios que requerem isolamento geográfico (Bird et al. 2012).

No entanto, esta perspectiva mudou recentemente e a evolução das barreiras reprodutivas sem isolamento espacial é agora considerada um cenário plausível (Smadja & Butlin, 2011). Em sua fase inicial, a especiação com o fluxo gênico é supostamente caracterizada pela forte seleção disruptiva em alelos localmente adaptados, resultando em ilhas genômicas de divergência, que tendem a se disseminar por meio de caronas genéticas. A seleção é oposta ao fluxo gênico, que homogeneiza a variação nas regiões genômicas remanescentes. Novos modelos teóricos postulam que modificadores de recombinação seriam favorecidos pela seleção sob especiação com fluxo gênico (Ortiz-Barrientos et al. 2016). Desta forma, a grande diversidade de tipos cromossômicos em cariótipos de *Arapaima* em relação a *Heterotis* é o resultado de vários rearranjos cromossômicos acumulados ao longo de milhões de anos, além do acúmulo de diferentes classes de DNAs repetitivos em seus genomas. Um cenário semelhante já foi observado em outra espécie de osteoglossiformes, a aruanã asiática *Scleropage formosus*, onde DNAs repetitivos são considerados os principais contribuintes para a diversidade cromossômica observada nesta espécie (Bian et al. 2016).



Nossos dados confirmam que cariótipos altamente rearranjados tendem a ocorrer em osteoglossiformes sul-americanos. *A. gigas* ( $2n = 56$ ) e o aruanã sul-americano - *O. bicirrhosum* ( $2n = 56$ ) - possuem os  $2n$  maiores encontrados na ordem. Isso também foi documentado e verificado em peixes ciclídeos, em que representantes da região Neotropical exibem  $2n = 48$  cromossomos, com uma maior diversidade cariotípica em comparação aos africanos (Feldberg et al. 2003; Poletto et al. 2010). Vários táxons fósseis foram atribuídos aos Arapaimidae e/ou linhagens estreitamente relacionadas (**Figura 11**), e, embora suas inter-relações evolutivas não estejam bem estabelecidas (Guo-Qing et al. 1997; Hilton, 2003; Li et al. 1996; Taverne, 1998), não podemos desconsiderar que os números  $2n$  intermediários tenham ocorrido entre ele e os *A. gigas* e *H. niloticus* existentes.

### **Conclusões**

Em conjunto, os genomas de *A. gigas* e *H. niloticus* exibiram notável divergência cromossômica e da fração repetitiva do genoma. Os resultados obtidos demonstraram algumas tendências gerais compartilhadas pela maioria dos Osteoglossiformes analisados até o momento, como a presença de apenas um par de cromossomos portadores dos sítios de DNAr 18S e 5S; cariótipos dominados por cromossomos acrocêntricos; e sítios de DNAr que estão associados a heterocromatina rica em GC, apoiando a visão de que estas características provavelmente representa o estado ancestral para os peixes teleósteos. Por outro lado, a diversidade genômica estudada através de análises de PCA demonstrou uma distância genética muito baixa entre estes peixes, apesar de histórias evolutivas separadas abrangendo aproximadamente 50 a 80 Ma (Lavoué, 2016).

### **Referências bibliográficas**

As referências bibliográficas deste capítulo encontram-se reunidas no final desta tese.

**Estabilidade cromossômica, estrutura populacional e história demográfica no gênero *Arapaima* (Teleostei, Osteoglossiformes) sugerem a colonização da bacia Tocantins-Araguaia a partir da bacia Amazônica**

De Oliveira EA<sup>1,2</sup>, Perez MF<sup>1</sup>, Bertollo LAC<sup>1</sup>, Ráb P<sup>3</sup>, Gestich CC<sup>1</sup>, Ezaz T<sup>4</sup>, Souza FHS<sup>1</sup>, Viana PF<sup>5</sup>, Feldberg E<sup>5</sup>, Oliveira EHC<sup>6</sup>, Cioffi MB<sup>1</sup>

**Submetido**

## Resumo

A região Neotropical exibe a maior diversidade de peixes de água doce do mundo e a história demográfica de vários clados está relacionada com a história geomorfológica e climática desta região. Portanto, métodos analíticos de alta resolução são necessários para o melhor entendimento dessa grande diversidade. Duas das principais bacias hidrográficas da região Neotropical, a Amazônica (Am) e a Tocantins-Araguaia (To-Ar) são altamente dendríticas e ecologicamente diversas. Elas são ricas em peixes endêmicos, incluindo um de seus representantes mais emblemáticos o pirarucu, espécie do gênero *Arapaima* (Teleostei, Osteoglossiformes). Aqui, avaliamos a diversidade citogenômica e a história demográfica do pirarucu, combinando abordagens como citogenética molecular, análise de genética de populações utilizando SNPs e seleção de modelos de aprendizagem profunda. Foram analisadas amostras de quatro populações naturais da bacia Am, três da bacia To-Ar além de amostras oriundas de três pisciculturas. Observamos um nível maior de diversidade genética nas populações da bacia Am, quando comparado ao observado na bacia To-Ar. Além disso, encontramos uma alta diferenciação genética entre as populações das diferentes bacias. Ao incluirmos amostras de piscicultura, foi possível evidenciar o ancestral mais provável das matrizes reprodutoras, levantando preocupações sobre o uso de reprodutores fora da distribuição de sua população genética. Não houve diferenciações cromossômicas significativas na estrutura cariotípica e nas composições de DNAs repetitivos mapeados entre as populações estudadas. Embora as principais vias para a colonização de *Arapaima* na América do Sul ainda não estejam claras, as redes neurais convolucionais (CNN) aplicadas aos nossos dados empíricos indicam um cenário no qual a bacia do Am foi a primeira a ser colonizada, seguida da bacia To-Ar. Outros estudos devem se concentrar em uma reconstrução biogeográfica histórica mais ampla da ordem Osteoglossiformes, que pode potencialmente explicar sua relação com o rompimento do Gondwana e a presença deste táxon na América do Sul.

## Introdução

A região Neotropical exibe um dos maiores níveis de biodiversidade do mundo (Rull, 2018; Silvestro et al. 2018a). Dentro desta região, a Amazônia destaca-se pela excepcional riqueza de espécies (Fine & Lohmann, 2018; Silvestro et al. 2018b). A bacia do rio Amazonas (Am) contém a fauna de peixes mais especiosa do mundo (Reis et al. 2016), um resultado provável de sua complexa história geomorfológica e climática (Figueiredo et al. 2009; 2010; Hoorn et al. 2017; Van Soelen et al. 2017). Essa intrincada história também é refletida por seus complexos padrões biogeográficos (Dagosta & Pinna, 2017; Ribas et al. 2012). A bacia do Tocantins-Araguaia (To-Ar), embora não seja um afluente da bacia amazônica, já que flui diretamente para o Atlântico (Carvalho & Albert, 2012 é considerada parte da ecorregião aquática da Amazônia (Albert & Reis, 2011; Dagosta & Pinna, 2017). Um alto nível de espécies endêmicas é observado na Bacia To-Ar, maior inclusive, que o presente nas outras bacias do escudo brasileiro e comparável aos níveis observados na Amazônia, provavelmente devido a conexões históricas com esta última (Albert & Reis, 2011; Dagosta & Pinna, 2017; Rossetti & Valeriano, 2007). A bacia To-Ar está localizada em uma região tectônica ativa, e sua fauna aquática é possivelmente o resultado da troca com as cabeceiras de todas as grandes drenagens vizinhas (Bloom & Lovejoy, 2012; Lima & Ribeiro, 2011). A avaliação da diversidade genética e cromossômica em táxons que ocorrem em regiões com uma história geomorfológica e climática tão intrigante pode fornecer evidências sobre os processos evolutivos que atuam na biodiversidade dessas bacias.

Entre as ordens de peixes com representantes nas bacias Am e To-Ar, os Osteoglossiformes destacam-se por ser uma das três primeiras linhagens irmãs de todos os outros teleósteos modernos (Arratia, 1999; Hilton & Lavoué, 2018; Near et al. 2012) e é restrita a água doce (Lundberg, 1993). As espécies de Osteoglossiformes são naturalmente distribuídas ou introduzidas em todos os continentes, com exceção da Antártida (Adite et al. 2005; Hilton & Lavoué, 2018; Nelson et al. 2016). Atualmente, esta ordem compreende seis famílias, Pantodontidae, Notopteridae, Gymnarchidae, Mormyridae, Osteoglossidae e Arapaimidae. No entanto, alguns autores recentemente consideram os Arapaimidae como subfamília Arapaiminae, dentro da família Osteoglossidae (Cavin, 2017; Nelson et al. 2016). Aqui, consideraremos o status de família para Arapaimidae, sendo composta por apenas dois gêneros existentes, o africano monotípico *Heterotis* Rüppell (1829), e o sul-americano *Arapaima* Müller

(1843) (Nelson et al. 2016). O gênero *Arapaima* é amplamente distribuído em grande parte das bacias To-Ar e Am no Brasil e no Peru (Castello, 2008; Reis et al. 2003) e representa uma das maiores espécies de peixes de água doce, com alguns indivíduos atingindo até 200 kg de massa corporal e até quatro metros de comprimento (Nelson et al. 2016; Stone, 2007; Bezerra et al. 2013). O gênero *Arapaima* foi considerado monotípico por muitos anos, com *A. gigas* sendo a única espécie válida. No entanto, Stewart (2013a) e (2013b) analisou cuidadosamente os tipos existentes desta espécie e descobriu que eles representam espécies facilmente diagnosticáveis. Como resultado, o autor descreveu formalmente a nova espécie *A. leptosoma* e indicou duas outras ainda não formalmente descritas (Stewart, 2013a; 2013b).

Estudos citogenéticos em espécies de Arapaimidae ainda são escassos onde apenas alguns estudos foram realizados para o pirarucu na bacia To-Ar (Da Rosa et al. 2009; De Oliveira et al. 2019, Marques et al. 2006), envolvendo a descrição cariotípica, o mapeamento dos genes ribossômicos 18S e 5S e alguns outros bandamentos cromossômicos convencionais. Estudos prévios sobre a diversidade genética das populações de pirarucu com marcadores moleculares apontaram, em geral, a ausência de estruturação genética nas bacias do Am e do Baixo Tocantins, e uma estruturação mais pronunciada na porção superior da bacia To-Ar. Essas análises anteriores focaram em poucas sequências de mtDNA (Hrbek et al. 2005) e marcadores nucleares associados a regiões repetitivas (Hrbek et al. 2007; Leão, 2009; Vitorino et al. 2015; 2017). Diferentemente da maioria das tecnologias que obtêm sequências genômicas aleatórias, tais como CRoPS (Redução da Complexidade de Sequências Polimórficas), GBS (Genótipo por Sequenciamento) e RAD (Restrição do Site de DNA Associado) (Baird et al. 2008; Elshire et al. 2011; Van Orsouw et al. 2007), o DArT (Diversity Arrays Technology) é um método de redução da complexidade genômica que enriquece regiões hipometiladas do genoma e, portanto, principalmente regiões ativas do genoma são recuperadas (Jaccoud et al. 2001; Kilian et al. 2012). Portanto, é possível detectar regiões genômicas que podem estar sob o efeito de pressões seletivas. Além disso, quando combinadas com tecnologias de sequenciamento de próxima geração (NGS) (Dart-Seq), milhares de SNPs podem ser gerados em um período relativamente curto, tornando-os ferramentas poderosas para a investigação genômica (Kilian et al. 2012).

Além disso, o advento da filogeografia estatística (Knowles, 2009) permitiu inferências baseadas em modelos refinados em conjuntos de dados multilocus. Usando conjuntos de dados contendo centenas de milhares de loci (Garrick et al. 2015),

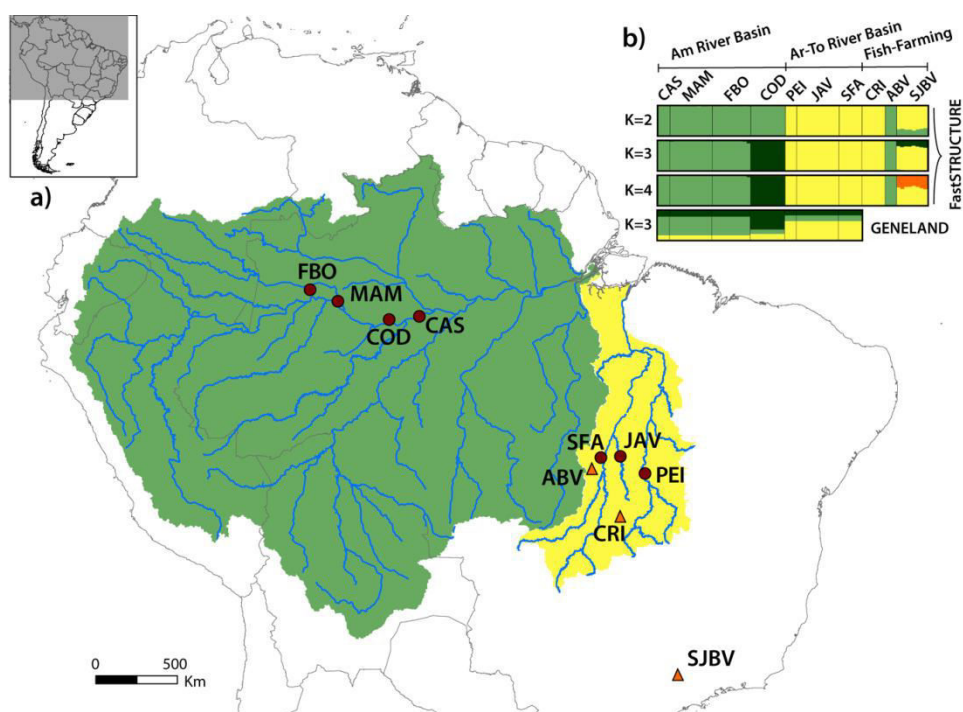
juntamente com estratégias de seleção de modelos demográficos (Carstens et al. 2013), é possível comparar cenários complexos e fazer estimativas mais precisas de parâmetros demográficos em modelos mais realistas (Thomé & Cartens, 2016). Recentemente, métodos de aprendizado de máquina e aprendizagem profunda foram incorporados em genética de populações (Schrider & Kern, 2018; Sheehan & Song, 2016) e aplicados para comparação de modelos demográficos (Flagel et al. 2018; Villanea & Schraiber, 2019). Esses procedimentos têm a vantagem de utilizar as informações presentes em grandes conjuntos de dados e altamente multivariados obtidos com o NGS, sem a necessidade de reduzir essas informações com estatísticas resumidas (Flagel et al. 2018).

Aqui, usamos a comparação de modelos de aprendizagem profunda para avaliar modelos demográficos em diferentes populações de *Arapaima* e testar explicitamente se: (1) espécimes das duas bacias podem ser considerados uma única população genética; (2) a população localizada na bacia Am foi colonizada pela bacia To-Ar; ou (3) ocorreu a via de colonização oposta, com Am colonizando To-Ar. Para isso, integramos abordagens de citogenética molecular (mapeamento de DNAs repetitivos, hibridização genômica comparativa) e análises genéticas baseadas em SNPs derivados de sequenciamento DArT-seq para estimar sua diversidade genética e cromossômica.

## Material e métodos

### Indivíduos examinados e extração de DNA

Espécimes de pirarucu foram coletadas de sete localidades das bacias dos rios Am (quatro pontos de amostragem) e To-Ar (três pontos de amostragem). Além disso, amostras de três diferentes pisciculturas foram analisadas (**Figura 18 e Tabela 1**). Os indivíduos foram amostrados utilizando armadilhas (redes de espera de nylon) e, após a captura, os animais foram transportados para a estação de pesquisa ou processados em campo. A coletas tiveram autorização prévia das agências ambientais brasileiras ICMBIO / SISBIO (Licença nº 48290-1) e SISGEN (A96FF09), os espécimes foram depositados nas coleções de peixes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) (**Tabela 1**). Foram coletados fragmentos de fígado de todos os indivíduos e armazenados em etanol a 96% para extração de DNA, seguindo (Sambrook & Russell, 2001). Os experimentos seguiram condutas éticas e anestésicas, de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Processo número CEUA 9506260315).



**Figure 18:** a) Mapa do Brasil indicando os locais de coleta de *Arapaima* das bacias Tocantins-Araguaia (amarelo) e Amazônia (verde), codificadas de acordo com a Tabela 1. Os locais de amostragem das pisciculturas são representados por triângulos alaranjados, enquanto as amostragens naturais são mostradas como círculos vermelhos. b) resultados do fastSTRUCTURE para K de 2 a 4 e para K = 3 na análise no GENELAND. Cada amostra é representada como uma barra vertical mostrando a proporção de seu genoma pertencente a cada um dos grupos K. Linhas pretas separam indivíduos de diferentes localidades.

## **Análises de Citogenética Convencional e Molecular**

Indivíduos de seis locais de amostragem (SFA, PEI, JAV, COD, CAS e MAM) foram analisados citogeneticamente. Os cromossomos mitóticos foram obtidos através do método descrito em De Oliveira et al. (2019). A coloração convencional foi realizada utilizando solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato, pH 6,8, durante 10 min. A heterocromatina C positiva foi detectada seguindo o protocolo descrito em Sumner (1972).

Um total de dez sequências repetitivas de DNA, incluindo três famílias multigênicas (U2 snDNA, 5S e 18S rDNAs) e sete repetições de microssatélites (A)<sub>30</sub>, (CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, (GAA)<sub>10</sub> e (GAG)<sub>10</sub> foram mapeadas por procedimentos de hibridação fluorescente in situ (FISH) seguindo Yano et al. (2017). As sondas microssatélites foram diretamente marcadas com Cy3 durante a síntese de acordo com Kubat et al. (2008). Ambas as sequências de DNAr 18S e 5S foram isoladas seguindo Cioffi et al. (2009) e Pendás et al. (1994), respectivamente. As sequências de U2 snDNA foram produzidas de acordo com Silva et al. (2015). Todas estas sondas foram diretamente marcadas com Spectrum Orange-dUTP por nick translation, de acordo com as recomendações do fabricante (Roche, Mannheim, Alemanha), com exceção do DNAr 5S, que foi diretamente marcado com Spectrum Green-dUTP, também por nick translation (Roche Mannheim, Alemanha).

## **Experimento de Hibridização Genômica Comparativa (CGH)**

Experimentos de Hibridização Genômica Comparativa (CGH) foram realizados para comparar a composição genômica de indivíduos de uma população representativa de cada bacia hidrográfica analisada: JAV (To-Ar) e MAM (Am). O DNAg da população de *Arapaima* de JAV foi comparado com o DNAg de *Arapaima* da população MAM utilizando cromossomos metafásicos de indivíduos de ambas as populações. Para esses propósitos, o DNAg de indivíduos da população MAM foi marcado com biotina-16-dUTP usando BIO-nick-translation Mix (Roche, Mannheim, Alemanha), enquanto o DNAg de indivíduos da população JAV foi marcado com digoxigenina-11-dUTP Mix DIG-nick-translation (Roche). Para o bloqueio das sequências repetitivas, utilizou-se o DNA de C0t-1 preparado de acordo com Zwick et al. (1997). O mix final da sonda para cada lâmina foi composto por 500ng de DNAg de indivíduos da população MAM + 500 ng de DNAg de indivíduos da população de JAV + 30µg de C0t-1 DNA derivado de cada espécime. As sondas foram precipitadas com



etanol e o pellet foi diluído em uma solução de hibridização contendo 50% de formamida, 2xSSC, 10% SDS, 10% de sulfato de dextrano.

### **Análise Microscópica e Processamento de Imagens**

Pelo menos 30 metáfases por indivíduo foram analisadas para confirmar o número diploide, a estrutura cariotípica e os resultados de FISH. As imagens foram capturadas usando um microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão) e processadas usando o software Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os cromossomos foram classificados como acrocêntricos (a), subtelocêntricos (st), submetacêntricos (sm) e metacêntricos (m), de acordo com suas relações de braço (Levan et al. 1964).

### **Extração de DNA e genotipagem DArTseq**

Fragmentsos de fígado foram obtidos e armazenado em etanol a 96% para extração de DNA, através do protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001). O DNAg de todos os indivíduos foi analisado com a tecnologia DArT-seq (Kilian et al. 2012) pela empresa DArT (Diversity Arrays Technology Company, Canberra, Austrália). Utilizou-se uma combinação de enzimas PstI e SphI para construir as bibliotecas utilizando os passos descritos em Kilian et al. (2012) e sequenciados na plataforma de próxima geração Illumina Hiseq2500. Os dados brutos extraídos das amostras sequenciadas foram submetidos a filtragem e convertidas em genótipos de alta qualidade utilizando o software de propriedade da DArT. Os genótipos foram codificados como uma matriz de SNPs com loci nas linhas e indivíduos nas colunas. Para cada genótipo, os dados foram armazenados como 0 para homocigotos de estado, 1 para heterocigotos e 2 para estados homocigóticos alternativos.

### **Diversidade Genética e Isolamento por Distância**

As estatísticas sumárias para diversidade genética foram calculadas usando o programa GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen, 2004) para cada localidade amostrada, a partir de estimativas de heterocigosidade esperada ( $H_E$ ), heterocigosidade observada ( $H_O$ ) e coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ). Uma matriz de  $F_{ST}$  par-a-par (Weir & Cockerham, 1984) também foi calculado entre os locais de amostragem, com significância avaliada usando 10.000 permutações.

O isolamento por distância (IBD) foi testado apenas para populações de ocorrência natural e para cada bacia separadamente. A distância geográfica simples foi usada para populações no To-Ar, já que elas se conectam na estação chuvosa. Para a bacia Am, distâncias acompanhando a extensão dos rios foram usadas. Foi realizado um teste de Mantel (Mantel, 1967) e análise de redundância canônica (RDA), um método que combina PCA e regressões múltiplas, decompondo a variância genética com base nas frequências alélicas (Orsini et al. 2012). Para o RDA, as distâncias de fluxo na bacia de Am foram transformadas em coordenadas com o comando `cmdscale` no R. Ambos os conjuntos de coordenadas espaciais foram então convertidos em polinômios ortogonais de terceiro grau, com uma versão modificada dos scripts de Meirmans (2015). Também obtivemos o componente espacial da variação genética total multiplicando a porcentagem de variação restrita pelo valor global do  $F_{ST}$ , como sugerido por Meirmans (2015).

### **Estrutura Populacional**

A estrutura populacional para todos os locais de amostragem coletados foi investigada com o método não espacial fastSTRUCTURE v. 1.0 (Raj et al. 2014), uma variação do popular método de agrupamento bayesiano STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) otimizado para grandes conjuntos de dados genotípicos. A preparação e a análise de dados foram realizadas com o auxílio do pipeline “lizards-are-awesome” (Melville et al. 2017). A estrutura populacional das localidades naturais também foi avaliada com a estratégia espacial implementada no GENELAND (Guillot et al. 2009), usando frequências correlacionadas por 500.000 iterações amostradas a cada 200. As corridas do fastSTRUCTURE foram repetidas para um intervalo de K (número de populações) de 1 a 11 e no GENELAND de 1 a 8. Os resultados de ambas as análises foram processados com a ferramenta online CLUMPAK (Kopelman et al. 2015), que simplifica o uso de DISTRUCT (Rosenberg, 2004) e CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg 2007) para resumir e plotar os resultados.

### **Seleção de Modelo Demográfico**

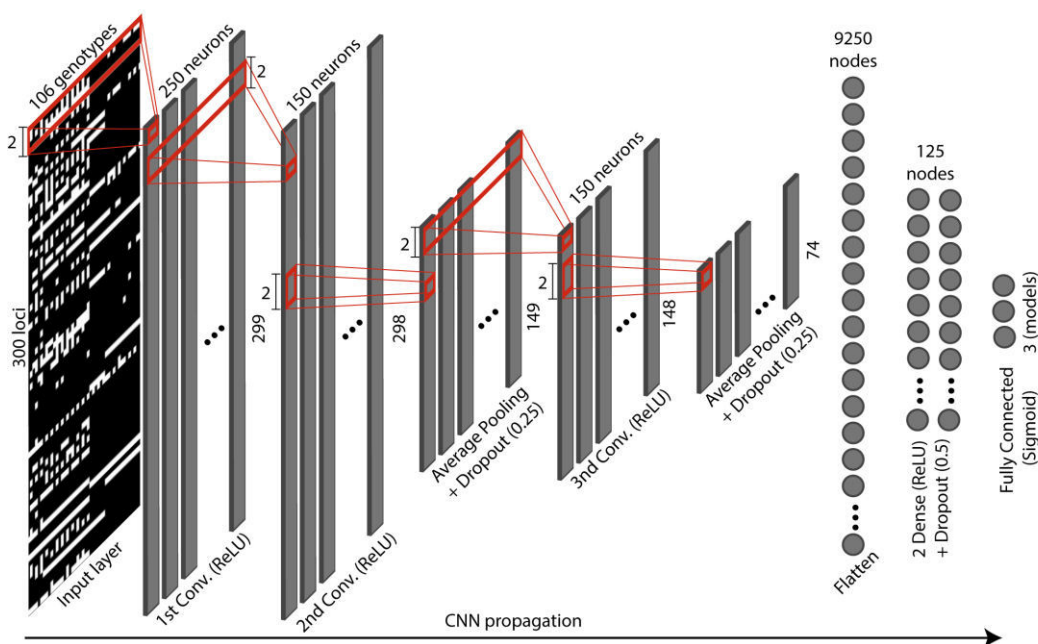
Simulamos dados genéticos similares ao conjunto de dados amostrados para localidades de ocorrência natural no programa ms (Hudson, 2002). Foram considerados três cenários possíveis para a história demográfica de *A. gigas*: (1) uma população panmítica abrigando todas as amostras coletadas nas duas bacias; (2) colonização da

bacia do Am, simulada como evento fundador seguido de expansão populacional exponencial; e (3) colonização da bacia To-Ar.

Para realizar nossas simulações de coalescência, adotamos um tempo padrão de geração, amostrado de uma distribuição uniforme de 4 a 5 anos (Hrbek et al. 2005). Foi utilizada uma taxa de mutação de  $1,25 \times 10^{-9}$  substituições por sítio por ano, calculada a partir dos tempos de divergência e quantidade de diferenças genômicas entre *A. gigas* e *Sceloporus formosus* (Vialle et al. 2018). Realizamos simulações de dados (20.000 para cada modelo) com scripts modificados de Perez et al. (2016). Os valores de  $\theta$ , o parâmetro que mede o equilíbrio mutação-deriva, foram calculados para cada simulação usando a taxa de mutação e o tamanho efetivo populacional, amostrado a partir de uma distribuição uniforme de 100 a 500.000 indivíduos, Hrbek et al. (2005) sugerem cerca de 150.000 fêmeas mortas por ano na transição dos séculos 19 a 20, com base em indivíduos comercializados). O tempo de divergência para a bacia Am e To-Ar ( $\tau_2$ ) foi amostrado a partir de uma distribuição uniforme entre 200 mil anos atrás (kya) a 2 milhões de anos atrás (Mya), que inclui a estimativa de idade do rio Tocantins para alcançar seu curso moderno, no limite entre Plioceno e Pleistoceno sugerido por Rosseti & Valeriano (2007) e 1,8 Mya sugerido por Silva-Santos et al. (2018). Para o tempo de divergência da população de Codajás em relação às outras localidades da bacia Am, foi utilizada uma distribuição uniforme entre 0-200 kya. A magnitude do efeito fundador durante a colonização (usada nos modelos 2 e 3) foi calculada como a taxa de contração durante a colonização ( $\theta_{rF-A}$ ), estimada como a razão entre o valor  $\theta$  durante o evento e esse mesmo valor na população ancestral (com distribuição variando de 0,001 a 0,1). A intensidade de expansão da população após a colonização ( $\theta_{rC-A}$ ) foi estimada como a razão entre o valor atual de  $\theta$  e o  $\theta$  da população ancestral (amostrada de 0,1 a 1).

Os diferentes cenários demográficos foram comparados usando uma abordagem recente descrita em Flagel et al. (2018). Essa estratégia é baseada na conversão das matrizes de SNPs em imagens e na extração de informações através de redes neurais convolucionais (CNNs; para detalhes do método, ver Flagel et al. (2018). Utilizando um script em python, convertemos nossos dados simulados no ms para matrizes NumPy contendo indivíduos nas linhas e loci como colunas. Então, para cada simulação, agrupamos os indivíduos por distância genética e transposemos a matriz para manter cada indivíduo em uma coluna e os marcadores como linhas. Os arranjos NumPy resultantes foram então embaralhados e 10.000 simulações aleatórias foram separadas para serem usadas como conjunto de validação, enquanto os 50.000 restantes

foram usados como dados de treinamento. Os dados de treinamento foram submetidos a uma CNN baseada na arquitetura sugerida por Flagel et al. (2018), com ligeiras modificações (**Figura suplementar 5**). Resumidamente, foram utilizadas três camadas convolucionais 1D com um tamanho de kernel de 2 (a primeira camada contendo 250 e as outras duas 125 neurônios), intercaladas com camadas de agrupamento por média, seguido por duas camadas totalmente conectadas com 125 neurônios e uma camada de saída sigmoide com 3 neurônios, correspondentes aos 3 cenários utilizados para simular os dados. A CNN foi executada com um tamanho de mini-lote de 250, com funções de ativação de unidade linear retificada e um dropout de 25% e 50% de neurônios aleatórios nas camadas convolucionais e densamente conectadas, respectivamente. Uma função de perda de entropia cruzada categórica foi usada, juntamente com a otimização de Adam (Kingma & Ba, 2015).



**Figura suplementar 5:** Esquema de treinamento de redes neurais convolucionais (CNN), aplicadas a dados empíricos de *Arapaima* das bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia.

### Modelagem Paleogeográfica

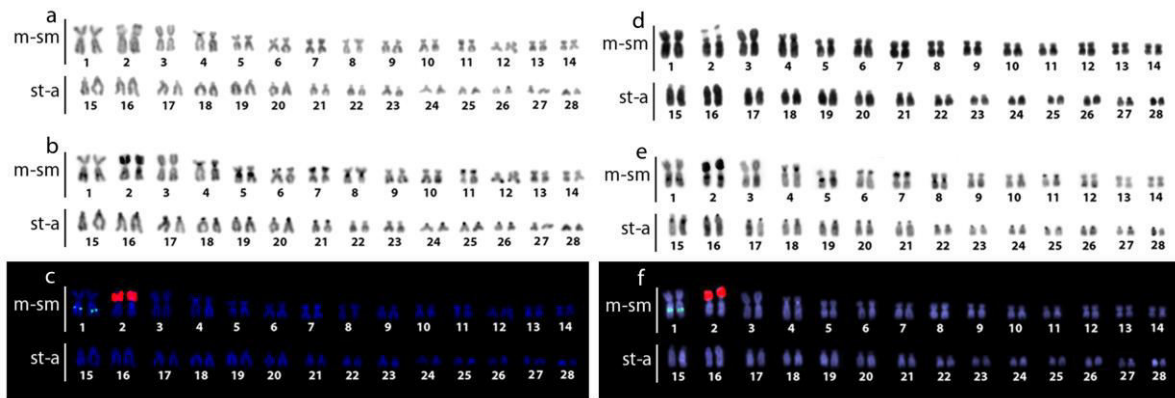
O nicho climático para *Arapaima* foi estimado a partir de 85 ocorrências naturais, baseadas em nossas coletas (8 pontos), em estudos publicados previamente (Hrbek et al. 2007) 11; (Torati et al. 2019) 4; (Vitorino et al. 2017) 1 e 57 ocorrências disponíveis na Global Biodiversity Information Facility (GBIF), que foram checados manualmente para evitar inconsistências. Foi realizada uma combinação de nove algoritmos de distribuição com o pacote biomod2 (Thuiller et al. 2009). Foram

utilizados modelos lineares generalizados GLM (McCullagh & Nelder, 1989), ranhuras de regressão adaptativa multivariada MARS (Friedman, 1991), análise de árvore de classificação CTA (Breiman et al., 1984), análise discriminante de mistura MDA (Hastie et al. 1994), redes neurais artificiais ANN (Ripley, 2014), modelos generalizados impulsionados GBM (Ridgeway, 1999), florestas aleatórias (Breiman, 2001), envelope de superfície SER (Busby, 1991) e Máxima Entropia (Phillips et al. 2006). A calibração do modelo foi realizada com as condições climáticas atuais, com resolução de 30 arco-segundos, enquanto projeções para o último máximo glaciais (LGM, 21 kya) e último máximo interglacial (120 kya) foram realizadas com uma resolução de 2,5 arco-minutos. Foi adotado um método conjunto com 5 simulações para cada algoritmo, mantendo apenas simulações com TSS maior que 0,7. Das 19 variáveis bioclimáticas disponíveis no WorldClim (Hijmans et al. 2004), 15 foram avaliadas (as variáveis 8, 9, 18 e 19 foram omitidas por terem intervalos artificiais; (Bonatelli et al. 2014) para evitar correlação. Para variáveis com alta correlação (índice de Pearson > 0,85), apenas a variável com maior capacidade explicativa foi mantida, após uma rodada preliminar.

## **Resultados**

### **Análise Citogenética**

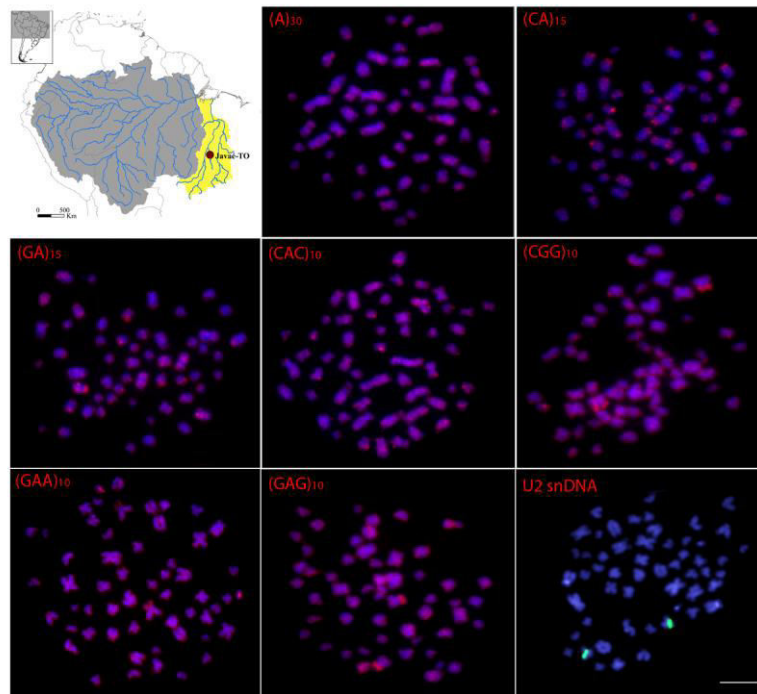
Machos e fêmeas de todas as populações analisadas apresentaram o mesmo número diploide composto de  $2n = 56$  cromossomos com fórmula cariotípica ( $28 m-sm + 28 st-a$ ) e número fundamental  $NF = 84$ . Bandas heterocromáticas C-positivas foram observados nas regiões centromérica / pericentromérica de todos os cromossomos, com alguns sítios adicionais na região telomérica para alguns pares cromossômicos. As sequências de DNAr 5S e 18S foram localizadas intersticialmente nos braços longos do par número 1 e nos braços curtos do par número 2, respectivamente (**Figura 19 e 21-25**). Estes resultados corroboram achados anteriores de (Marques et al. 2006, Da Rosa et al. 2009 e De Oliveira et al. 2019).



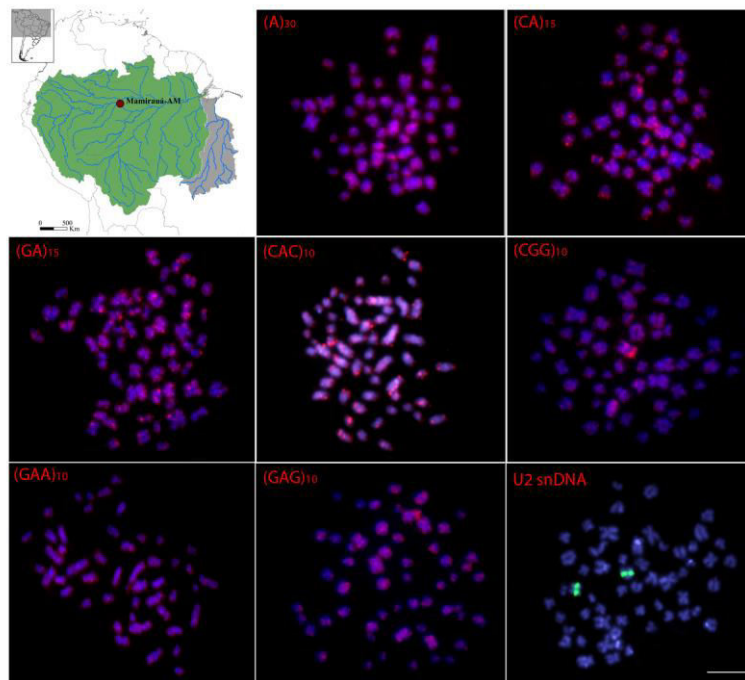
**Figura 19:** Cariótipos de *Arapaima* macho (a, b, c) e fêmeas (d, e, f) arranjados sequencialmente por coloração de Giemsa (a, d), bandeamento C (b, c) e *double-FISH* com sondas de DNAr de 5S e 18S rDNA (c, f). Barra = 5 $\mu$ m.

### Microsatélites e Distribuição de snDNA U2

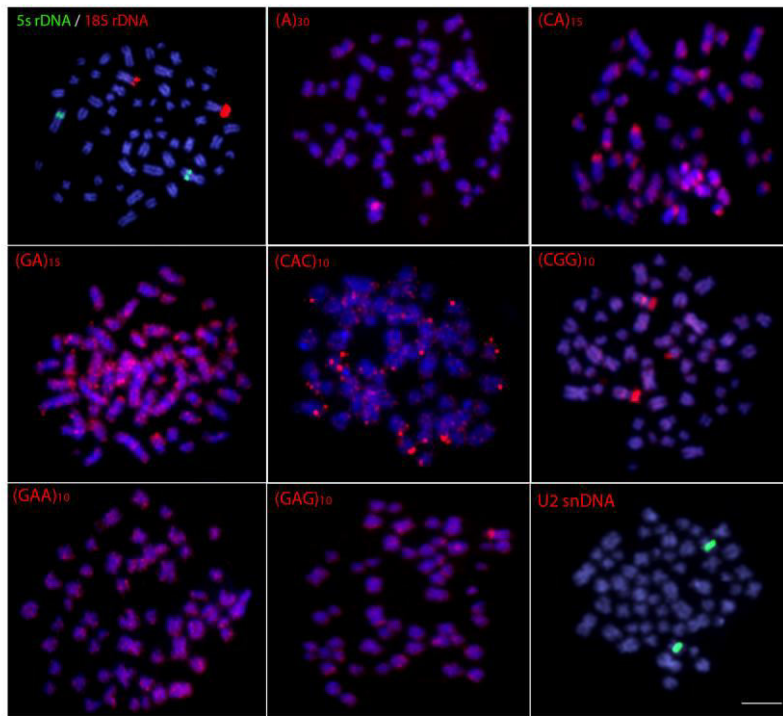
As repetições de DNAs microsatélites (GC)<sub>15</sub>, (CAA)<sub>10</sub>, (CAC)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CAT)<sub>10</sub>, (CGG)<sub>10</sub>, (GAA)<sub>10</sub> e (GAG)<sub>10</sub> apresentaram sinais intensos dispersos em todo o genoma de todos os indivíduos de todas as populações. Especificamente repetições (CGG)<sub>10</sub> exibiram marcações conspícuas coincidentes com as NORs (Regiões Organizadoras de Nucléolo). Embora alguns sinais bastante distintos para alguns microsatélites específicos tenham sido evidenciados em algumas populações, essa variação não foi substancial. O U2 snDNA foi mapeado na posição intersticial de um pequeno par acrocêntrico em todos os espécimes analisados de todas as populações. Os resultados de uma população representativa de cada bacia, ou seja, Javaé (To-Ar) e Mamirauá (MAM) foram selecionados para ilustrar os resultados (**Figuras 20-25**).



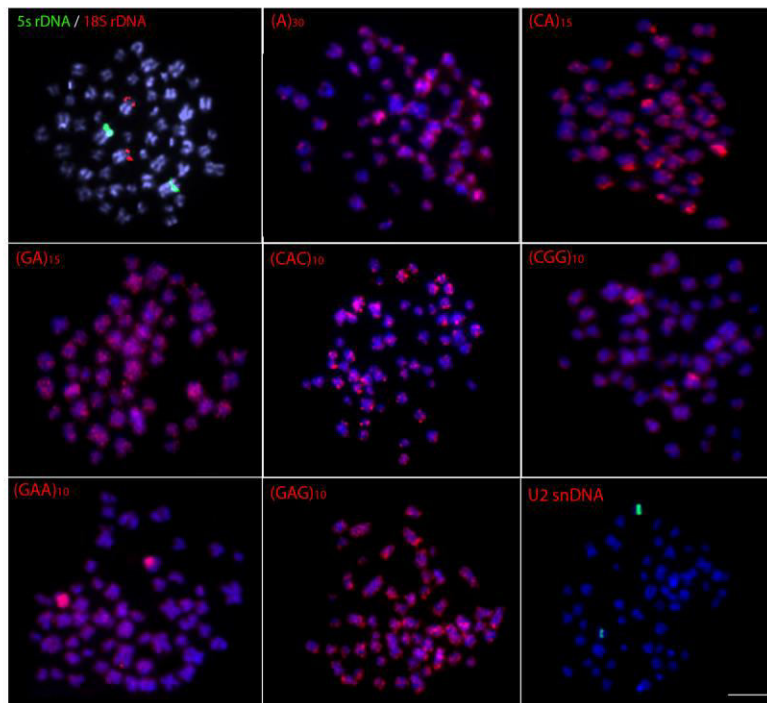
**Figura 20:** Placas metafásicas de *Arapaima* da população de Javaé (JAV) (bacia Tocantins-Araguaia) hibridizadas com sequências de DNAs repetitivos, incluindo microssatélites mono di e trinucleotídeos e as famílias multigênicas U2 snDNA. Barra = 5  $\mu$ m.



**Figura 21:** Placas metafásicas de *Arapaima* da população da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (MAM) (bacia Amazônica) hibridizadas com sequências de DNAs repetitivos, incluindo microssatélites mono di e trinucleotídeos e as famílias multigênicas U2 snDNA. Barra = 5  $\mu$ m

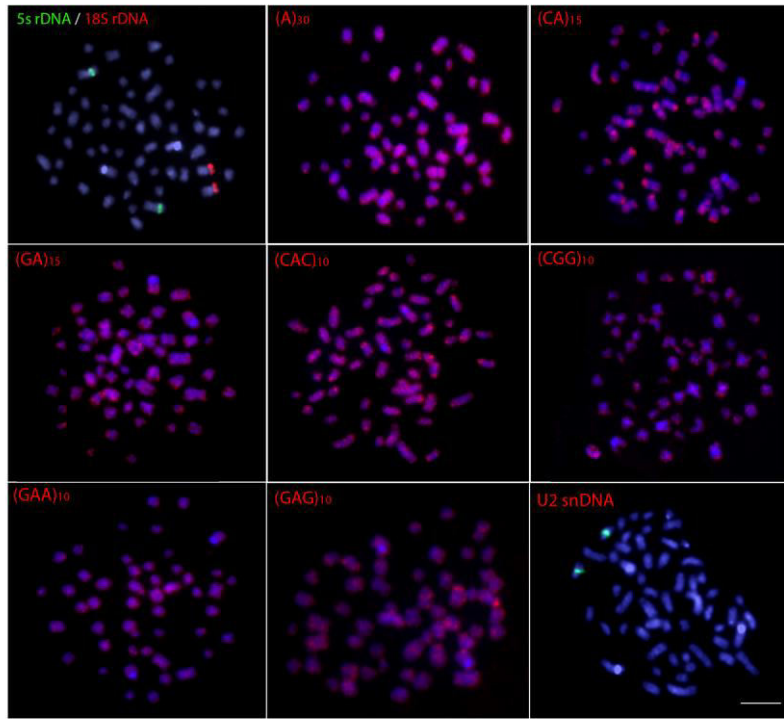


**Figura 22:** Placas metafásicas de *Arapaima* da população de Castanho, Manaus-AM (CAS), bacia Amazônica, hibridizadas com seqüências de DNAs repetitivos, incluindo microssatélites mono, di e trinucleotídeos e as famílias multigênicas U2 snDNA. Barra = 5µm.

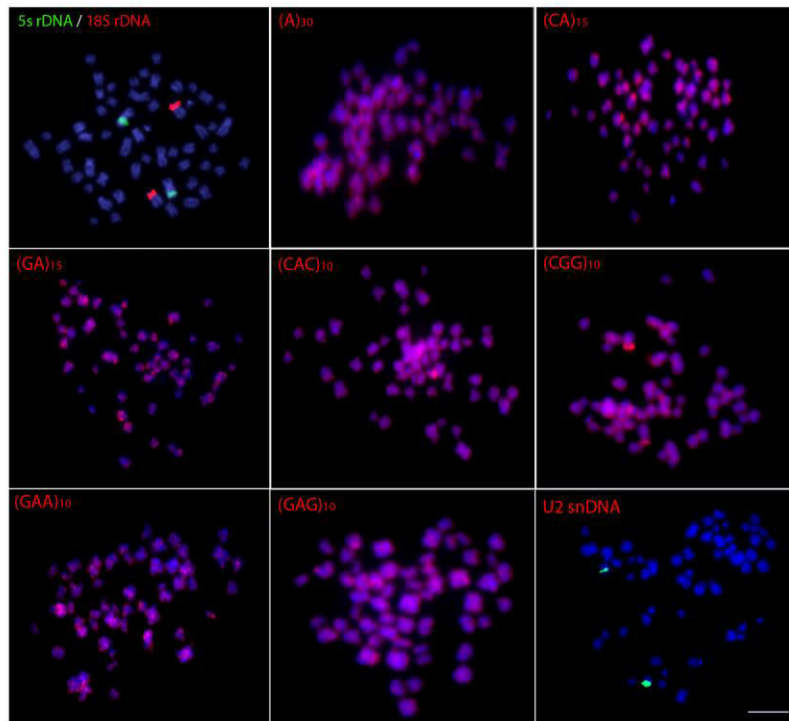


**Figura 23:** Placas metafásicas de *Arapaima* da população de Codajás, AM (COD), bacia Amazônica, hibridizadas com seqüências de DNAs repetitivos, incluindo microssatélites mono, di e trinucleotídeos e as famílias multigênicas U2 snDNA. Barra = 5µm.





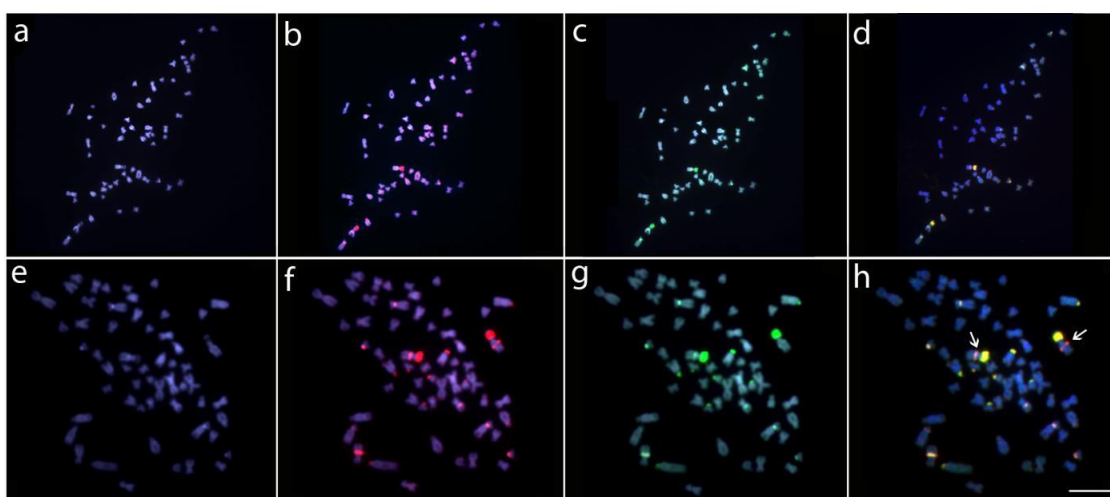
**Figura 24:** Placas metafásicas de *Arapaima* da população de Peixes, TO (PEI), bacia To-Ar, hibridizadas com sequências de DNAs repetitivos, incluindo microssatélites mono, di e trinucleotídeos e as famílias multigênicas U2 snDNA. Barra = 5µm.



**Figura 25:** Placas metafásicas de *Arapaima* da população de São Félix do Araguaia, MT (SFA), bacia To-Ar, hibridizadas com sequências de DNAs repetitivos, incluindo microssatélites mono, di e trinucleotídeos e as famílias multigênicas U2 snDNA. Barra = 5µm.

## Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

A hibridização genômica comparativa com sondas de DNA genômico de indivíduos das populações JAV (To-Ar) e MAM (Am) produziram essencialmente muitos sinais sobrepostos, destacando os blocos heterocromáticos que ocorrem nas regiões centromérica e terminal de alguns cromossomos. Alguns destes sinais foram consideravelmente mais fortes e relacionados com os principais locais de DNAr. No entanto, a hibridização contra cromossomos metafásicos de indivíduos da população MAM destacou particularmente alguns sinais super-representados, provavelmente ligados a um maior número de cópias de sequências repetitivas em algumas regiões cromossômicas (**Figura 26**).



**Figura 26:** Experimentos de Hibridização Genômica Comparativa (CGH) em cromossomos metafásicos de indivíduos de *Arapaima* das populações Javaé (JAV) (a-d) e Mamirauá (MAM) (e-h). Primeira coluna (a, b): imagens de cromossomos corados com DAPI; segunda coluna (b, f): padrão de hibridização utilizando DNAG de *Arapaima* da população MAM (vermelho); terceira coluna (c, g): padrão de hibridização utilizando o DNAG de *Arapaima* da população JAV (verde); quarta coluna (d, h) sobreposição das imagens. As regiões compartilhadas são destacadas em amarelo. As setas indicam a maior abundância de algumas repetições em indivíduos da população MAM. Barra = 5 $\mu$ m.

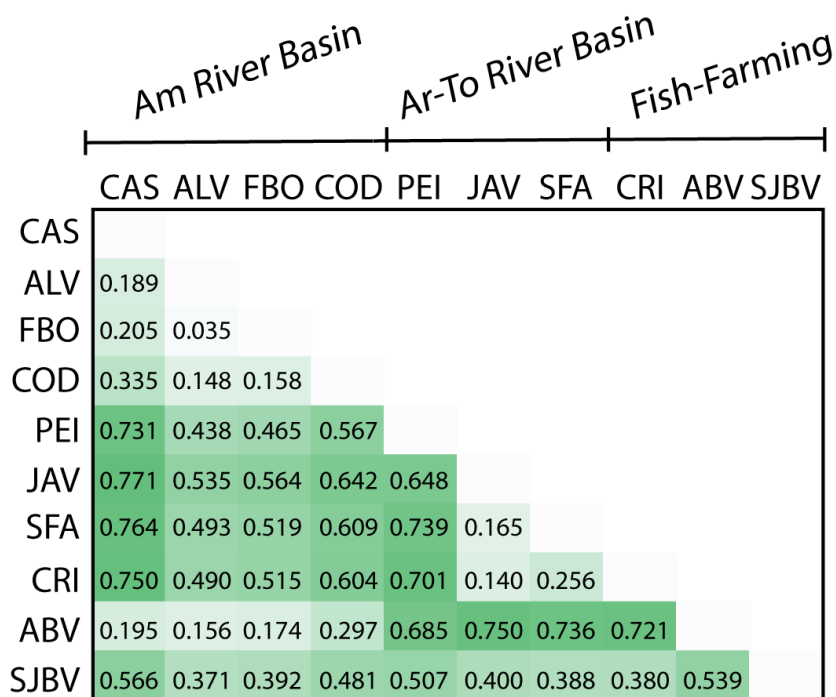
## Genotipagem DArTseq e Diversidade Genética

O sequenciamento dos marcadores DartSeq nas 70 amostras genotipadas resultou em 2.364 SNPs filtrados, com 3,14% de dados faltantes. Os níveis de diversidade foram maiores para as populações naturais na bacia Am quando comparadas com as populações naturais da bacia To-Ar (os valores de  $H_E$  e  $H_O$  foram pelo menos uma ordem de grandeza mais altos - **Tabela 2**). Amostras das pisciculturas ABV e SJBV mostraram níveis de diversidade semelhantes aos observados na bacia do Am, enquanto os níveis de diversidade dos indivíduos da piscicultura CRI foram semelhantes

aos presentes na bacia To-Ar (**Tabela 2**). O estimador de endogamia ( $G_{IS}$ ) apresentou valores negativos na maioria das localidades, exceto para MAM e FBO na bacia do Am (0,052 e 0,130, respectivamente), JAV na bacia To-Ar (0,004) e piscicultura ABV (0,113). O  $F_{ST}$  par-a-par variou de 0,035 (entre MAM e FBO) para 0,771 (entre CAS e JAV). Em geral, valores mais altos foram observados em comparações pareadas das localidades da bacia Am e To-Ar (**Figura 27**). As amostras de piscicultura mostraram padrões diversos, com CRI apresentando valores de  $F_{ST}$  mais altos quando comparados com as localidades da bacia Am, ABV com índices mais dissimilares às localidades To-Ar e SJBV mostrando valores moderados de  $F_{ST}$  em relação a todas as outras localidades (**Figura 27**).

**Tabela 2.** Estatísticas sumárias para diversidade genética, calculadas usando o GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen, 2004) para as populações amostrada de Arapaima da bacia Am e To-Ar, com estimativas de heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e coeficiente de endogamia ( $G_{IS}$ ).

População	Bacia	A	$H_O$	$H_E$	$G_{IS}$
CAS	Am	1.226	0.190	0.142	-0.336
MAM	Am	1.361	0.218	0.230	0.052
FBO	Am	1.355	0.200	0.229	0.130
COD	Am	1.306	0.229	0.183	-0.255
PEI	To-Ar	1.023	0.019	0.015	-0.265
JAV	To-Ar	1.064	0.040	0.040	0.004
SFA	To-Ar	1.058	0.044	0.037	-0.200
CRI	Farm	1.048	0.037	0.030	-0.233
ABV	Farm	1.235	0.144	0.167	0.133
SJBV	Farm	1.186	0.144	0.112	-0.292



**Figura 27:** Estatísticas sumárias para diversidade genética observada em comparações par-a-par para *Arapaima* das bacias Am e To-Ar.

### Isolamento por Distância

Comparações de distância genética e geográfica com teste de Mantel sugeriram uma pequena correlação não significativa entre as duas variáveis na bacia do Am ( $r = 0,3057$ ;  $p = 0,2917$ ) e alta correlação não significativa na bacia do rio To-Ar ( $r = 0,8771$ ;  $p = 0,1250$ ). A análise da redundância apontou para uma correlação significativa na bacia do Am ( $RDA = 0,5532$ ;  $p = 0,0417$ ), que resultou em um valor que indica ausência de IBD quando multiplicado por  $F_{ST}$  ( $RDA * F_{ST} = 0,0457$ ), segundo (Meirmans, 2015). A RDA para a bacia de To-Ar não foi capaz de selecionar nenhuma variável, sugerindo uma ausência de correlação entre distâncias geográficas e genéticas.

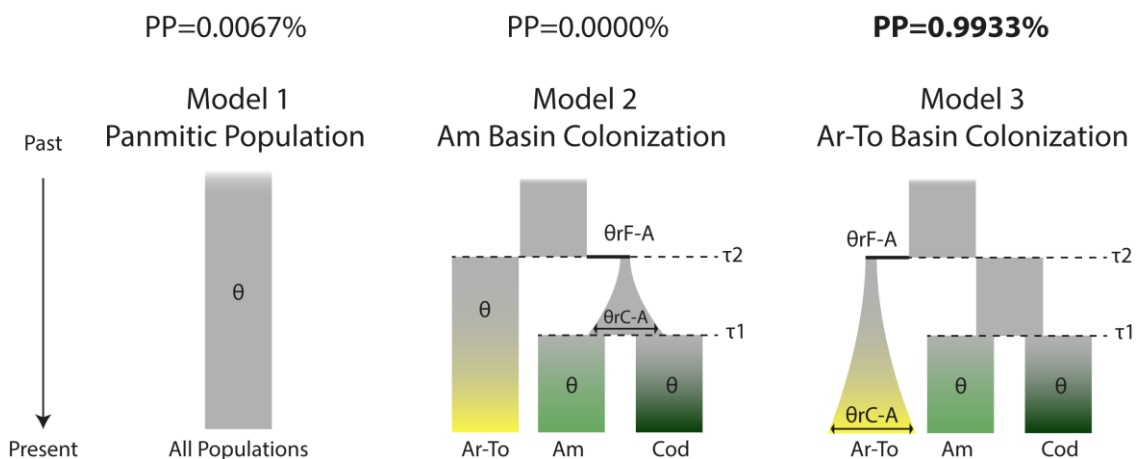
### Estrutura Populacional

Os resultados do comando chooseK no fastSTRUCTURE sugeriram uma máxima verossimilhança marginal com  $K = 2$  e  $K = 4$  como o modelo de complexidade necessária para explicar os dados. Portanto, decidimos mostrar resultados de agrupamento para 2 a 4 grupos. Todos os resultados agruparam todas as populações To-Ar, juntamente com a piscicultura CRI. Populações da bacia de Am também foram agrupadas quando  $K = 2$  foi usado, juntamente com amostras da piscicultura ABV. Quando  $K = 3$  e  $K = 4$  foram usados, a localidade COD foi alocada sozinha em um novo

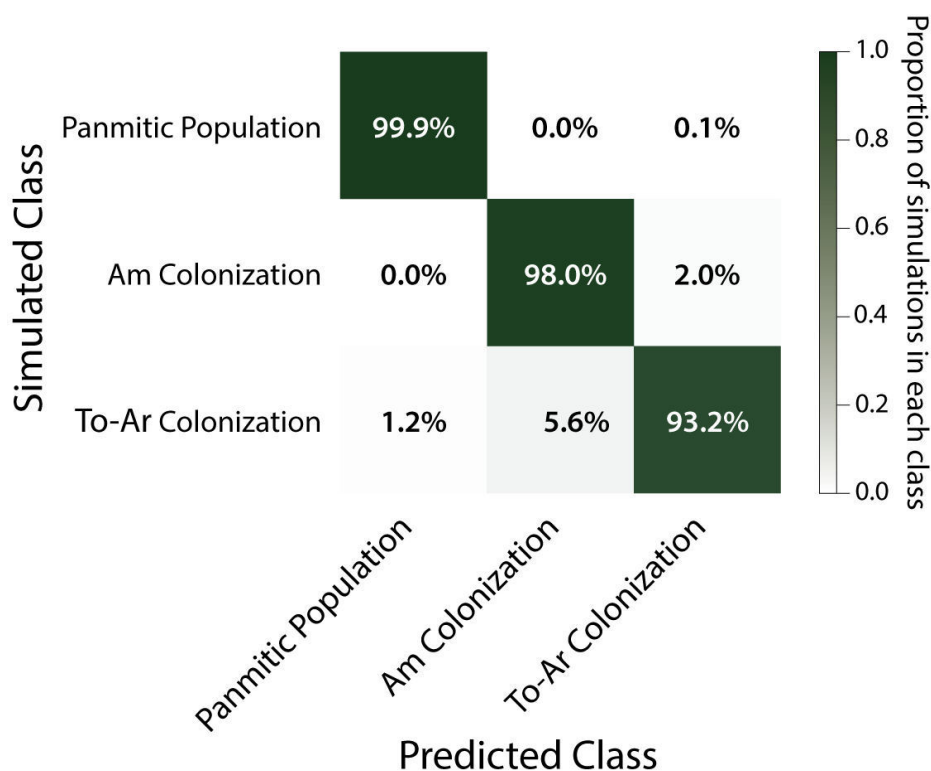
grupo. Amostras da piscicultura de SJBV apresentaram ancestralidade misturada, com a maioria do genoma pertencente à bacia do To-Ar (Figura 1). Os resultados de Geneland sugeriram três como o número ótimo de agrupamentos genéticos. O resultado obtido foi amplamente congruente com  $K = 3$  em fastSTRUCTURE, agrupando todas as populações To-Ar em um grupo, COD sozinho em um segundo grupo e as demais localidades da bacia Am em um terceiro grupo (Figura 18).

### Seleção de modelo demográfico

Com base na congruência dos resultados das duas análises de agrupamento realizadas (Figura 18), decidimos utilizar três grupos nas simulações dos cenários demográficos (Figura 28). Após 20 épocas, nossa CNN mostrou uma precisão de 0.9827 no conjunto de treinamento e 0.9705 no conjunto de validação. Nosso procedimento de validação cruzada mostrou uma alta proporção de simulações corretamente previstas para o seu modelo gerador, e os cenários de colonização foram os mais difíceis de prever com a nossa abordagem (98,0 e 93,4% das previsões corretas para colonização das bacias Am e To-Ar respectivamente), enquanto o cenário panmítico mostrou proporções muito altas de previsões corretas (99,9%) (Figura 29).



**Figura 28:** Representação gráfica dos cenários simulados testados para *Arapaima*. O modelo 1 considera a distribuição amostrada como uma população panmítica em todos os momentos; o modelo 2 simula um evento de colonização na bacia amazônica; e o modelo 3 um evento de colonização na bacia Tocantins-Araguaia. Os símbolos representam os parâmetros estimados de theta ( $\theta$ ) nas populações atuais em todos os modelos, bem como os tempos de divergência entre bacias ( $\tau_2$ ) e da população COD ( $\tau_1$ ), tamanhos populacionais durante o evento fundador ( $\theta_{rF-A}$ ) e tamanhos populacionais durante e após o evento fundador ( $\theta_{rC-A}$ ).



**Figura 29:** Validação cruzada da abordagem de aprendizagem profunda para investigar a história demográfica do gênero *Arapaima* na América do Sul

Quando os dados empíricos foram submetidos à CNN treinada, o cenário mais provável foi a colonização da bacia To-Ar (**Figura 28**), com uma probabilidade posterior (PP) de 0,9933, enquanto a colonização de Am mostrou a menor probabilidade (PP = 0,0000).

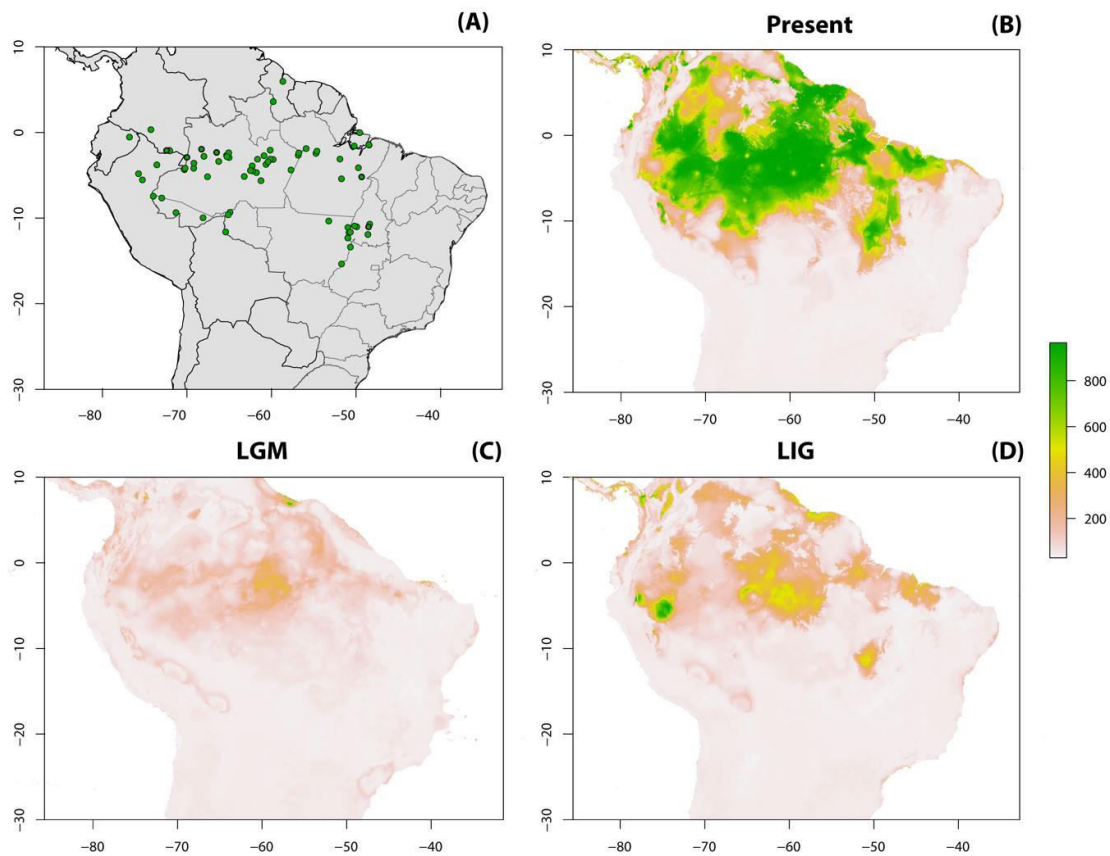
A estimativa de parâmetros (**Tabela 3**) com base no cenário selecionado sugeriu que nosso conjunto de dados contém informações para estimar com maior precisão os tamanhos efetivos da população ( $N_e$ ; RMSE = 0,186; Spearman's  $\rho = 0,765$ ) e o tempo de divisão das bacias Am e To-Ar ( $\tau_2$ ; RMSE = 0,294; Spearman's  $\rho = 0,757$ ). O tempo de divergência para COD ( $\tau_1$ ; RMSE = 0,612; Spearman's  $\rho = 0,621$ ), magnitude do evento fundador ( $\theta_{rF-A}$ ; RMSE = 0,738; Spearman's  $\rho = 0,498$ ) e magnitude do crescimento desde o evento fundador ( $\theta_{rC-A}$ ; RMSE = 0,665; Spearman's  $\rho = 0,516$ ) apresentaram menor capacidade de estimativa. O tamanho efetivo da população foi recuperado em uma magnitude similar dos tamanhos populacionais efetivos estimados por (Hrbek et al. 2005), com valor mediano de 144.089 indivíduos (Intervalo = 135.559,9-152.782,0 indivíduos). A separação das bacias Am e To-Ar foi estimada no Mioceno (Mediana = 922.058,5 anos; Intervalo = 864.8147 - 977.475,6 anos).

**Tabela 3:** Estimativa de parâmetros com base nas redes neurais convolucionais (CNN), com base nos testes de modelo. Tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ), tempo de divisão das bacias Am e To-Ar ( $\tau_2$ ), tempo de divergência para a população COD ( $\tau_1$ ), magnitude do evento fundador ( $\theta_{rF-A}$ ) e magnitude do crescimento desde o evento fundador ( $\theta_{rC-A}$ ).

Parâmetros	RMSE	Spearman's $\rho$	Mediana	Intervalo
$N_e$	0.186	0.765	144089.9	135559.9-152782.0
$\tau_1$	0.612	0.621	89489.5	84205.0-96683.2
$\tau_2$	0.294	0.757	922058.5	864814.7-977475.6
$\theta_{rF-A}$	0.738	0.498	0.0571	0.054-0.059
$\theta_{rC-A}$	0.665	0.516	0.5266	0.496-0.567

### Modelagem paleogeográfica

Após avaliar as correlações variáveis e a capacidade explicativa, apenas 7 variáveis bioclimáticas (1, 2, 3, 4, 14, 15 e 16) foram mantidas. Projeções para o presente mostraram as distribuições mais amplas, em grande parte congruentes com a distribuição atual (**Figura 30**). A projeção do período glacial (LGM) exibiu a extensão mais restrita, com uma área estável na região central da Amazônia e outra na costa norte da América do Sul. A projeção para o período interglacial LIG apresentou áreas mais estáveis que o LGM, especialmente no centro e oeste da Amazônia, na bacia do To-Ar, em algumas áreas ao longo da costa norte da América do Sul.



**Figura 30:** Modelagem da distribuição climática de *Arapaima*, construída com base nos pontos de distribuição atuais (A). Áreas climáticas adequadas são mostradas de acordo com um gradiente para o presente (B), (C) último máximo glacial (LGM - 21 mil anos) e (D) último máximo interglacial (LIG - 120 mil anos).

## Discussão

### Diversidade Cromossômica e Genética entre as Populações

Foram observadas em todas as populações analisadas características citogenéticas preservadas, representadas pela similaridade na composição cariotípica e mapeamento cromossômico de vários DNAs repetitivos. Através de uma abordagem apropriada para analisar a divergência do genoma entre espécies e/ou populações intimamente relacionadas (De Moraes et al. 2017; Sember et al. 2018; Symonová et al. 2015), as comparações do CGH mostraram uma baixa divergência genômica entre as duas populações analisadas. Processos de diversificação cariotípica e de padrões morfológicos são frequentemente indicadores do estilo de vida de uma espécie, onde o tipo de comportamento social desempenha um papel crucial (Pellestor et al. 2011; Rabosky et al. 2013). O pirarucu é considerado uma espécie sedentária, ou seja, de baixa atividade migratória, com preferência por ambientes lânticos pouco oxigenados, com cuidados parentais especializados e alto grau de endogamia (Hrbek et al. 2005).



Entretanto, espécies de peixes com tal conjunto de comportamentos, geralmente apresentam uma alta variabilidade cariotípica entre suas populações, como demonstrado anteriormente para espécies do gênero *Channa* (Cioffi et al. 2015), família Erythrinidae, *Hoplias malabaricus* e *Erythrinus erythrinus* (revisado em Cioffi et al. 2012) e Synbranchidae, *Synbranchus marmoratus* e *Monopterus albus* (revisado em (Supiwong et al. 2019), entre outros. Essa baixa diferenciação evolutiva entre populações de *Arapaima* não foi observada em nossas análises de conjuntos de dados de SNPs. Detectamos baixos níveis de diversidade genética para as populações de *Arapaima* da bacia To-Ar, mas a diversidade na bacia Am foi maior e comparável à diversidade de SNPs observada em outros táxons da mesma região. A menor diversidade genética nas populações To-Ar, especialmente na porção superior da bacia, também foi observada em estudos anteriores (Leão, 2009; Vitorino et al. 2015; 2017; Torati et al. 2019).

Este padrão de baixa variação citogenética não acompanhado totalmente pela diversidade genética pode estar relacionado a vários fatores. Primeiro isso pode ser o resultado do efeito homogeneizador da migração, impedindo a variação do estabelecimento no nível cromossômico, mas não no nível de sequências de nucleotídeos. A dinâmica hidrológica das regiões onde o pirarucu é atualmente encontrado mostra longos períodos de inundação e ciclos de fluxo, permitindo a migração desses peixes por um período mais longo, um processo conhecido como migração lateral (Castello, 2008). Além disso, como os rios da bacia To-Ar estão situados em uma depressão tectônica ativa, que resultou no desenvolvimento de extensas planícies aluviais, há evidências de trocas de ictiofauna entre as cabeceiras do rio Tocantins e todas as principais drenagens fluviais com as quais tem limites, incluindo vários pertencentes à bacia amazônica (por exemplo, rio Xingu) (Lima & Ribeiro, 2011; Rossetti & Valeriano, 2007). Em segundo lugar, juntamente com várias outras espécies de peixes, esta espécie mostrou um declínio na diversidade genética e populacional devido à perda de habitats naturais e sobre-exploração comercial (Allan et al. 2005; Castello et al. 2011). De fato, seu comportamento de respiração aérea obrigatória e os ambientes lênticos onde esta espécie habita a torna um alvo fácil para a pesca. Por causa disso, o gênero *Arapaima* foi recentemente listado como "vulnerável" na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN. Além deste recente declínio resultante de atividades antropogênicas, nossas reconstruções paleogeográficas indicaram que durante o último período glacial a distribuição do pirarucu foi restringida sob condições climáticas severas, com habitats climáticos adequados dispersos e áreas

restritas de refúgio (**Figura 30**). Essas flutuações do tamanho das populações podem ter resultado em uma redução demográfica acentuada causando um gargalo populacional (Lande, 1988; Wright, 1931). Em conjunto, estas características possivelmente desempenharam um papel importante na formação da diversidade genética moderna e ausência de variação cromossômica observada entre as populações desta espécie, implicando que o padrão de diferenciação observado entre populações distintas está provavelmente mais relacionado a características hidrológicas históricas regionais, mudanças climáticas e sobre-exploração.

Além das diferenças nos níveis de diversidade genética, nosso conjunto de dados SNPs recuperou uma estrutura que separa as populações de bacias diferentes, sugerindo também diferenças na distribuição da diversidade genética. Análises prévias da estrutura populacional das populações de *Arapaima* das bacias do Am e do baixo To-Ar apontaram a ausência de estrutura genética (Hrbek et al. 2005; 2007) ou separaram populações genéticas nas duas bacias (Araripe et al. 2013). No entanto, um estudo recente analisando o polimorfismo genômico através do sequenciamento ddRAD de pirarucu, incluindo amostras das bacias Am, Alto e baixo To-Ar, encontrou uma alta estrutura genética entre as duas bacias, com a porção baixa do To-Ar mostrando ancestralidade mista (Torati et al. 2019). Também encontramos uma subestrutura genética na bacia do Am, com COD sendo atribuído a um grupo separado das populações remanescentes. Outro ponto importante é que os indivíduos analisados da piscicultura ABV, que está localizada dentro da área da bacia To-Ar, apresentaram genótipos associados às populações do Am, enquanto SJBV localizada na região sudeste do Brasil, longe da área natural de ocorrência de *Arapaima*, apresentou indivíduos com composição genética mista com maior percentual da bacia To-Ar (**Figura 18**).

### **História Demográfica**

A história completa da colonização sul-americana por peixes Arapaimidae não está totalmente esclarecida. Lavoué (2016), utilizando marcadores nucleares e calibrando as análises com registros fósseis, estimou que o tempo de divergência entre as duas linhagens de Arapaimidae (ou seja, *Arapaima* e *Heterotis*) ocorreu entre um intervalo de 85-50 Ma. No entanto, os dados sugerem que a África e a América do Sul começaram a se separar no início do Cretáceo, terminando lentamente no meio do Cretáceo 120 a 110 Ma (Pindell et al. 1988). Portanto, as dispersões transoceânicas

diretas parecem improváveis por duas razões principais. Em primeiro lugar, estes peixes são sobretudo de água doce, principalmente intolerantes à água salgada (Myers, 1949). Em segundo lugar, mesmo se os considerássemos como organismos cujos ancestrais nem sempre tivessem vivido sempre em água doce e que invasões independentes de água doce tenham ocorrido muito cedo no Cretáceo, ainda não foram encontrados registros fósseis de osteoglossomorfos marinhos para este período (Bonde, 2008), tendo em vista que o Cretáceo é o período Mesozoico com o mais rico registro fóssil de peixes de água doce (Cavin et al. 2007). Hilton & Lavoué (2018), especularam que a geodispersão entre a África e a América do Sul (ou vice-versa) através da rota holártica pode ter ocorrido do final do período Cretáceo até o Eoceno, explicando sua presença atualmente na América do Sul.

Independentemente da trajetória, a presença desses Arapaimidae na América do Sul é verificada desde o Cretáceo, uma vez que os registros fósseis para a subfamília dessa região variam do Cretáceo Inferior ao Paleoceno no Brasil e na Bolívia. Os fósseis brasileiros incluem o Cretáceo Inferior †*Laellichthys* da Formação Areado (Aptian, (Lundberg & Chernoff, 1992) e táxon indeterminado do Cretáceo Superior da Formação Adamantina Turonian-Santonian, (Bertini et al. 1993; Candeiro et al. 2006). Nossos resultados indicam um cenário em que a colonização sul-americana por esses peixes começou na bacia do Am, com uma colonização subsequente da bacia To-Ar a partir da população da bacia Am (**Figura 23**). A abordagem de comparação de modelos adotada aqui, baseada em CNNs, permite obter informações diretamente das matrizes de SNP, sem o uso de estatísticas sumárias. Além disso, ao contrário de outras abordagens de teste de modelo baseadas em uma etapa de rejeição, que descartam a maioria das simulações e deixam apenas uma pequena parte que é mais semelhante aos dados empíricos como o pacote ABC (Csilléry et al. 2012), CNNs usam informações de todo o conjunto de simulações para aprender a distinguir entre cenários concorrentes. Essas características resultaram em uma alta capacidade de distinguir entre os modelos de colonização simulados em nosso conjunto de dados (**Figura 29**).

A etapa de estimação dos parâmetros sugeriu que a colonização de To-Ar ocorreu durante o Pleistoceno ( $\tau_2$ ; mediana = 922.0585 kya). Essa estimativa está de acordo com a idade sugerida no limite Plioceno-Pleistoceno para o desmembramento definitivo das bacias Am e To-Ar com base nos sedimentos fluviais (Rossetti & Valeriano, 2007). Embora as idades estimadas a partir de árvores filogenéticas datadas com base no mtDNA em *Inia* (Hrbek et al. 2014) e no mtDNA e dois marcadores

nucleares em *Salminus* (Machado et al. 2018) fossem mais antigas que nossas estimativas, os intervalos de confiança também foram colocados no limite Plio-Pleistoceno. O tamanho estimado da população efetiva também foi altamente concordante com uma estimativa anterior desse parâmetro usando marcadores de DNA (Hrbek et al. 2005). Os parâmetros restantes apresentaram menor acurácia em suas estimativas quando os dados simulados foram avaliados por RMSE e Spearman's  $\rho$ , mas os valores estimados sugeriram uma separação muito recente da população COD ( $\tau_1$ ; mediana = 89489,5 kya; intervalo = 84205,0-96683,2 anos), um forte gargalo durante a fundação da bacia To-Ar ( $\theta_{rF-A}$ ; mediana = 0,0571; intervalo = 0,054-0,059), e um tamanho populacional atual para To-Ar que é aproximadamente metade do tamanho estimado para a bacia Am ( $\theta_{rC-A}$ ; Mediana = 0,5266; Intervalo = 0,496-0,567).

## Conclusões

Nossas análises mostraram níveis mais altos de diversidade genética para as populações da bacia Am do que na bacia To-Ar. Populações de bacias separadas foram recuperadas como diferentes grupos na análise estrutural, com uma subestrutura adicional na bacia do Am. Fomos capazes de traçar a ancestralidade de peixes de diferentes pisciculturas, e nossos resultados levantaram preocupações sobre o uso de reprodutores em pisciculturas localizadas fora da ocorrência natural de seu grupo genético, pois isso pode resultar em depressão exogâmica.

A falta de variação cromossômica na estrutura cariotípica e nas comparações das sequências de DNAs repetitivos pode ser o resultado de influências do estilo de vida da espécie. Embora os principais caminhos para a chegada dos Arapaimidae na América do Sul ainda não estejam claros, o cenário mais provável foi a colonização da bacia To-Ar por uma população ancestral da bacia Am. Estima-se que este evento tenha ocorrido durante o Pleistoceno, de acordo com a idade sugerida no Plio-Pleistoceno para a separação definitiva das bacias Am e To-Ar. Estudos futuros focarão a reconstrução biogeográfica da história de diversificação da ordem e testarão hipóteses biogeográficas que potencialmente explicam a estreita relação filogenética de espécies distribuídas em diferentes continentes.

# **Considerações Finais**

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta deste estudo foi investigar a evolução cariotípica ocorrida na família Arapaimidae e a caracterização de sua biodiversidade em nível cromossômico e genético, considerando uma abordagem investigativa interpopulacional e intercontinental em representantes desse importante grupo ictiológico.

Desta forma foi realizado a caracterização da estrutura cariotípica geral de espécimes de *Arapaima* e *Heterotis niloticus*, o mapeamento da distribuição cromossômica de sítios marcadores associados a diferentes classes de DNAs repetitivos, a distribuição da heterocromatina C-positiva, das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) e bandas CMA<sub>3</sub> positivas, bem como dos genes ribossomais (DNAr 18S e DNAr 5S), sequências de DNAs microssatélites di e trinucleotídeos, além de experimentos de Hibridização Genômica Comparativa (CGH). Adicionalmente, análises genômicas foram realizadas por intermédio das análises de SNPs derivados de sequenciamento NGS Dart-Seq, propiciando análises mais robustas acerca da diversidade genética, estruturação populacional e história demográfica que moldaram a história evolutiva das espécies alvo do presente estudo.

Todos os espécimes de *Arapaima* examinados apresentaram  $2n=56$  cromossomos (14m/sm + 14st/a), enquanto *H. niloticus*, significativamente, mostrou uma constituição cariotípica bem divergente, com  $2n = 40$  cromossomos (20m/sm). Além desta notável diferenciação macro-cariotípica, ambas divergiram nos padrões cromossômicos de distribuição de diferentes classes de DNAs repetitivos e de sequencias compartilhadas por experimentos de hibridização genômica comparativa (CGH). Entretanto, os dados de diversidade genômica por análises de PCA mostraram uma baixa distância genética entre os dois gêneros.

Dentro do gênero *Arapaima*, análises interpopulacionais evidenciaram que, apesar de diferenças citogenéticas não terem sido observadas, níveis maiores de diversidade genética foram evidenciados para as populações da bacia Amazônica (Am) quando comparadas com as da bacia Tocantins-Araguaia (To-Ar). Adicionalmente foram também evidenciadas uma estruturação populacional separando as populações da bacia Am e da bacia To-Ar, além de subestrutura para um terceiro grupo da população de Codajás (COD) na região do médio rio Solimões (bacia Am). Já para as populações originadas de pisciculturas, a população de CRI agrupou-se a indivíduos provenientes da bacia To-Ar, ABV com indivíduos da bacia Am, entretanto indivíduos da piscicultura SJB apresentaram características genéticas pertencentes às duas bacias,

evidenciando claramente possuírem indivíduos provenientes de cruzamentos através de matrizes de *Arapaima* derivados de ambas as bacias hidrográficas.

Assim, o que explicaria a ampla divergência cromossômica *versus* reduzida divergência genômica observada entre *Arapaima* e *Heterotis*? Nossas análises sugerem que fatores diversos, tais como ecologia e estilo de vida bem como características fisiológicas e comportamentais estão provavelmente envolvidos. Adicionalmente, fatores associados com a própria organização do genoma destas espécies devem ter desempenhado um papel significativo nos resultados observados.

Embora os principais caminhos para a chegada de arapaimídeos na América do Sul ainda não estejam claros, quando aplicamos as redes neurais convolucionais treinadas (CNN) aos dados empíricos, o cenário selecionado foi a colonização da bacia To-Ar por indivíduos provenientes de populações da bacia Am. Este evento ocorreu durante o Pleistoceno, concordante com o tempo proposto de ocorrência da separação definitiva das bacias Am e To-Ar. Estudos futuros que enfoquem a junção de sequenciamento massivo paralelo de elementos ultraconservados (UCEs) em conjunto com registros fósseis poderão recuperar as relações filogenéticas entre as linhagens de osteoglossiformes ancestrais e estimar os tempos de divergência entre elas. Isso nos permitirá realizar uma reconstrução da história demográfica e da diversificação da ordem, testando hipóteses biogeográficas que potencialmente explicam a estreita relação filogenética de espécies Osteoglossiformes amplamente distribuídas em diferentes continentes.

# **Biografia**



## **6. BIOGRAFIA**

Filho de produtores rurais, nasceu em Crixás uma pequena cidade do interior do Estado de Goiás, Brasil, quando criança viveu na “Fazenda Morro do Espia” um pequeno sítio da família localizado naquele município. Aos seis anos iniciou sua trajetória escolar, para conclusão da educação básica estudou em quatro escolas (Escola Estadual Manoel Lino de Carvalho e Colégio Estadual João Xavier Ferreira em Crixás, GO, Centro de Ensino Médio Ary Ribeiro Valadão Filho e Colégio Paroquial Bernardo Sayão em Gurupi, TO), aos dezessete anos iniciou com apenas o ensino médio concluído, sua carreira como professor na Escola Rural Municipal de 1º Grau Nova Suiá e Escola Estadual Presidente Tancredo de Almeida Neves em São Félix do Araguaia – MT, lecionando para alunos do ensino fundamental e ensino médio. Em 2003 ingressou no curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) em Luciara, MT, finalizado em 2007. Em 2009 tornou-se professor efetivo de biologia pela Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso, durante os anos de 2009 e 2010, atuou como professor Formador no Centro Formação e Atualização dos Profissionais da Educação Básica (CEFAPRO-MT) em São Félix do Araguaia, MT, no período de 2011 e 2012 atuou como coordenador do Ensino Médio Regular e do Ensino Médio Técnico em Computação na Escola Estadual Presidente Tancredo de Almeida Neves em São Félix do Araguaia, MT, ainda em 2012 concluiu pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) o curso de Especialização em Gestão Pública e em 2014 concluiu pela AVM (Faculdades Integradas) em Brasília, DF o curso de especialização em Biologia Molecular. Neste mesmo ano ingressou no curso de Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pela Universidade Federal de São Carlos em São Carlos, SP, finalizando em 2015, no mesmo mês iniciou na mesma instituição o doutorado, que foi concluído em julho de 2019.

## **Referências Bibliográficas**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCIOLY, I. et al. Chromosomal population structuring in carangids (Perciformes) between the north-eastern and south-eastern coasts of Brazil. **African Journal of Marine Science**, v. 34, n. 3, p. 383–389, out. 2012.
- ADITE, A.; WINEMILLER, K. O.; FIOGBE, E. D. Ontogenetic seasonal and spatial variation in the diet of *Heterotis niloticus* (Osteoglossiformes: Osteoglossidae) in the Sô River and Lake Hlan, Benin, West Africa. **Environmental Biology of Fishes**, v. 73, n. 4, p. 367–378, 2005.
- ADITE, A.; WINEMILLER, K. O.; FIOGBE, E. D. Population structure and reproduction of the African bonytongue *Heterotis niloticus* in the So River-floodplain system (West Africa): implications for management. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 15, n. 1, p. 30–39, 1 mar. 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE AGUAS - BRASIL, A. **Agência Nacional de Águas (Brasil). Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: regiões hidrográficas brasileiras – Edição Especial** (ANA, Ed.) Brasília - DF, 2015.
- AKINYI, E. et al. **Heterotis niloticus**. **The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T182580A7920022**The IUCN Red List of Threatened Species International Union for Conservation of Nature - IUCN, 2010. Disponível em: <<http://oldredlist.iucnredlist.org/details/182580/0>>. Acesso em: 2 dez. 2018
- ALBERT, J. S.; REIS, R. E. Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. **America**, p. 406, 2011.
- ALLAN, J. D. et al. Overfishing of Inland Waters. **BioScience**, v. 55, n. 12, p. 1041–1051, 1 dez. 2005.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. Conservation and the genetics of populations. **mammalia**, v. 2007, p. 189–197, 2007.
- ALMEIDA-FERREIRA, G. C. et al. Spar genetic analysis of two invasive species of *Cichla* (Tucunaré) (Perciformes: Cichlidae) in the Paraná river basin. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 1, 14 fev. 2011.
- AMEMIYA, C. T. et al. The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. **Nature**, v. 496, n. 7445, p. 311–316, 2013.
- ANTUNES, R. et al. Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 674–684, 2010.
- ARANTES, CAROLINE CHAVES. **Ecologia do pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) na várzea da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil**. Universidade Estadual de Santa Cruz–UESC. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado.
- ARARIPE, J. et al. Dispersal Capacity and Genetic Structure of *Arapaima gigas* on Different Geographic Scales Using Microsatellite Markers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- ARRATIA, Gloria. The monophyly of Teleostei and stem-group teleosts. **Mesozoic fishes**, v. 2, p. 265-334, 1999.
- ARRATIA, G. Critical analysis of the impact of fossils on teleostean phylogenies, especially that of basal teleosts. **Morphology, Phylogeny and Paleobiogeography of Fossil Fishes**. München: Verlag Dr. F. Pfeil, p. 247–274, 2010.
- AVISE, John C.; HAMRICK, James Led. **Conservation genetics: case histories from**

- nature**. 1996.
- AZEVEDO-SANTOS, V. M. et al. Removing the abyss between conservation science and policy decisions in Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, n. 7, p. 1745–1752, 16 jun. 2017.
- DE AZEVEDO, Renato Pimenta. **Tectonic evolution of Brazilian equatorial continental margin basins**. 2011. Tese de Doutorado. Imperial College London (University of London).
- BAIRD, N. A. et al. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, p. e3376, 13 out. 2008.
- BAKE, G. G.; SADIKU, S. O. E. **Food and feeding habits of Heterotis niloticus from River Kaduna floodplain**. 19th Annual Conference of the Fisheries Society of Nigeria (FISON). **Anais**. Ilorin, Nigéria: 2005. Disponível em: <<http://aquaticcommons.org/4069/>>. Acesso em: 2 dez. 2018
- BĂNĂRESCU, P. **Zoogeography of fresh waters. Vol. 3, Distribution and dispersal of freshwater animals in Africa, Pacific areas and South America**. Wiesbaden, Germany: AULA-Verlag, 1995.
- BARBY, F. et al. From chromosomes to genome: insights into the evolutionary relationships and biogeography of Old World knifefishes (Notopteridae; Osteoglossiformes). **Genes**, 2018.
- BARBY, F. F. et al. Emerging patterns of genome organization in Notopteridae species (Teleostei, Osteoglossiformes) as revealed by Zoo-FISH and Comparative Genomic Hybridization (CGH). **Scientific Reports**, 2019.
- BARD, J.; IMBIRIBA, E. P. Piscicultura do pirarucu, *Arapaima gigas*. **Embrapa Amazônia Oriental-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 1986.
- BARDACH, J. E.; RYTHER, J. H.; MCLARNEY, W. O. **Aquaculture. The farming and husbandry of freshwater and marine organisms**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1972.
- BERTINI, R. J. et al. Vertebrate faunas from the Adamantina and Marília formations (upper Bauru Group, Late Cretaceous, Brazil) in their stratigraphic and paleobiogeographic context. **Neues Jahrb Geol Paläontol Abh**, v. 188, p. 71–101, 1993.
- BERTOLLO, L. A. C. et al. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v. 8, n. 7, p. 603–613, 2000.
- BERTOLLO, L. A. C. Chromosome evolution in the Neotropical Erythrinidae fish family: An overview BT. In: PIZANO, E. et al. (Eds.). **Fish Cytogenetics**. Enfield: Science Publishers, 2007.
- BERTOLLO, L. A. C.; CIOFFI, M. B.; MOREIRA-FILHO, O. Direct chromosome preparation from Freshwater Teleost Fishes. In: OZOUF-COSTAZ, C. et al. (Eds.). **Fish cytogenetic techniques (Chondrichthyans and Teleosts)**. Enfield USA: CRC Press, 2015. p. 21–26.
- BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI, P. M. Cytogenetics and taxonomy: consideration based on chromosome studies of freshwater fish. **J Fish Biol**, v. 28, 1986.
- BETANCUR-R., R. et al. The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. **Tree of Life**, p. 1–54, 2013.
- BETANCUR-R., R. et al. Phylogenetic classification of bony fishes. **BMC evolutionary biology**, v. 17, n. 1, p. 162, 2017.
- BIAN, C. et al. The Asian arowana (*Scleropages formosus*) genome provides new insights into the evolution of an early lineage of teleosts. **Scientific Reports**, v.

- 6, n. November 2015, p. 1–17, 2016.
- BIÉMONT, C. Genome size evolution: Within-species variation in genome size. **Heredity**, v. 101, n. 4, p. 297–298, 2008.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 521–524, 2006.
- BIGNOTTO, T. et al. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2 suppl, p. 681–689, jun. 2009.
- BIRD, C. E. et al. Sympatric Speciation in the Post “Modern Synthesis” Era of Evolutionary Biology. **Evolutionary Biology**, v. 39, n. 2, p. 158–180, 20 jun. 2012.
- BISCOTTI, M. A. et al. The lungfish transcriptome: A glimpse into molecular evolution events at the transition from water to land. **Scientific Reports**, v. 6, n. September 2015, p. 1–12, 2016.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 415–420, 29 set. 2015.
- BLOOM, D. D.; LOVEJOY, N. R. The Biogeography of Marine Incursions in South America. In: **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. [s.l: s.n.].
- BONATELLI, I. A. S. et al. Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: Phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3044–3063, 2014.
- BONDE, N. Osteoglossomorphs of the marine Lower Eocene of Denmark—with remarks on other Eocene taxa and their importance for palaeobiogeography. **Geological Society, London, Special Publications**, v. 295, n. 1, p. 253–310, 2008.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related *Brassica* taxa and *Arabidopsis thaliana*. **Hereditas**, v. 140, n. 3, p. 245–247, 17 maio 2004.
- BRANDÃO, F. R. et al. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 349–356, 2006.
- BRANDOLINI, A.; VOLANTE, A.; HEUN, M. Geographic differentiation of domesticated einkorn wheat and possible Neolithic migration routes. **Heredity**, v. 117, n. 3, p. 135, 2016.
- BRAUNER, C. J.; VAL, A. L. The interaction between O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> exchange in the obligate air breather, *Arapaima gigas*, and the facultative air breather, *Lipossarcus pardalis*. **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**, 1996.
- BRAWAND, D. et al. The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. **Nature**, v. 513, n. 7518, p. 375–381, 2015.
- BREIMAN, L. (34) Classification and regression trees Regression trees. **Encyclopedia of Ecology**, 1984.
- BREIMAN, Leo. Random forests. **Machine learning**, v. 45, n. 1, p. 5–32, 2001.
- BROUGHTON, R. E. et al. Multi-locus phylogenetic analysis reveals the pattern and tempo of bony fish evolution. **PLoS currents**, v. 5, 16 abr. 2013.
- BUCKUP, P. A. Family Crenuchidae (South American Darters) BT - Checklist of the freshwater fish of South and Central America. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds.). . Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

- BUSBY, JR. BIOCLIM-a bioclimate analysis and prediction system. **Plant protection quarterly (Australia)**, 1991.
- CANDEIRO, C. R. A. et al. Tetrapods from the Upper Cretaceous (Turonian Maastrichtian) Bauru Group of Brazil: a reappraisal. **Cretaceous Research**, v. 27, p. 923–946, 2006.
- CAPOBIANCO, A.; FRIEDMAN, M. Vicariance and dispersal in southern hemisphere freshwater fish clades: a palaeontological perspective. **Biological Reviews**, 19 out. 2018.
- CARSTENS, B. C. et al. How to fail at species delimitation. **Molecular ecology**, v. 22, n. 17, p. 4369–83, set. 2013.
- CARVALHO, P. C. et al. First Chromosomal Analysis in Hepsetidae (Actinopterygii, Characiformes): Insights into Relationship between African and Neotropical Fish Groups. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 203, 12 dez. 2017.
- CARVALHO, T. P.; ALBERT, J. S. The amazon-paraguay divide. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. University of California Press, Berkeley, California, p. 193-202, 2011.
- CASTELLO, L. A Method to Count Pirarucu *Arapaima gigas* : Fishers, Assessment, and Management. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 24, n. 2, p. 379–389, maio 2004.
- CASTELLO, L. Nesting habitat of *Arapaima gigas* (Schinz) in Amazonian floodplains. **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 6, p. 1520–1528, 2008.
- CASTELLO, L.; STEWART, D. J. Assessing CITES non-detriment findings procedures for *Arapaima* in Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 1, p. 49–56, 2010.
- CASTELLO, L.; STEWART, D. J.; ARANTES, C. C. Modeling population dynamics and conservation of arapaima in the Amazon. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, n. 3, p. 623–640, 11 set. 2011.
- CAVALLINI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C. **Inducao de mitoses em Hoplias cf. malabaricus (Teleostei, Characiformes, Erithrinidae)**. Simposio de Citogenetica Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. **Anais**. Maringa, Universidade Estadual de Maringa., 1988
- CAVERO, B. A. S. et al. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 103–107, 2003.
- CAVIN, L. (LIONEL). **Freshwater Fishes : 250 million years of evolutionary history**. London and Oxford: ISTE Press-Elsevier, 2017.
- CAVIN, L.; FOREY, P. L.; LÉCUYER, C. Correlation between environment and Late Mesozoic ray-finned fish evolution. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 245, p. 353–367, 2007.
- CESERO, P. DE et al. Análise comparativa da paleogeologia dos litorais atlânticos brasileiro e africano. **Boletim de Geociências da PETROBRAS**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 1997.
- CHARLESWORTH, B. et al. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215–220, 15 set. 1994.
- CHESTER, M. et al. Review of the Application of Modern Cytogenetic Methods (FISH/GISH) to the Study of Reticulation (Polyploidy/Hybridisation). **Genes**, v. 1, n. 2, p. 166–192, 2 jul. 2010.
- CHRISTOFOLETTI, A. Aplicabilidade do conhecimento geomorfológico nos projetos de planejamento. **Geomorfologia: uma atualização de bases e conceitos**, v. 2, p. 415–440, 2001.
- CHU-KOO, F. et al. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*)

- using plasma vitellogenin, 17 $\beta$ -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 125–136, 23 mar. 2009.
- CIOFFI, M. B. et al. Chromosomal Variability among Allopatric Populations of Erythrinidae Fish *Hoplias malabaricus*: Mapping of Three Classes of Repetitive DNAs. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 125, n. 2, p. 132–141, 2009.
- CIOFFI, M. B. et al. Chromosomes as tools for discovering biodiversity. The case of Erythrinidae fish family BT - Recent Trends in Cytogenetic Studies. Methodologies and Applications. In: TIRUNILAI, P. (Ed.). . Rijeka: Intech, 2012.
- CIOFFI, M. B.; CAMACHO, J. P. M.; BERTOLLO, L. A. C. Repetitive DNAs and differentiation of sex chromosomes in neotropical fishes. **Cytogenetic and genome research**, v. 132, n. 3, p. 188–94, 2011.
- CIOFFI, M. B. DE B.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: GARRIDO-RAMOS, M. A. (Ed.). . **Repetitive DNA**. Basel: Karger, 2012a. v. 7p. 197–221.
- CIOFFI, M. B.; KEJNOVSKY, E.; BERTOLLO, L. A. C. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. **Cytogenetic and genome research**, v. 132, n. 4, p. 289–96, 2011.
- CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genetics**, v. 10, n. 1, p. 34, jul. 2009.
- CIOFFI, M. DE B. et al. Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and Its Implications for the Chromosomal Evolution of Channid Fishes (Actinopterygii, Perciformes). **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130199, 12 jun. 2015.
- CIOFFI, M. DE B. et al. Chromosomal Evolution in Lower Vertebrates: Sex Chromosomes in Neotropical Fishes. **Genes**, v. 8, n. 10, p. 258, 5 out. 2017.
- CIOFFI, M. de B.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: **Repetitive DNA**. Karger Publishers, 2012. p. 197-221.
- CITES. **Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: Appendices I, II and III**. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna. **Anais**. 2017.
- COHEN, K. M.; HARPER, D. A. T.; GIBBARD, P. L. ICS International Chronostratigraphic Chart 2017/02. 2017.
- CSILLÉRY, K.; FRANÇOIS, O.; BLUM, M. G. B. abc: an R package for approximate Bayesian computation (ABC). **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 475–479, 1 jun. 2012.
- CUVIER, G.; VALENCIENNES, A. Histoire naturelle des poissons. Tome vingtième. Livre vingt et unième. De la famille des Clupéorides. **Histoire Naturelle Des Poissons (472 pp.)**, 1847.
- DA ROSA, R. et al. Conserved Cytogenetic Features in the Amazonian Arapaima, *Arapaima gigas* (Schinz 1822) from Jamari River, Rondonia - Brazil. **The Open Biology Journal**, v. 2, n. 1, p. 91–94, 2009.
- DAGET, J. Les poisson du Niger superior. **Mem. IFAN**, v. 36, p. 39pp, 1954.
- DAGOSTA, F. C. P.; PINNA, M. DE. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 3, p. 1–24, 2017.
- DANKWA, H. R.; ABBAN, E. K.; TEUGELS, G. G. **Freshwater fishes of Ghana:**

- identification, distribution, ecological and economic importance.** Tervuren: Royal museum for Central Africa, 1999. v. 283
- DARLINGTON, Philip J. **Zoogeography.** John Wiley: New York, 1957.
- DAVIES, B. R.; WALKER, K. F. **River systems as ecological units. An introduction to the ecology of river systems.** Dordrecht, The Netherlands: Springer, Dordrecht, 1986.
- DE ALMEIDA, IASSUDARA GARCIA. Prospecção de marcadores moleculares sexo-específicos e análise de estrutura populacional de pirarucu (*Arapaima gigas*) na região de Santarém, Pará. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Tese/dissertação (ALICE)**, 2012.
- DE ANDRADE, J. I. A. et al. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 576–580, 1 abr. 2007.
- DE FREITAS, N. L. et al. Early Stages of XY Sex Chromosomes Differentiation in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) Revealed by DNA Repeats Accumulation. **Current Genomics**, v. 19, n. 3, p. 216–226, 20 fev. 2018.
- DE MORAES, R. L. R. et al. Evolutionary relationships and cytotaxonomy considerations in the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 6, p. 536–546, 2017.
- DE OLIVEIRA, E. A. et al. Comparative cytogenetics in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae) highlights contrasting karyotype evolution among congeneric species. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 1, p. 56, 30 dez. 2015.
- DE OLIVEIRA, E. A. et al. Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY1Y2 system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). **Chromosoma**, v. 127, n. 1, p. 115–128, 9 mar. 2018.
- DE OLIVEIRA, E. A. et al. Cytogenetics, genomics and biodiversity of the South American and African *Arapaimidae* fish family (Teleostei, Osteoglossiformes). **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0214225, 25 mar. 2019.
- DICE, L. R. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology**, v. 26, n. 3, p. 297–302, 1945.
- DORNBURG, A. et al. Phylogenetic informativeness reconciles ray-finned fish molecular divergence times. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 169, 8 dez. 2014.
- DU, K. et al. The genome of the arapaima (*Arapaima gigas*) provides insights into gigantism, fast growth and chromosomal sex determination system. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5293, 2019.
- EISNER, T. et al. Building a scientifically sound policy for protecting endangered species. **Science**, v. 269, n. 5228, p. 1231–1233, 1 set. 1995.
- ELSHIRE, R. J. et al. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19379, 4 maio 2011.
- FARIAS, I. P. et al. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 1, p. 128–130, 2003.
- FARIAS, I. P. et al. Evidence of polygamy in the socially monogamous Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes, Arapaimidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 1, p. 195–204, 2015.



- FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. **Fish adaptations**, p. 285–308, 2003.
- FERRARIS JR, C. J. Family Arapaimatidae (Bonytongues). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. RE Reis, SO Kullander, and CJ Ferraris, Jr.(eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil**, p. 31, 2003.
- FERREIRA, M. et al. The *Bunocephalus coracoideus* Species Complex (Siluriformes, Aspredinidae). Signs of a Speciation Process through Chromosomal, Genetic and Ecological Diversity. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 120, 21 set. 2017.
- FIGUEIREDO, J. et al. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. **Geology**, v. 37, n. 7, p. 619–622, 2009.
- FIGUEIREDO, J. et al. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin: Reply. **Geology**, v. 37, n. 7, p. 619–622, 2010.
- FINE, P. V. A.; LOHMANN, L. G. Importance of dispersal in the assembly of the Neotropical biota. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 23, p. 5829–5831, 2018.
- FLAGEL, L.; BRANDVAIN, Y.; SCHRIDER, D. R. The Unreasonable Effectiveness of Convolutional Neural Networks in Population Genetic Inference. **Molecular Biology and Evolution**, v. 36, n. 2, p. 220–238, dez. 2018.
- FOGAÇA, F. H. DOS S. et al. Yield and composition of pirarucu fillet in different weight classes. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n. 1, 3 fev. 2011.
- FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae). *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v8, n. 4, p. 445-459. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 8, n. 4, p. 445–459, 1948.
- FONTENELE, O. Hábitos de desova do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) (pisces: Isospondyli, Arapaimidae), e a evolução de sua larva. **DNOCS, Fortaleza**, v. 153, p. 22, 1953.
- FONTENELE, O.; VASCONCELOS, E. A. DE. O pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817), nos açudes do Nordeste: Resultados de sua aclimação e prováveis causas de depleção de seus estoques. **Bol. Téc. DNOCS, Fortaleza**, v. 40, n. 1, p. 43–66, 1982.
- FONTES, J.-C. et al. Paleorecharge by the Niger River (Mali) Deduced from groundwater geochemistry. **Water Resources Research**, v. 27, n. 2, p. 199–214, 1 fev. 1991.
- FORCONI, M. et al. Characterization of Sex Determination and Sex Differentiation Genes in *Latimeria*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e56006, 25 abr. 2013.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, n. 9, p. 810–813, set. 1993.
- FOREY, P. L.; HILTON, E. J. Two new tertiary osteoglossid fishes (Teleostei: Osteoglossomorpha) with notes on the history of the family. **Morphology, phylogeny and paleobiogeography of fossil fishes. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, Germany**, p. 215–246, 2010.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Fundamentos de genética da conservação. **Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**, p. 262p, 2008.
- FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. **Species by family/subfamily in the Catalog of fishes, electronic version**). Disponível

- em:  
 <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. Acesso em: 31 jul. 2017.
- FRIEDMAN, J. Multivariate adaptive regression splines (with discussion). **Annals of Statistics**, 1991.
- FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase. World Wide Web electronic publication**. Disponível em: <<http://www.fishbase.se/summary/citation.php>>. Acesso em: 2 dez. 2018.
- GALETTI, P. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. **Caryologia**, v. 47, n. 3–4, p. 289–297, jan. 1994.
- GALVÃO, M. V. G. **Evolução Termodinâmica da Bacia do Marajó, Estado do Pará, Brasil**. Ouro preto - MG: Dissertação de Mestrado, Universidade de Ouro Preto, 193p, 1991.
- GARRICK, R. C. et al. The evolution of phylogeographic data sets. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 1164–1171, mar. 2015.
- GOLDBLATT, P. **Biological relationships between Africa and South America**. New Haven, Connecticut, EUA: Yale University Press, 1993.
- GORINI, C. et al. Late Neogene sequence stratigraphic evolution of the Foz do Amazonas Basin, Brazil. **Terra Nova**, v. 26, n. 3, p. 179–185, 2014.
- GORNUNG, E. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: a review of research. **Cytogenetic and genome research**, v. 141, n. 2–3, p. 90–102, 2013.
- GOULDING, M. et al. **The Smithsonian atlas of the Amazon**. Washington: Smithsonian Books Washington, 2003.
- GREENWOOD, P. et al. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bulletin of the AMNH*; v. 131, article 4. 1966.
- GREENWOOD, P. On the genus *Lycoptera* and its relationship with the family *Hiodontidae* (Pisces, Osteoglossomorpha). **Bull Brit Mus (Nat Hist) Zool**, v. 19, n. 8, p. 259–85, 1970.
- GREENWOOD, P. Interrelationships of osteoglossomorphs. In: Greenwood PH, Miles RS, Patterson C, editors. *Interrelationships of Fishes*. **London: Academic Press**, p. 307–332, 1973.
- GREGORY, T. R. Genome Size Evolution in Animals. **The Evolution of the Genome**, p. 3–87, 1 jan. 2005.
- GUILLOT, G., SANTOS, F.; ESTOUP, A. **Population genetics analysis using R and Geneland.**, 2009.
- GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. GENELAND: A computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, 2005.
- GÜNTHER, A. On the Fishes of the States of Central America, founded upon specimens collected in the fresh and marine waters of various parts of that country by Messrs. Salvin and Godman and Capt. **JM Dow., Proc. Zool. Soc. London**, v. 1866, p. 600–604, 1867.
- GUO-QING, L.; WILSON, M. V. H.; GRANDE, L. Review of *Eohiodon* (Teleostei: Osteoglossomorpha) from western North America, with a phylogenetic reassessment of *Hiodontidae*. **Journal of Paleontology**, v. 71, n. 6, p. 1109–1124, 1997.
- GUPTA, A. et al. Genetic divergence in natural populations of bronze featherback, *Notopterus notopterus* (Osteoglossiformes: Notopteridae) from five Indian rivers, analyzed through mtDNA ATPase6/8 regions. **Meta Gene**, v. 1, p. 50–57, 2013.

- HAIJIBABAEI, M. et al. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. **BMC Biology**, v. 5, n. 1, p. 24, 13 jun. 2007.
- HAMES, W. et al. The Central Atlantic magmatic province: Insights from fragments of Pangea. **Washington DC American Geophysical Union Geophysical Monograph Series**, v. 136, 2003.
- HAMOY, I.; SANTOS, E.; SANTOS, S. Rapid and inexpensive analysis of genetic variability in *Arapaima gigas* by PCR multiplex panel of eight microsatellites. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 29–32, 2008.
- HASHIMOTO, D. T. et al. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, n. 2, p. 108–118, jun. 2012.
- HASHIMOTO, D. T. et al. Genetic Identification of F1 and Post-F1 Serrasalmid Juvenile Hybrids in Brazilian Aquaculture. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e89902, 3 mar. 2014.
- HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R.; BUJA, A. Flexible discriminant analysis by optimal scoring. **Journal of the American Statistical Association**, v. 89, p. 1255–1270, 1994.
- HATANAKA, T. et al. First chromosomal analysis in *Gymnarchus niloticus* (Gymnarchidae: Osteoglossiformes): insights into the karyotype evolution of this ancient fish order. **Biological Journal of the Linnean Society**, 20 jul. 2018.
- HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 852–859, 1 out. 2005.
- HENDERSON, P. A. O ambiente aquático da Reserva Mamirauá. **Estratégias para Manejo de Recursos Pesqueiros de Mamirauá. Brasília: Soc. Civil Mamirauá, CNPq**, p. 1–9, 1999.
- HIJMANS, R. J. et al. WorldClim interpolated global terrestrial climate surfaces. **International Journal of Climatology**, 2004.
- HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411–453, 22 dez. 1991.
- HILTON, E. J. Comparative osteology and phylogenetic systematics of fossil and living bony-tongue fishes (Actinopterygii, Teleostei, Osteoglossomorpha). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 137, n. 1, p. 1–100, 2003.
- HILTON, E. J.; LAVOUÉ, S. A review of the systematic biology of fossil and living bony-tongue fishes, Osteoglossomorpha (Actinopterygii: Teleostei). **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 3, p. 1–35, 2018.
- HIRATA, J.; URUSHIDO, T. Karyotypes and DNA content in the Osteoglossiformes. **Sci Rep Res Inst Evol Biol**, v. 9, p. 83–90, 2000.
- HOORN, C. et al. The Amazon at sea: Onset and stages of the Amazon River from a marine record, with special reference to Neogene plant turnover in the drainage basin. **Global and Planetary Change**, v. 153, p. 51–65, 2017.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, n. 8, p. 1014–1015, ago. 1980.
- HRBEK, T. et al. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. **Animal Conservation**, v. 8, n. 3, p. 297–308, ago. 2005.
- HRBEK, T. et al. A New Species of River Dolphin from Brazil or: How Little Do We Know Our Biodiversity. **PLoS ONE**, v. 9, p. e83623, 2014.
- HRBEK, T.; CROSSA, M.; FARIAS, I. P. Conservation strategies for *Arapaima gigas*

- (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 67, p. 909–917, 2007.
- HRBEK, T.; FARIAS, I. P. The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 293–302, 2008.
- HUDSON, R. R. Generating samples under a Wright-Fisher neutral model of genetic variation. **Bioinformatics**, 2002.
- HUGHES, A. R. et al. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters**, v. 11, n. 6, p. 609–623, jun. 2008.
- HUGHES, L. C. et al. Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 24, p. 6249–6254, 12 jun. 2018.
- HURTADO, C. et al. Cretaceous-early Paleocene drainage shift of Amazonian rivers driven by Equatorial Atlantic Ocean opening and Andean uplift as deduced from the provenance of northern Peruvian sedimentary rocks (Huallaga basin). **Gondwana Research**, v. 63, p. 152–168, nov. 2018.
- HURTADO, L. A. et al. Genetic differentiation of a primitive teleost, the African bonytongue *Heterotis niloticus*, among river basins and within a floodplain river system in Benin, West Africa. **Journal of Fish Biology**, v. 83, n. 3, p. 682–690, 2013.
- IMBIRIBA, E. P. Potencial de Criação de Pirarucu, *Arapaima gigas*, em Cativeiro. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 2, p. 299–316, 2001.
- INOUE, J. G. et al. The historical biogeography of the freshwater knifefishes using mitogenomic approaches: A Mesozoic origin of the Asian notoptyrids (Actinopterygii: Osteoglossomorpha). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, n. 3, p. 486–499, 2009.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE et al. **IUCN red list of threatened animals**. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 1996.
- JACCOUD, D. et al. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 4, p. e25–e25, 2001.
- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, 2007.
- JUNK, W. J. As águas da região amazônica. **Amazônia: desenvolvimento, integração e ecologia**, p. 14–44, 1983.
- KALLIONIEMI, A. et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 258, n. 5083, p. 818–21, 30 out. 1992.
- KARAM-GEMAEL, M. et al. Poor alignment of priorities between scientists and policymakers highlights the need for evidence-informed conservation in Brazil. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 16, n. 3, p. 125–132, 1 jul. 2018.
- KATO, A. et al. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 2, p. 148–154, 1 abr. 2005.
- KAVALCO, K. F. et al. Chromosomal Diversification Higher Than Molecular Variation in *Astyanax* aff. *fasciatus* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, v. 13, n. 4, p. 345–353, 22 ago. 2016.
- KILIAN, A. et al. Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology

- on open platforms. In: **Data production and analysis in population genomics**. Totowa, NJ: Springer, 2012. p. 67–89.
- KINGMA, D. P.; BA, J. L. Adam: A method for stochastic gradient descent. **ICLR: International Conference on Learning Representations**, 2015.
- KLUG, W. S. et al. **Concepts of genetics**. San Francisco: 10th ed. San Francisco, Pearson Education, 2012.
- KNOWLES, L. L. Statistical Phylogeography. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, n. 1, p. 593–612, 12 out. 2009.
- KOMISSAROV, A. et al. B Chromosomes of the Asian Seabass (*Lateolabrax niloticus*) Contribute to Genome Variations at the Level of Individuals and Populations. **Genes**, v. 9, n. 10, p. 464, 20 set. 2018.
- KOPELMAN, N. M. et al. Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, p. 1179–1191, 2015.
- KUBAT, Z. et al. Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. **Genome**, v. 51, p. 350–356, 2008.
- KUMAR, R. et al. Karyological and molecular diversity in three freshwater species of the genus *Channa* (Teleostei, Perciformes) from India. **Caryologia**, v. 66, n. 2, p. 109–119, 2013.
- KUMAZAWA, Y.; NISHIDA, M. Molecular phylogeny of osteoglossoids: A new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 12, p. 1869–1878, 2000.
- LAMBERT, M. R.; SKELLY, D. K.; EZAZ, T. Sex-linked markers in the North American green frog (*Rana clamitans*) developed using DArTseq provide early insight into sex chromosome evolution. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 844, 2016.
- LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**, v. 241, p. 1455 LP – 1460, 1988.
- LAUDER, C. V. The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. **Comp. Zool.**, v. 150, p. 95–197, 1983.
- LAVOUÉ, S. et al. Comparable ages for the independent origins of electrogenesis in African and South American weakly electric fishes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–18, 2012.
- LAVOUÉ, S. Was Gondwanan breakup the cause of the intercontinental distribution of Osteoglossiformes? A time-calibrated phylogenetic test combining molecular, morphological, and paleontological evidence. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 99, p. 34–43, 2016.
- LAVOUÉ, S.; SULLIVAN, J. P. Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 33, n. 1, p. 171–185, 2004.
- LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. **Journal of statistical software**, v. 25, n. 1, p. 1–18, 2008.
- LEÃO, A. S. A. **Análise da variabilidade genética das populações de pirarucu (*Arapaima gigas*, SCHINZ 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microsatélites**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brazil, 2009.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201–220, 1964.
- LÉVÊQUE, C.; PAUGY, D.; TEUGELS, G. G. **Faune des poissons d'eaux douces et saumâtres de l'Afrique de l'Ouest The fresh and brackish water fishes of**

- West Africa: Tome 1.** Paris, France: Institut Français de Recherche Scientifique pour Le Développement en Coopération, 1990.
- LI, G-Q, WILSON, MVH; LI G-Q, W. M. Phylogeny of Osteoglossomorpha. In: Stiassny MLJ, Parenti LR, Johnson GD, editors. Interrelationships of fishes. **New York: Academic Press**, p. 163–174, 1996.
- LI, J. et al. A chromosome-level genome assembly of the Asian arowana, *Scleropages formosus*. **Scientific Data**, v. 3, p. 160105, 6 dez. 2016.
- LIM, K. Y. et al. Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years. **New Phytologist**, v. 175, n. 4, p. 756–763, 2007.
- LIMA, F. C. T.; RIBEIRO, A. C. Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**, v. 145, p. 164, 2011.
- LOPEZ-FERNANDEZ, H. et al. Morphology, molecules, and character congruence in the phylogeny of South American geophagine cichlids (Perciformes, Labroidei). **Zoologica Scripta**, v. 34, n. 6, p. 627–651, 1 nov. 2005.
- LOVEJOY, N. R.; ALBERT, J. S. Molecular Signatures of Neogene Biogeographical Events in the Amazon Fish Fauna. 2010.
- LOVEJOY, N. R.; ALBERT, J. S.; CRAMPTON, W. G. R. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 21, n. 1–2, p. 5–13, 1 mar. 2006.
- LUI, R. et al. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, n. 7, p. 433–438, 2 out. 2012.
- LUNDBERG, J. G. African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. In: GOLDBLATT P (Ed.). **Biological relationships between Africa and South America**. USA, Yale University Press, 1993. p. 156–198.
- LUNDBERG, J. G. et al. The stage for Neotropical fish diversification: A history of Tropical South America rivers. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Part 1 - Fossils and Geological Evidence**, n. January, p. 13–48, 1998.
- LUNDBERG, J. G. *Brachyplatystom a promagdalenae*, new species, a fossil goliath catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Miocene of Colombia, South America. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 4, p. 597–605, dez. 2005.
- LUNDBERG, J. G. et al. Discovery of African roots for the Mesoamerican Chiapas catfish, *Lacantunia enigmatica*, requires an ancient intercontinental passage. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 156, n. 1, p. 39–53, 2007.
- LUNDBERG, J. G.; AGUILERA, O. The late Miocene *Phractocephalus* catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from Urumaco, Venezuela: additional specimens and reinterpretation as a distinct species. **Neotropical Ichthyology**, v. 1, n. 2, p. 97–109, dez. 2003.
- LUNDBERG, J. G.; CHERNOFF, B. A Miocene Fossil of the Amazonian Fish *Arapaima* (Teleostei, Arapaimidae) from the Magdalena River Region of Colombia--Biogeographic and Evolutionary Implications. **Biotropica**, v. 24, n. 1, p. 2, mar. 1992.
- LUQUE, C. et al. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). **Hereditas**, v. 136, n. 3, p. 251–253, 1 set. 2002.
- MACE, G. M.; GITTLEMAN, J. L.; PURVIS, A. Preserving the tree of life. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5626, p. 1707–9, 2003.
- MACHADO, C. B.; GALETTI, P. M.; CARNAVAL, A. C. Bayesian analyses detect a

- history of both vicariance and geodispersal in Neotropical freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 45, n. 6, p. 1313–1325, 2018.
- MAHELKA, V.; KOPECKÝ, D.; PAŠTOVÁ, L. On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae). **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 127, 18 dez. 2011.
- MAISEY, J. G. Continental break up and the distribution of fishes of Western Gondwana during the Early Cretaceous. **Cretaceous Research**, v. 21, n. 2–3, p. 281–314, 1 abr. 2000.
- MAJTÁNOVÁ, Z. et al. “Holostei versus Halecostomi” Problem: Insight from Cytogenetics of Ancient Nonteleost Actinopterygian Fish, Bowfin *Amia calva*. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 328, n. 7, p. 620–628, 2017.
- MANTEL, N. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. **Cancer Research**, v. 27, n. 2 Part 1, p. 209 LP – 220, 1 fev. 1967.
- MARQUES, D. K.; VENERE, P. C.; GALETTI JUNIOR, P. M. Chromosomal characterization of the bonytongue *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes: Arapaimidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 215–218, jun. 2006.
- MARTINS, C. et al. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v. 127, n. 1–3, p. 133–141, maio 2006.
- MARZOLI, A.; RENNE, P. R.; PICCIRILLO, E. M. Ar/Ar geochronology of Mesozoic continental basaltic magmatism and the opening of the central, equatorial and southern Atlantic ocean. **Penrose: Volcanic Rifted Margins, Geology Department, Royal Holloway, University of London**, p. 54, 2000.
- MCCONNELL, R.; LOWE-MCCONNELL, R. H. **Ecological studies in tropical fish communities**. Cambridge - England: Cambridge University Press, 1987.
- MCCULLAGH, Peter; Nelder, J. 1989. Generalized Linear Models. **London, Chapman hall**, 81.
- MCHONE, J. G. Non-plume magmatism and rifting during the opening of the central Atlantic Ocean. **Tectonophysics**, v. 316, n. 3–4, p. 287–296, 2000.
- MCHONE, J. G. Igneous Features and Geodynamic Models of Rifting and Magmatism Around the Central Atlantic Ocean. **Mantle plumes**, 2002.
- MEIRMANS, P. G. Seven common mistakes in population genetics and how to avoid them. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 3223–3231, 2015.
- MEIRMANS, P. G.; VAN TIENDEREN, P. H. genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 4, p. 792–794, 2004.
- MELVILLE, J. et al. Identifying hybridization and admixture using SNPs : application of the DArTseq platform in phylogeographic research on vertebrates. 2017.
- MILHOMEM, S. S. R. et al. Are NORs Always Located on Homeologous Chromosomes? A FISH Investigation with rDNA and Whole Chromosome Probes in *Gymnotus* Fishes (Gymnotiformes). **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55608, 6 fev. 2013.
- MINISTÉRIO DO INTERIOR - BRASIL, M. **Projeto de Desenvolvimento Integrado da Bacia do Araguaia-Tocantins: Diagnóstico da Bacia do Araguaia-Tocantins**. Brasília: PRODIAT - Sociedade de Estudos Regionais, 1982.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - BRASIL, M. **Caderno da Região Hidrográfica do Tocantins-Araguaia / Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos**. Brasília - DF: MMA, 2006.
- MONENTCHAM, S.-E. et al. Biology and prospect for aquaculture of African bonytongue, *Heterotis niloticus* (Cuvier, 1829): A review. **Aquaculture**, v.

- 289, n. 3–4, p. 191–198, 16 abr. 2009.
- MONTEIRO, L. B. B. et al. Aspectos reprodutivos e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822), em condições de cativeiro. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 3, p. 435–449, set. 2010.
- MOREAU, Jacques. **Exposé synoptique des données biologiques sur la perche du Nil: *Lates niloticus* (Linnaeus, 1762)**. Food & Agriculture Org., 1982.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a "species complex". **Brazil. J. Genet.**, v. 14, p. 331–357, 1991.
- MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI, P. M.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): an overview in natural populations. **Cytogenetic and genome research**, v. 106, n. 2–4, p. 230–4, 2004.
- MORESCO, R. M. et al. The pioneering use of ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) in Neotropical anurans: preliminary assessment of genetic diversity in populations of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Leiuperidae). **Biological Research**, v. 46, n. 1, p. 53–57, 2013.
- MOTTA-NETO, C. C. et al. Differential hypomethylation of the repetitive Tol2/Alu-rich sequences in the genome of *Bodianus* species (Labriformes, Labridae). **Comparative Cytogenetics**, v. 12, n. 2, p. 145–162, 28 mar. 2018.
- MUSTAPHA, M. K. *Heterotis niloticus* (Cuvier, 1829) a threatened fish species in Oyun reservoir, Offa, Nigeria; the need for its conservation. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2010.
- MYERS, G. S. Salt-tolerance of fresh-water fish groups in relation to zoogeographical problems. **Bijdragen tot de Dierkunde**, v. 28, n. 1949, p. 315–322, 1949.
- MYERS, N.; KNOLL, A. H. The biotic crisis and the future of evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 10, p. 5389–92, 8 maio 2001.
- NEAR, T. J. et al. Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 34, p. 13698–13703, 2012.
- NELSON, G. J. Infraorbital bones and their bearing on the phylogeny and geography of osteoglossomorph fishes. **Am Mus Nov**, n. 2394, 1969.
- NELSON, J. S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley and Sons, Inc. press, 2006.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the World**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016.
- NEWBREY, M. G.; BOZEK, M. A. Age, growth, and mortality of *Joffrichthys triangulpterus* (Teleostei: Osteoglossidae) from the Paleocene Sentinel Butte Formation, North Dakota, U.S.A. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 23, n. 3, p. 494–500, 12 set. 2003.
- OCALEWICZ, K. Telomeres in Fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n. 2–3, p. 114–125, 2013.
- OLIVEIRA, V. DE; POLETO, S. L.; VENERE, P. C. Feeding of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae) in their natural environment, lago Quatro Bocas, Araguaiana-MT, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 2, p. 312–314, jun. 2005.
- ONO, E. A. Perspectivas para o aumento da oferta de juvenis de pirarucu. **Panorama da Aqüicultura**, v. 17, n. 100, p. 45–47, 2007.
- ONO, E. A.; HALVERSON, M. R.; KUBITZA, F. Pirarucu, o gigante esquecido. **Panorama da Aqüicultura**, v. 14, n. 81, p. 14–25, 2004.
- ORSINI, L.; SPANIER, K. I.; DE MEESTER, L. U. C. Genomic signature of natural and anthropogenic stress in wild populations of the waterflea *Daphnia magna*:



- validation in space, time and experimental evolution. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 9, p. 2160–2175, 2012.
- ORTIZ-BARRIENTOS, D.; ENGELSTÄDTER, J.; RIESEBERG, L. H. Recombination Rate Evolution and the Origin of Species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 3, p. 226–236, 1 mar. 2016.
- OZOUF-COSTAZ, C. et al. First insights into karyotype evolution within the family Mormyridae. **Cybium**, v. 39, n. 3, p. 227–236, 2015.
- PATTERSON, C. The distribution of the Mesozoic freshwater fishes. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. nouvelle s, n. 88, p. 156–174, 1975.
- PATTERSON, C. The development of the North American fish fauna—a problem of historical biogeography. **Chance, change and challenge**, v. 2, p. 265–281, 1981.
- PEDINOTTI, V. et al. Evaluation of the ISBA-TRIP continental hydrologic system over the Niger basin using in situ and satellite derived datasets. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 16, n. 6, p. 1745–1773, 26 jun. 2012.
- PELICICE, F. M. et al. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 6, p. 1119–1133, 1 nov. 2017.
- PELLESTOR, F. et al. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. **Hum Reprod Update**, v. 17, 2011.
- PENDÁS, A. M. et al. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet Cell Genet**, v. 67, 1994.
- PEREZ, M. F. et al. Model-based analysis supports interglacial refugia over long-dispersal events in the diversification of two South American cactus species. **Heredity**, v. 116, p. 550–557, 2016.
- PETROV, D. A. Mutational Equilibrium Model of Genome Size Evolution. **Theoretical Population Biology**, v. 61, n. 4, p. 533–546, 2002.
- PHILLIPS, S. J.; ANDERSON, R. P.; SCHAPIRE, R. E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, v. 190, p. 231–259, 2006.
- PICOUET, C.; HINGRAY, B.; OLIVRY, J. C. Empirical and conceptual modelling of the suspended sediment dynamics in a large tropical African river: the Upper Niger river basin. **Journal of Hydrology**, v. 250, n. 1–4, p. 19–39, 1 set. 2001.
- PINDELL, J. L. et al. A plate-kinematic framework for models of Caribbean evolution. **Tectonophysics**, v. 155, n. 1–4, p. 121–138, 1988.
- PINESE, Jose Fernando. **Morfologia funcional da alimentação do pirarucu (Arapaima gigas)**. 1996. Tese de Doutorado. apresentada ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Doutor em Ciências.
- POLETO, A. B.; FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. The B chromosome of the cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbors 18 S rRNA genes. **BMC Genetics**, v. 11, 2010.
- PRADO-LIMA, M.; VAL, A. L. Differentially expressed genes in the pituitary of the Amazonian fish *Arapaima gigas*. **International Journal of Fisheries and Aquaculture**, v. 7, n. 8, p. 132–141, 25 ago. 2015.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Population (English Edition)**, 2000.
- QUEIROZ, H. L. **Natural history and conservation of pirarucu, *Arapaima gigas*, at the Amazonian Várzea: red giants in muddy waters**. St Andrews: Universidade de St Andrews, 2000.

- RÁB, P. et al. Karyotype and Mapping of Repetitive DNAs in the African Butterfly Fish *Pantodon buchholzi*, the Sole Species of the Family Pantodontidae. **Cytogenetic and genome research**, v. 149, n. 4, p. 312–320, 2016.
- RABINOWITZ, P. D.; LABRECQUE, J. The Mesozoic South Atlantic Ocean and evolution of its continental margins. **Journal of Geophysical Research**, v. 84, n. B11, p. 5973, 1979.
- RABOSKY, D. L. et al. Rates of speciation and morphological evolution are correlated across the largest vertebrate radiation. **Nat Commun**, v. 4, 2013.
- RAJ, A.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. fastSTRUCTURE: Variational Inference of Population Structure in Large SNP Data Sets. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 573–589, 1 jun. 2014.
- RAVI, V.; VENKATESH, B. Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. **Curr Opin Genet Dev**, v. 18, n. 6, p. 544–550, 2008.
- REIS, R. E. et al. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.
- RESENDE, M. D. V et al. Genomic selection for growth and wood quality in Eucalyptus: capturing the missing heritability and accelerating breeding for complex traits in forest trees. **New Phytologist**, v. 194, n. 1, p. 116–128, 2012.
- RIBAS, C. C. et al. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1729, p. 681–689, 2012.
- RICCOMINI, C. et al. Processos fluviais e lacustres e seus registros. **Decifrando a terra**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2009.
- RIDGEWAY, G. The State of Boosting. **Computing Science and Statistics**, 1999.
- RIPLEY, Brian D.; HJORT, N. L. **Pattern recognition and neural networks**. Cambridge university press, 1996.
- ROBERTS, T. R. Systematic revision of the old world freshwater fish family Notopteridae. **Ichthyol. Explor. Freshw.** v. 2, p. 361–383, 1992.
- ROMANO, C. et al. Permian-Triassic Osteichthyes (bony fishes): diversity dynamics and body size evolution. **Biological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 106–147, 1 fev. 2016.
- ROSENBERG, N. A. DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 137–138, 2004.
- ROSS, J. L. S. **Geomorfologia: ambiente e planejamento**. São Paulo: Editora Contexto, 1990.
- ROSS, J. L. S. (UNIVERSIDADE DE S. P. O relevo Brasileiro no contexto da América do Sul. **Revista Brasileira de Geografia - RBG**, v. 61, n. 1, p. 21–58, 2016.
- ROSSETTI, D. F.; VALERIANO, M. M. Evolution of the lowest amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. **Catena**, v. 70, n. 2, p. 253–265, 2007.
- ROUBACH, R. et al. Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v. 34, n. 1, p. 28–35, 2003.
- RULL, V. Neotropical diversification: historical overview and conceptual insights. 2018.
- SACEK, V. Drainage reversal of the Amazon River due to the coupling of surface and lithospheric processes. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 401, p. 301–312, 2014.
- SACEK, V. Post-rift influence of small-scale convection on the landscape evolution at divergent continental margins. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 459, p. 48–57, 2017.
- SAENJUNDAENG, P. et al. Chromosomes of Asian cyprinid fishes: cytogenetic

- analysis of two representatives of small paleotetraploid tribe Probarbini. **Molecular Cytogenetics**, v. 11, n. 1, p. 51, 4 dez. 2018.
- SAINT-PAUL, U. Potencial para a aquicultura de peixes sul americanos: uma revisão. **Aquicultura**, v. 54, n. 3, p. 205–240, 1986.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). **Immunol**, v. 49, p. 895–909, 2001.
- SÁNCHEZ-SEVILLA, J. F. et al. Diversity Arrays Technology (DArT) marker platforms for diversity analysis and linkage mapping in a complex crop, the octoploid cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144960, 2015.
- SANMARTIN, I.; RONQUIST, F. Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. 2004.
- SANTOS, R. S. *Laeliichthys ancestralis*, novo gênero e espécie de Osteoglossiformes do Aptiano da Formação Areado, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Coletânea de Trabalhos Paleontológicos**, v. 27, p. 161–167, 1985.
- SAWAYA, P. **Sobre a biologia de alguns peixes de respiração aérea. (Lepidosiren paradoxa FITZ. e Arapaima gigas CUV).** Boletins da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo. **Zoologia**, 1946.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC-and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma**, v. 77, n. 1, p. 83–103, 1980.
- SCHRIDER, D. R.; KERN, A. D. Supervised Machine Learning for Population Genetics: A New Paradigm. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 4, p. 301–312, 2018.
- SCHUELER, M. G. et al. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. **Science**, v. 294, 2001.
- SEMBER, A. et al. Sex Chromosome Evolution and Genomic Divergence in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 71, 5 mar. 2018.
- SHAPIRO, J. A.; VON STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 227–250, maio 2005.
- SHEEHAN, S.; SONG, Y. S. Deep learning for population genetic inference. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 3, p. e1004845, 2016.
- SILVA-SANTOS, R. et al. Molecular Evidences of a Hidden Complex Scenario in *Leporinus cf. friderici*. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 47, 15 fev. 2018.
- SILVESTRO, D. et al. Conceptual and empirical advances in Neotropical biodiversity research. **PeerJ**, v. 6, p. e5644, 2018a.
- SILVESTRO, D. et al. Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 23, p. 6034–6039, 2018b.
- SIOLI, H. **Studies in Amazonian waters.** Atas do simpósio sobre a biota amazônica. **Anais...1967**
- SMADJA, C. M.; BUTLIN, R. K. A framework for comparing processes of speciation in the presence of gene flow. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 24, p. 5123–5140, 1 dez. 2011.
- SOARES JÚNIOR, A. V. et al. Evolução do rifteamento e paleogeografia da margem Atlântica Equatorial do Brasil Triássico ao Holoceno. **Geociências**, v. 30, n. 4, p. 669–692, 1 dez. 2011.
- SOARES, M. DO C. F.; NORONHA, E. A. P. **Pirarucu, Arapaima gigas: Uma revisão bibliográfica visando à aquicultura sustentável.** (E. A. Oeste, Ed.) 1º Congresso Brasileiro: De Produção de Peixes Nativos de Água Doce. Embrapa

- Agropecuária Oeste. **Anais...Recife** - PE: 2007
- SOARES, M. G. M. et al. Peixes de lagos do médio Rio Solimões. n. July, p. 160, 2008.
- SOCHOROVÁ, J. et al. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. **Chromosoma**, v. 127, n. 1, p. 141–150, 30 mar. 2018.
- SPARKS, J. S.; SMITH, W. L. Freshwater fishes, dispersal ability, and nonevidence: “Gondwana life rafts” to the rescue. **Systematic Biology**, v. 54, n. 1, p. 158–165, 2005.
- STEANE, D. A. et al. Population genetic analysis and phylogeny reconstruction in Eucalyptus (Myrtaceae) using high-throughput, genome-wide genotyping. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 59, n. 1, p. 206–224, 2011.
- STEWART, D. J. Re-description of *Arapaima agassizii* (Valenciennes), a Rare Fish from Brazil (Osteoglossomorpha: Osteoglossidae). **Copeia**, v. 2013, n. 1, p. 38–51, 2013a.
- STEWART, D. J. A New Species of *Arapaima* (Osteoglossomorpha: Osteoglossidae) from the Solimões River, Amazonas State, Brazil. **Copeia**, v. 2013, n. 3, p. 470–476, 2013b.
- STIASSNY, M. L. J. The medium is the message: freshwater biodiversity in peril. In: **The living planet crisis: biodiversity science and policy**. New York: Columbia University Press, 1999. p. 53–71.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, n. 1, p. 304–306, 1972.
- SUMNER, A. T. **Chromosomes : organization and function**. Oxford: Blackwell Pub, 2003.
- SUPIWONG, W. et al. Karyotype diversity and evolutionary trends in the Asian swamp eel *Monopterus albus* (Synbranchiformes, Synbranchidae): A case of chromosomal speciation? 06 Biological Sciences 0604 Genetics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 19, n. 1, 8 mar. 2019.
- SUZUKI, R.; SHIMODAIRA, H. Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. **Bioinformatics**, v. 22, n. 12, p. 1540–1542, 2006.
- SYMONOVA, R. et al. Characterization of fish genomes by GISH and CGH. **Fish Cytogenetic Techniques. Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans. CCR Press: Boca Raton**, p. 118–131, 2015.
- SYMONOVA, R. et al. Molecular cytogenetic differentiation of paralogs of Hox paralogs in duplicated and re-diploidized genome of the North American paddlefish (*Polyodon spathula*). **BMC Genetics**, v. 18, n. 1, p. 19, 2 dez. 2017.
- SYMONOVA, R. et al. Karyotype Variability and Inter-Population Genomic Differences in Freshwater Ostracods (Crustacea) Showing Geographical Parthenogenesis. **Genes**, v. 9, n. 3, p. 150, 8 mar. 2018.
- SYMONOVA, R.; HOWELL, W. Vertebrate Genome Evolution in the Light of Fish Cytogenomics and rDNAomics. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 96, 2018.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucl Acids Res.**, v. 12, n. 10, p. 4127–4138, 25 maio 1984.
- TAVERNE, L. Ostéologie, phylogenese et systématique des téléostéens fossiles et actuels du super-ordre des Ostéoglossomorphes. Part III. Évolution des structures ostéologiques et conclusions générales relatives ala phylogenese et ala systématique du super-ordre. **Mémoires de la Classe des Sciences, Académie Royale de Belgique, Collection in-80, 2o Série**, v. 43 (3), p. 1–168, 1979.
- TAVERNE, L. Les ostéoglossomorphes marins de l'Éocène du Monte Bolca (Italie):

- Monopteros Volta 1796, Thrissopterus Heckel, 1856 et Foreyichthys Taverne, 1979. Considérations sur la phylogénie des téléostéens ostéoglossomorphes. **Studie e Ricerche sui Giacimenti Terziari di Bolca**, v. 7, p. 67–158, 1998.
- TAVERNE, L. On the presence of a second osteoglossid fish (Teleostei, Osteoglossiformes) in the continental lower Cretaceous of the Democratic Republic of Congo (Central Africa). **Geo-Eco-Trop**, v. 39, n. 2, p. 247–254, 2015.
- TAVERNE, L.; MAISEY, J. G. A notopterid skull (Teleostei, Osteoglossomorpha) from the continental early Cretaceous of southern Morocco. **AmMusNov**, v. Number 326, n. 3260, 1999.
- THOMÉ, M. T. C.; CARSTENS, B. C. Phylogeographic model selection leads to insight into the evolutionary history of four-eyed frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 29, p. 8010–8017, 2016.
- THUILLER, W. et al. BIOMOD - A platform for ensemble forecasting of species distributions. **Ecography**, v. 32, p. 369–373, 2009.
- TORATI, L. S. et al. Genetic diversity and structure in *Arapaima gigas* populations from Amazon and Araguaia-Tocantins river basins. **BMC Genetics**, v. 20, n. 1, p. 13, 2019.
- TRAUT, W.; WINKING, H. Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: Zebrafish, platyfish and guppy. **Chromosome Research**, v. 9, n. 8, p. 659–672, 2001.
- TRIFONOV, Vladimir A.; VOROBIEVA, Nadezhda N.; RENS, Willem. FISH with and without COT1 DNA. In: **Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Application Guide**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 99-109.
- ÚBEDA-MANZANARO, M. et al. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)*n* and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae Family. **Genetica**, v. 138, 2010.
- URUSHIDO, T. Karyotype of three species of fishes in the order Osteoglossiformes. **Chromosome Inform. Service**, v. 18, p. 20–22, 1975.
- UTSUNOMIA, R. et al. Uncovering the Ancestry of B Chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0150573, 2 mar. 2016.
- VALENTE, G. T. et al. Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Research**, v. 17, n. 6, p. 791, 2009.
- VAN ORSOUW, N. J. et al. Complexity Reduction of Polymorphic Sequences (CRoPS™): A Novel Approach for Large-Scale Polymorphism Discovery in Complex Genomes. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. e1172, 14 nov. 2007.
- VAN SOELEN, E. E. et al. A 30 Ma history of the Amazon River inferred from terrigenous sediments and organic matter on the Ceará Rise. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 474, p. 40–48, 15 set. 2017.
- VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: an overview. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**, v. 1, p. 1–12, 1998.
- VENKATESH, B. Evolution and diversity of fish genomes. **Curr Opin Genet Dev**, v. 13, 2003.
- VIALLE, R. A. et al. Whole Genome Sequencing of the Pirarucu (*Arapaima gigas*) Supports Independent Emergence of Major Teleost Clades. **Genome Biology and Evolution**, v. 10, n. 9, p. 2366–2379, 1 set. 2018.
- VILLANEA, F. A.; SCHRAIBER, J. G. Neanderthal and modern humans. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, p. 39–44, 2019.
- VILLEGAS, J. M. C. **Geologia estrutural da Bacia do Marajó**. Belém: Universidade

- Federal do Pará, 1994.
- VITORINO, C. A. et al. Genetic diversity of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the Araguaia-Tocantins basin estimated by ISSR marker. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 557–568, 2015.
- VITORINO, C. A. et al. Low genetic diversity and structuring of the arapaima (Osteoglossiformes, Arapaimidae) population of the Araguaia-Tocantins basin. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. OCT, p. 1–10, 2017.
- VOLFF, J. N. et al. The non-LTR retrotransposon Rex3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Mol Biol Evol**, v. 16, 1999.
- WATANABE, L. et al. De novo transcriptome based on next-generation sequencing reveals candidate genes with sex-specific expression in *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), an ancient Amazonian freshwater fish. **PLOS ONE**, v. 13, n. 10, p. e0206379, 29 out. 2018.
- WATSON, L. C. et al. Trophic ecology of *Arapaima* in Guyana: giant omnivores in Neotropical floodplains. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 341–349, jun. 2013.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358–1370, 1984.
- WENZL, P. et al. A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 206, 12 ago. 2006.
- WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973–982, 1 dez. 2007.
- WILSON, M. V. H.; MURRAY, A. M. Osteoglossomorpha: phylogeny, biogeography, and fossil record and the significance of key African and Chinese fossil taxa. **Geological Society, London, Special Publications**, v. 295, n. 1, p. 185–219, 2008.
- WOODRUFF, D. S. Declines of biomes and biotas and the future of evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 10, p. 5471–6, 8 maio 2001.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97–159, 1931.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations**. Vol 4 ed. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- YANO, C. F. et al. W Chromosome Dynamics in *Triporthus* Species (Characiformes, Triporthidae): An Ongoing Process Narrated by Repetitive Sequences. **Journal of Heredity**, v. 107, n. 4, p. 342–348, 1 jul. 2016.
- YANO, C. F. et al. Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triporthus* (Characiformes, Triporthidae). **Heredity**, v. 118, n. 3, p. 276–283, 21 mar. 2017.
- ZHANG, J.; ZHANG, Y.; ROSENBERG, H. F. Adaptive evolution of a duplicated pancreatic ribonuclease gene in a leaf-eating monkey. **Nature Genetics**, v. 30, n. 4, p. 411–415, 4 abr. 2002.
- ZHANG, Y. R. et al. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure in the small yellow croaker at the coast of Yellow Sea and East China Sea. **Biochem Syst Ecol**, v. 71, 2017.
- ZWICK, M. S. et al. A rapid procedure for the isolation of C 0 t-1 DNA from plants. **Genome**, v. 40, n. 1, p. 138–142, 1997.

# **Anexos**

## 1. Lista de Publicações

18. Sassi, FDMC; **De Oliveira, EA**; Bertollo, LAC; Nirchio, M; Hatanaka, T; Marinho, MMF; Moreira-Filho, O; Aroutiounian, R; Liehr, T; Al-Rikabi, ABH; Cioffi, MDB. Chromosomal Evolution and Evolutionary Relationships of Lebiasina Species (Characiformes, Lebiasinidae). *International journal of molecular sciences*, 20(12), (2019).
17. De Moraes, RLR; Sember, A; Bertollo, LAC; **De Oliveira, EA**; Ráb, P; Hatanaka, T; Marinho, MMF; Liehr, T; Al-Rikabi, ABH, Feldberg, E; Viana, PF; Cioffi MB. Comparative cytogenetics and neo-Y formation in small-sized fish species of the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). *Front. Genet*, (2019).
16. Xu, D; Sember, A; Zhu, Q; **De Oliveira, EA**; Liehr, T; Al-Rikabi, AB; Zhizhong, X; Hongbin, S; Cioffi, MDB. Deciphering the Origin and Evolution of the X1X2Y System in Two Closely-Related Oplegnathus Species (Oplegnathidae and Centrarchiformes). *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3571 (2019).
15. Santos, EO; Deon, GA; Almeida, RB; **De Oliveira, EA**; Nogaroto, V; Silva, HP; Pavanelli, CS; Cestari, MM; Bertollo, LAC; Moreira-Filho, O; Vicari, MR. Cytogenetics and DNA barcode reveal an undescribed *Apareiodon* species (Characiformes: Parodontidae). *Genetics and Molecular Biology*, Epub June 27, (2019).
14. Barby, FF; Bertollo, LAC; **De Oliveira, EA**; Yano, CF; Hatanaka, T; Ráb, P; Sember, A; Ezaz, T; Artoni, RF; Liehr, T; Al-Rikabi, ABH; Trifonov, V; De Oliveira, EHC; Molina, WF; Jegede, OI; Tanomtong, A; De Bello Cioffi, M. Emerging patterns of genome organization in Notopteridae species (Teleostei, Osteoglossiformes) as revealed by Zoo-FISH and Comparative Genomic Hybridization (CGH). *Scientific Reports*, v. 9, p. 1112 (2019).
13. Supiwong, W; Pinthong, K; Seetapan, K; Saenjundaeng, P; Bertollo, LAC; **De Oliveira, EA**; Yano, CF; Liehr, T; Phimphan, S; Tanomtong, A; B Cioffi, M. Karyotype diversity and evolutionary trends in the Asian swamp eel *Monopterus albus* (Synbranchiformes, Synbranchidae): a case of chromosomal speciation? *BMC Evolutionary Biology* v. 19, p. 73 (2019).
12. **De Oliveira, EA**; Bertollo, LAC; Rab, P; Ezaz, T; Yano, CF; Hatanaka, T; Jegede, OI; Tanomtong, A; Liehr, T; Sember, A; Maruyama, SR; Feldberg, E; Viana, PF; Cioffi, MB. Cytogenetics, genomics and biodiversity of the South American and African Arapaimidae fish family (Teleostei, Osteoglossiformes). *PLoS One* v. 14, p. e0214225 (2019).
11. Barby, F; Ráb, P; Lavoué, S; Ezaz, T; Bertollo, L; Kilian, A; Maruyama, S; **De Oliveira, EA**; Artoni, R; Santos, M; Ilesanmi Jegede, O; Hatanaka, T; Tanomtong, A; Liehr, T; Cioffi, M. From Chromosomes to Genome: Insights into the Evolutionary Relationships and Biogeography of Old World Knifefishes (Notopteridae; Osteoglossiformes). *Genes* v. 9, p. 306-327 (2018).
10. Hatanaka, T; **De Oliveira, EA**; Ráb, P; Yano, CF; Bertollo, LAC; Ezaz,



T; Jegede, OOI; Liehr, T; Olaleye, VF; De Bello Cioffi, M. First chromosomal analysis in *Gymnarchus niloticus* (Gymnarchidae: Osteoglossiformes): insights into the karyotype evolution of this ancient fish order. *Biological Journal of the Linnean Society* v. 125, p. 83-92 (2018).

9. Saenjundaeng, P; De Bello Cioffi, M; **De Oliveira, EA**; Tanomtong, A; Supiwong, W; Phimphan, S; Collares-Pereira, MJ; Sember, A; Bertollo, LAC; Liehr, T; Yano, CF; Hatanaka, T; Ráb, P. Chromosomes of Asian cyprinid fishes: cytogenetic analysis of two representatives of small paleotetraploid tribe Probarbini. *Molecular Cytogenetics* v. 11, p. 51 (2018).

8. Sember, A; Bertollo, LAC; Rab, P; Yano, CF; Hatanaka, T; **Oliveira, EA**; Cioffi, MB. Sex Chromosome Evolution and Genomic Divergence in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Frontiers in Genetics* v. 9, p. 1-12 (2018).

7. Freitas, NL; Al-Rikabi, ABH; Bertollo, LAC; Ezaz, T; Yano, CF; **De Oliveira, EA**; Hatanaka, T; Cioffi, MB. Early Stages of XY Sex Chromosomes Differentiation in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) Revealed by DNA Repeats Accumulation. *Current Genomics* v. 19, p. 216-226 (2018).

6. **De Oliveira, EA**; Sember, A; Bertollo, LAC; Yano, CF; Ezaz, T; Moreira-Filho, O; Hatanaka, T; Trifonov, V; Liehr, T; Al-Rikabi, ABH; Ráb, P; Pains, H; Cioffi, MB. Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY1Y2 system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). *Chromosoma* v. 1, p. 1-14 (2017).

5. Carvalho, PC; **De Oliveira, EA**; Bertollo, LAC; Yano, CF; Oliveira, C; Decru, E; Jegede, OI; Hatanaka, T; Liehr, T; Al-Rikabi, ABH; Cioffi, MB. First Chromosomal Analysis in Hepsetidae (Actinopterygii, Characiformes): Insights into Relationship between African and Neotropical Fish Groups. *Frontiers in Genetics* v. 8, p. 203 (2017).

4. Xu, D; Molina, WF; Yano, CF; Zhang, Y; **De Oliveira, EA**; Lou, B; Cioffi, MB. Comparative cytogenetics in three Sciaenid species (Teleostei, Perciformes): Evidence of interspecific chromosomal diversification. *Molecular Cytogenetics* v. 10, p. 1 (2017).

3. Ráb, P; Yano, CF; Lavoué, S; Jegede, OI; Bertollo, LAC; Ezaz, T; Majtánová, Z; **De Oliveira, EA**; Cioffi, MB. Karyotype and Mapping of Repetitive DNAs in the African Butterfly Fish *Pantodon buchholzi*, the Sole Species of the Family Pantodontidae. *Cytogenetic and Genome Research*, v. online, p. 1-8 (2016).

2. Cioffi, MB; Bertollo, LAC; Villa, MA; **De Oliveira, EA**; Tanomtong, A; Yano, CF; Supiwong, W; Chaveerach, A. Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and Its Implications for the Chromosomal Evolution of Channid Fishes (Actinopterygii, Perciformes). *PLoS One* v. 10, p. e0130199 (2015).

1. **De Oliveira, EA**; Bertollo, LAC; Yano, CF; Liehr, T; Cioffi, MB. Comparative cytogenetics in the genus *Hoplias* (Characiformes,

Erythrinidae) highlights contrasting karyotype evolution among congeneric species. *Molecular Cytogenetics* v. 8, p. 8:56 (2015).

## **2. Versão publicada do artigo contido na tese**

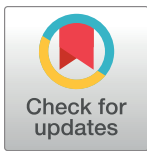
## RESEARCH ARTICLE

# Cytogenetics, genomics and biodiversity of the South American and African Arapaimidae fish family (Teleostei, Osteoglossiformes)

Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>1,2</sup>, Luiz Antonio Carlos Bertollo<sup>1</sup>, Petr Rab<sup>3</sup>, Tariq Ezaz<sup>4</sup>, Cassia Fernanda Yano<sup>1</sup>, Terumi Hatanaka<sup>1</sup>, Oladele Ilesanmi Jegede<sup>5</sup>, Alongklod Tanomtong<sup>6</sup>, Thomas Liehr<sup>7</sup>, Alexandr Sember<sup>3</sup>, Sandra Regina Maruyama<sup>1</sup>, Eliana Feldberg<sup>8</sup>, Patrik Ferreira Viana<sup>8</sup>, Marcelo de Bello Cioffi<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz, São Carlos, SP, Brazil, **2** Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso—SEDUC-MT, Cuiabá, MT, Brazil, **3** Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Czech Republic, **4** Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Canberra, Australia, **5** Department of Fisheries and Aquaculture, Adamawa State University, Adamawa State, Nigeria, **6** Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, KhonKaen University, Muang, KhonKaen, Thailand, **7** Institute of Human Genetics, University Hospital Jena, Jena, Germany, **8** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade, Laboratório de Genética Animal, Petrópolis, CEP: Manaus, AM, Brazil

\* [mbcioffi@ufscar.br](mailto:mbcioffi@ufscar.br)



## OPEN ACCESS

**Citation:** de Oliveira EA, Bertollo LAC, Rab P, Ezaz T, Yano CF, Hatanaka T, et al. (2019) Cytogenetics, genomics and biodiversity of the South American and African Arapaimidae fish family (Teleostei, Osteoglossiformes). PLoS ONE 14(3): e0214225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214225>

**Editor:** Zuogang Peng, SOUTHWEST UNIVERSITY, CHINA

**Received:** October 2, 2018

**Accepted:** March 9, 2019

**Published:** March 25, 2019

**Copyright:** © 2019 de Oliveira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** MBC was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. nos 401962/2016-4 and 302449/2018-3), CNPQ: [www.cnpq.br](http://www.cnpq.br), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. No 2016/22196-2), FAPESP: [www.fapesp.br](http://www.fapesp.br), and CAPES/Alexander von Humboldt (Proc. No. 88881.136128/2017-01),

## Abstract

Osteoglossiformes represents one of the most ancestral teleost lineages, currently widespread over almost all continents, except for Antarctica. However, data involving advanced molecular cytogenetics or comparative genomics are yet largely limited for this fish group. Therefore, the present investigations focus on the osteoglossiform family Arapaimidae, studying a unique fish model group with advanced molecular cytogenetic genomic tools. The aim is to better explore and clarify certain events and factors that had impact on evolutionary history of this fish group. For that, both South American and African representatives of Arapaimidae, namely *Arapaima gigas* and *Heterotis niloticus*, were examined. Both species differed markedly by diploid chromosome numbers, with  $2n = 56$  found in *A. gigas* and  $2n = 40$  exhibited by *H. niloticus*. Conventional cytogenetics along with fluorescence *in situ* hybridization revealed some general trends shared by most osteoglossiform species analyzed thus far, such as the presence of only one chromosome pair bearing 18S and 5S rDNA sites and karyotypes dominated by acrocentric chromosomes, resembling thus the patterns of hypothetical ancestral teleost karyotype. Furthermore, the genomes of *A. gigas* and *H. niloticus* display remarkable divergence in terms of repetitive DNA content and distribution, as revealed by comparative genomic hybridization (CGH). On the other hand, genomic diversity of single copy sequences studied through principal component analyses (PCA) based on SNP alleles genotyped by the DArT seq procedure demonstrated a very low genetic distance between the South American and African Arapaimidae species; this pattern contrasts sharply with the scenario found in other osteoglossiform species. Underlying evolutionary mechanisms potentially explaining the obtained data have been suggested and discussed.

CAPES: [www.capes.gov.br](http://www.capes.gov.br), AVH: <https://www.humboldt-foundation.de/web/home.html>. PR was supported by the project EXCELLENCE CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000460 OP RDE and with the institutional support RVO: 67985904 (PR). SRM was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2017/16328-6). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

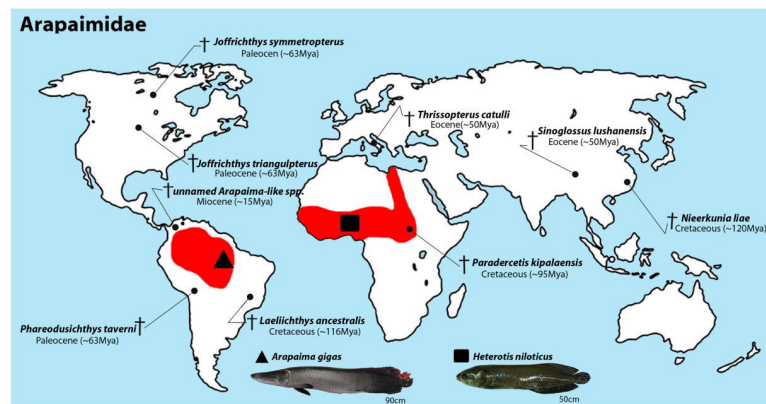
**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Freshwater fishes represent an important model group for biogeographic studies, as their evolution is often tightly linked with (and affected by) the Earth’s geological development that shapes the freshwater networks [1,2]. Consequently, each continent presents characteristic freshwater fish faunas, where the proper distributional patterns are modified by physical barriers that blocked the dispersion of ancestors for many present-day species. The freshwater order Osteoglossiformes is an important model for biogeographic studies [3–5] as it represents one of the main ancestral teleostean lineages [6–8] that shows a worldwide distribution, with at least one representative in each continent of the southern hemisphere, except for Antarctica. According to the current taxonomy, Osteoglossiformes includes the suborders Osteoglossoidei (including the Osteoglossidae, Arapaimidae, Pantodontidae families) and Notopteroidei (including the Gymnarchidae, Mormyridae, and Notopteridae families) [6,9].

Arapaimidae includes the South American genus *Arapaima* and the African genus *Heterotis*, which are distributed in various freshwaters of these continents (Fig 1). *Heterotis* is reputedly represented by the sole bonytongue species *H. niloticus*, but the actual species diversity is unknown, with some preliminary reports indicating possible fast ongoing genetic differentiation [10,11]. The African bonytongue can reach up to 1 m in length, and, due to the demand and popularity of their meat [10], this species has experienced a huge population decrease and has been recently included in the list of endangered species [12].

*Arapaima* has been considered monotypic since Günther grouped *A. arapaima*, *A. mapae*, and *A. agassizii* into a single taxon, *A. gigas* [13–15]. However, recent studies have led to the conclusion that all three taxa are valid as separate, well-diagnosed species and one additional new species, *A. leptosoma*, has been described, with further indications that the list of *Arapaima*’s species will likely continue to grow [14,15]. Hence, *Arapaima* genus lost the monotypic status, encompassing more species than appreciated for more than one century. The real problem may be represented by the fact that these species are known just from their holotypes and their actual distribution is unknown, because all *Arapaima* individuals are recognized as *A. gigas*, popularly known as “pirarucus”. The natural distribution of these fishes covers a large part of the Brazilian Araguaia–Tocantins and Amazon River basins [16,17]. They live preferentially in lentic environments such as floodplains and lakes, with significant sedentary behavior [18,19], displaying complex reproductive strategies, including nest building and a high level of



**Fig 1. Geographical distribution of Arapaimidae fishes and the sampling locations.** Distribution areas of extant Arapaimidae species (red) and the currently described fossil records (crosses). The fossil records are based on descriptions reported by [4,9,22–27]. The sampling sites are marked by triangle for *Arapaima gigas* (Brazil) and square for *Heterotis niloticus* (Nigeria).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214225.g001>

parental care [20, 21]. Being one of the largest freshwater fishes of the planet, with individuals measuring up to 4 m in length, they have been subjected to extensive fishery activities for years [6].

The break-up of Gondwana has been discussed as being the driving force for the speciation and intercontinental distribution of the extant arapaimids. However, based on the fossil record, common ancestors of living Arapaimidae were widespread in the world, inhabiting both Laurasia and Gondwanaland (Fig 1). This is also consistent with molecular evidences suggesting that the diversification into osteoglossiform (sub-) families started before the Pangea break-up [3,5]. Extant living arapaimids are represented by only two genera, namely the African *Heterotis* which is native to all basins of the Sahelo-Sudanese region, Senegal, Gambia, Corubal, Volta, Ouémé, Niger, Bénoue, Chad and Nile basins, and the South American *Arapaima*, widely distributed throughout the Amazon lowlands, Araguaia-Tocantins river basin and Guiana. Consequently, an intriguing question arises: how do the living arapaimids reach the South American territory? In this sense, speculations on the role of vicarious events in the divergent process among such species are plausible. However, while geological data suggest that Africa and South America started to separate in the early Cretaceous (~135 Mya) [28], slowly settling in the middle of the Cretaceous between 120–110 Mya with the increase of the Atlantic Ocean to the south [29], by using nuclear and mitogenomic markers and calibration with fossil records, it was estimated that the time of divergence between these two lineages occurred within the range of 85 to 50 Mya [5], thus requiring alternative biogeographic hypotheses to explain the current intercontinental distribution of these fishes. Therefore, diversified approaches, including karyotype and high-resolution sequencing analyzes have been employed and interpreted within the context of Arapaimidae biogeographic history, in order to provide novel complex insight into this matter.

Advances in cytogenetic techniques have provided evidence that repetitive DNA sequences play an important role in the structural and functional organization of the genomes [30,31]. In the last two decades, large amounts of data were generated concerning the chromosomal mapping of repetitive DNAs in several fish species [32]. However, the cytogenetic data for representatives of Osteoglossiformes are still scarce and, when available, they originate from studies performed in the early 1970s and are mainly restricted to the description of the diploid number (2n) and the karyotype structure. A summary table with such information can be found in Ráb et al. [33]. Within Arapaimidae, only two studies reporting the distribution of the constitutive heterochromatin and the mapping of rDNA sequences in chromosomes have been performed up to now [34,35].

Comparative genomic hybridization (CGH) is a FISH-based method that utilize total genomic DNAs (gDNAs) of the investigated organisms as a hybridization probe. Through CGH, it is possible to compare the genomic content from two (or more) different sources on the level of gross molecular composition, once the probes are simultaneously hybridized onto chromosomal preparations of interest [36–39]. The principle of the method is based on the differential distribution of already divergent genome-specific repetitive DNA classes, as this highly abundant genomic fraction display faster evolutionary rate than the single-copy regions [31,40,41]. Such methodology has been, for instance, successfully applied for i) the identification of parental genomes in hybrids/allopolyploids, ii) delimitation of sex-specific regions on both homomorphic and heteromorphic sex chromosomes or iii) the genome comparisons among related species (for references, see [42]).

Here we performed comprehensive molecular cytogenetic analysis for the representatives of Arapaimidae family by applying differential cytogenetic methods, such as C-banding, CGH and physical mapping of certain repetitive DNA classes through FISH, complemented with DArT-seq molecular analysis using single nucleotide polymorphisms (SNPs). The main goal

was to investigate and compare patterns of the chromosomal and the gross-scale genome evolution in two representatives of Arapaimidae from two different continents and to interpret them within the context of known data from other osteoglossiform fishes, bringing thus new insights into evolutionary trends within the group.

## Materials and methods

### Animals, mitotic chromosome preparation, and banding procedures

Individuals unambiguously identified as *Heterotis niloticus* (four females and four males; Oluwa River (Africa), 6° 16' 60.0"N 4° 49' 00.0"E) and *Arapaima gigas* (seven females and eight males; Tocantins River basin (South America), 11° 5' 14.90"S, 49° 56' 21.72"W) were analyzed (Fig 1).

All the specimens of *Heterotis niloticus* were deposited under voucher number 20558 in the Museum of Universidade Estadual Paulista (UNESP, Botucatu). The specimens of *Arapaima gigas* were deposited in the Museum of Zoology of the University of São Paulo (MZUSP), under voucher number 121639. Samples were collected with the authorization of the Brazilian environmental agency ICMBIO/SISBIO (n° 48290–1) and SISGEN (n° A96FF09). No authorization for sampling the African specimens was required. The identity of *A. gigas* was determined based on diagnostic characters provided by Stewart [14,15]. In order to increase the number of mitotic cells, animals were first stimulated with yeast suspensions for 48 h [43]. Next, they were euthanized with an overdose of benzocaine (1 g/L) and sacrificed for chromosome preparation, which was done following Bertollo et al. [44], with few modifications, but with one major necessary improvement in the way that we used cells derived from the spleen instead of kidney to obtain mitotic chromosomes of sufficient quality (full protocol details are available as S1 Appendix. The experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Federal de São Carlos (Process in CEUA 1926260315).

C-banding, silver-nitrate impregnation (Ag-NOR) and Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) staining were performed following protocols described by Howell and Black [45], Schmid [46] and Sumner [47], respectively.

### Probe preparation and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis

5S and 18S rDNA fragments were obtained by polymerase chain reaction (PCR) using primers and thermal profiles described in Martins et al. [48] and Cioffi et al. [49], respectively. The 5S rDNA probe was composed of 120 base pairs (bp) of the 5S rRNA-encoding gene and 200 bp of the non-transcribed spacer (NTS), while the 18S rRNA probe encompassed a 1400 bp long segment corresponding to the 18S rRNA gene. The 18S rDNA probe was labeled with Spectrum Orange-dUTP (Vysis, Downers Grove, IL, USA) while the 5S rDNA probe was labeled with Spectrum Green-dUTP (Vysis, Downers Grove, IL, USA), both by nick translation kit, according to the manufacturer's recommendations (Roche, Mannheim, Germany).

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed following Pinkel et al. [50]. The chromosome preparations were incubated with RNase (40 µg/mL) for 1.5 h at 37°C. After denaturation of the chromosomal DNA for 3min in 70% formamide/2× SSC at 70°C, spreads were dehydrated in an ethanol series (70, 85, and 100%), 2 min each. Then, 20 µL of the hybridization mixture (100 ng of each probe, 50% deionized formamide, 10% dextran sulphate) was dropped onto the slides, and the hybridization was performed for 14 h at 37°C in a moist chamber containing 2× SSC. The post-hybridization wash was carried out with 1× SSC for 5 min at 42°C. A final wash was performed at room temperature in 4× SSC for 5 min. Finally, the chromosomes were counterstained with DAPI (1.2 µg/mL) and mounted in anti-fade solution (Vector, Burlingame, CA, USA).

## Comparative genomic hybridization (CGH)

The CGH experiment was performed according to Symonová et al. [39]. For each probe, 1 µg of gDNA was used in the labeling procedure. *A. gigas* gDNA was labeled with digoxigenin-11-dUTP using DIG-nick-translation Mix (Roche), while the *H. niloticus* gDNA was labeled with biotin-16-dUTP using BIO-nick-translation Mix (Roche). The hybridization solution for each slide (25 µL) was composed of 1 µg of each genomic probe and 50 µg of unlabeled C<sub>0</sub>t-1 DNA (i.e. fraction of genomic DNA enriched for highly and moderately repetitive sequences). C<sub>0</sub>t-1 DNA was directly isolated from both species according to Zwick et al. [51]. The chosen ratio of probe vs. C<sub>0</sub>t-1 DNA amount was set based on the experiences gained during analogous experiments performed in our previous studies in fishes [42,52–57]. The chosen ratio 1:50 reflects high stringency towards repetitive DNA blocking and yet avoids the probability of improper probe dissolution in the hybridization buffer, which would otherwise cause artifacts [39,42].

Chromosome preparations were stored overnight in a freezer; they were passed through an ethanol row (70, 85, and 100%, 3 min each) before and after the storage. After that, the slides were aged for 1–2 h at 60°C and treated gradually with RNase (200 µg/mL, 90 min at 37°C in a wet chamber) and with pepsin (50 µg/mL in 10 mM HCl, 3 min, 37°C). Finally, chromosomes were denatured in 75% formamide/2× SSC at 72°C for 5 min, and immediately passed through 70% (cold), 85%, and 100% (Room Temperature) ethanol series (3 min each). The probe mixture (20 µL) was first denatured at 86°C for 8 min and then applied onto the slides, which were then incubated at 37°C in a dark humid chamber for 72 h. The slides were then washed twice in 50% formamide/2× SSC for 10 min each and incubated with 500 µL of 3% bovine serum albumin (BSA)/4× SSC/Tween (20 min, 37°C). The hybridization signals were detected with anti-Digoxigenin-Rhodamine (Roche) diluted in 0.5% BSA in PBS, and avidin-FITC (Sigma) diluted in PBS containing 10% normal goat serum (NGS). The final washes were performed at 44°C in 4× SSC and 0.01% Tween: three washes, 7 min each. Finally, the chromosomes were counterstained with DAPI as described above.

## Microscopic analyses and image processing

At least 30 metaphase spreads per individual were analyzed to confirm the 2n number, karyotype structure, and results of FISH experiments. Images were captured using an Olympus BX50 microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan) with CoolSNAP, and the images were processed using Image Pro Plus 4.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Chromosomes were classified as metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st) and acrocentric (a) based on Levan et al. [58].

## DNA extraction and DArT-seq analysis

Liver tissue was obtained and stored in 100% ethanol for DNA extraction (for protocol details, see [59]). Besides *H. niloticus* and *A. gigas*, DNA from other Notopteridae species, namely *Chitala blanci*, *C. ornata*, *C. lopis*, *Notopterus notopterus*, *Xenomystus nigri* and *Papyrocranus afer*, was also extracted and used for DArT-seq analysis [60]. The gDNAs were analysed under the DArT-seq technology [61] by the Diversity Arrays Technology Company (Canberra, Australia). A combination of PstI and SphI enzymes was used to construct the libraries using methods described by [62], and sequenced on the Illumina HiSeq2500 next generation sequencer. These enzymes were selected since both are 6 base cutter targeting AG and GC rich regions and thus they indirectly target gene rich regions of the genome. Two libraries were constructed for each DNA sample and the whole process of data generation was done in full technical replication (from digestion/ligation step to marker calling). Approximately 2.5



million sequences were used per sample to produce marker data. Markers were extracted using DArT PL's proprietary analytical pipeline which, in addition to allele calling and marker data metadata reporting, evaluates consistency of allele calling among the technical replicates.

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and SilicoDArTs markers were extracted from the sequences of genomic representations (libraries). SilicoDArTs, which represent presence/absence of specific restriction fragment in genomic representations were scored as "1" for the "present" allele and "0" for absence of the fragment/sequence. SNPs were scored in "two row" format—each row representing a specific allele at the SNP locus. The absence of the allele was scored '0' and '1' was reported for presence of the allele (see [S1 Table for details](#)) [62].

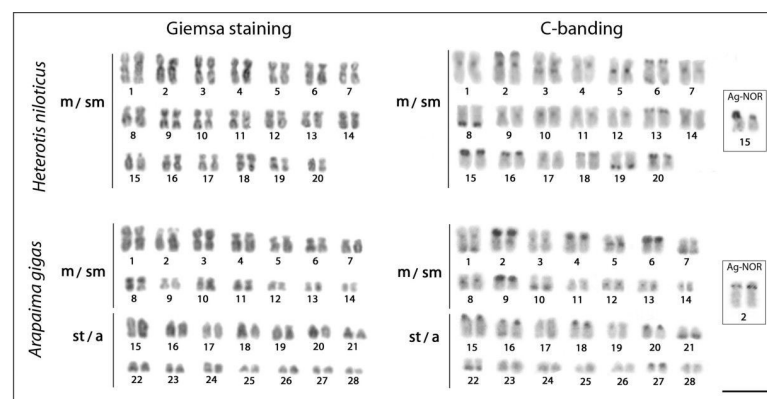
### Analysis of genetic diversity between species

From the filtered SNP DArT-seq data matrix, a pair-wise genetic similarity matrix, based on [63], was computed and utilized for the genetic diversity analyses through R packages. The principal component analysis (PCA) was performed with FactorMineR [64], while hierarchical clustering analysis with *p*-values (AU, Approximately Unbiased *p*-value and BP, Bootstrap Probability value) was performed with pvclust [65] using Euclidean distance.

## Results

### Karyotype analysis and distribution of constitutive heterochromatin

Both species displayed identical karyotypes for males and females, without cytologically detectable sex-related heteromorphisms. Individuals of *A. gigas* exhibited  $2n = 56$ , with karyotype composed of 28 metacentric (m) to submetacentric (sm) and 28 subtelocentric (st) to acrocentric (a) chromosomes, and with a number of chromosomal arms per cell (FN; Fundamental number) being equal to 84. On the other hand, karyotype of *H. niloticus* consisted of  $2n = 40$ , with all chromosomes possessing bi-armed (i.e. metacentric or submetacentric) morphology and FN = 80. In both species, the C-positive bands of constitutive heterochromatin were found to reside preferentially in the centromeric/pericentromeric regions of all chromosomes, with some additional conspicuous telomeric blocks being present in a subset of chromosome pairs. Specifically, conspicuous terminal and interstitial segments of constitutive heterochromatin were observed in pairs 2, 3, 6, 8, 13, 15, 16, 18, 19, and 20 in *H. niloticus* and pairs 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 21, and 22 in *A. gigas*, with the bands on pairs 15 (*H. niloticus*) and 2 (*A. gigas*) corresponding to locations of NORs as revealed by silver-nitrate staining (see [Fig 2](#)).



**Fig 2. Karyotypes of *Arapaima gigas* and *Heterotis niloticus* arranged from Giemsa-stained and C-banded chromosomes.** The Ag-NOR pairs are highlighted in boxes. Bar = 5  $\mu$ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214225.g002>

### Patterns of 5S/18S rDNA and CMA<sub>3</sub>-positive sites distribution

FISH with the 5S rDNA probe shows bright signals in the pericentromeric region of chromosome pair 6 in *H. niloticus*, whereas in *A. gigas*, these signals were placed interstitially on the *q* arms of chromosome pair 1. The 18S rDNA probe identified a single locus with a very intense signal located in the distal *p* arm of pair 15 in *H. niloticus* and in the proximal *p* arm of pair 2 in *A. gigas*, corresponding to the Ag-NOR sites in both species (Fig 3).

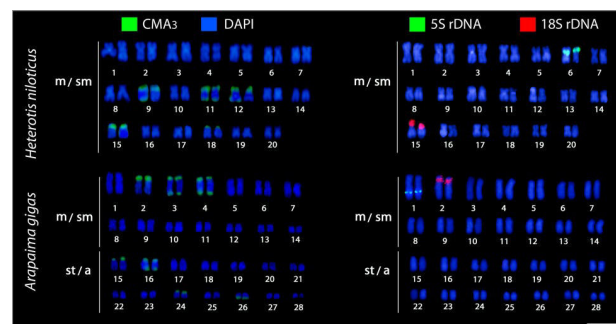
Fluorescence staining detected multiple CMA<sub>3</sub>-positive bands in the genomes of both species, particularly nearby the telomeric region of five chromosome pairs in *H. niloticus* (chromosomes 9, 11, 12, 15, and 18) and of seven chromosome pairs in *A. gigas* (chromosomes 2, 3, 4, 15, 16, 24, and 26), in addition to CMA<sub>3</sub>-positive Ag-NOR sites (Fig 3).

### Patterns of cross-specific CGH

The CGH experiments provided information about major differences between analyzed genomes regarding amount and distribution of the shared vs. genome-specific repetitive DNA fraction. As expected, both genomes shared only minor portion of repetitive DNA sequences, specifically only a segment related to CMA<sub>3</sub>-positive/NOR/18S rDNA regions (showed as yellow signals, i.e. combination of green and red). Additionally, in both experimental designs, the probe derived from the gDNA of the species whose chromosomes are subjected to analysis (i.e. hybridization back against its own chromosome complement) hybridized preferentially to heterochromatic blocks abundantly present in the terminal chromosomal regions (as evidenced by sequential C-banding analysis), despite the high amount of competitive DNA. It should be, however, noted that despite less intensely, the conspecific genomic probe hybridized also along the rest of the chromosomal regions. Our findings are in line with the general patterns observed in previous CGH-based reports (e.g. [66–69]) in the sense of biased hybridization in heterochromatic regions and point to the fact that even high amount of C0t-1 DNA is often insufficient to entirely outcompete highly repetitive (heterochromatic) regions (for related discussion, see [70]) (Figs 4 and 5).

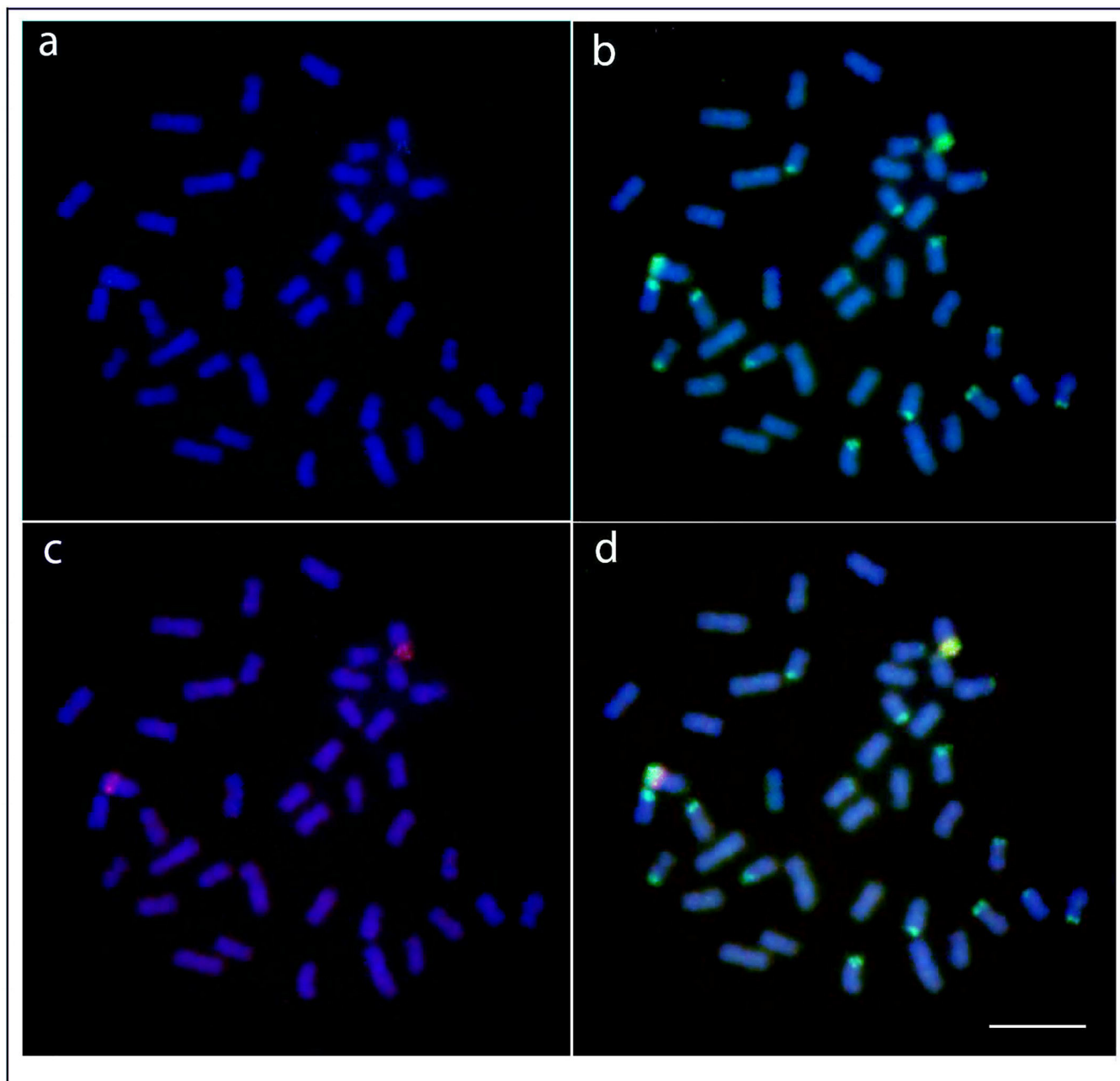
### Genetic diversity analyses using the DArT-seq data

DArT-seq genotyping output (S1 Table) consisting of an “absence/presence” (0/1) matrix for each Arapaimidae and Notopteridae species (columns) for a given allele ID (rows), in which SNP calling relies on different statistical measures. An overview of the genotyping data showed that out of 1537 SNP alleles found, 57% showed transition type mutations, 88% presented only one SNP along the sequence and 19% were found in heterozygosity (S1 Table). Principal component analyses using only the SNP alleles showed Notopteridae and Arapaimidae species



**Fig 3. Karyotypes of *Arapaima gigas* and *Heterotis niloticus* after Chromomycin A<sub>3</sub>/DAPI-staining and rDNA FISH.** Dual-colour FISH was performed using 18S (red) and 5S (green) rDNAs as probes. Bar = 5µm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214225.g003>



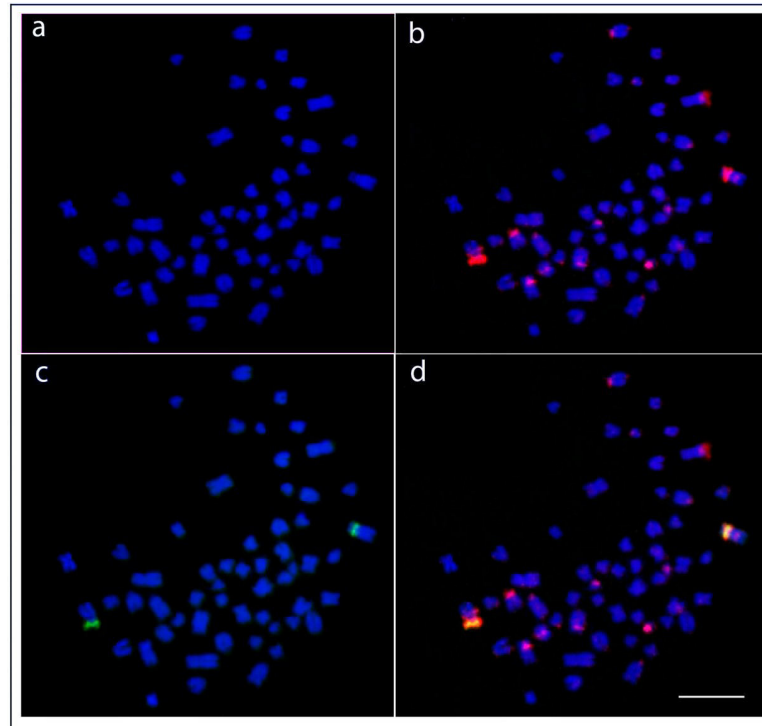
**Fig 4. Comparative genomic hybridization (CGH) on metaphase chromosomes of *Heterotis niloticus*.** (A) DAPI-stained chromosomes (B) Hybridization pattern with probe derived from gDNA of *Heterotis niloticus* (green); (C) Hybridization pattern with probe derived from with gDNA of *Arapaima gigas* (red); (D) Superposition of both gDNA probes showing the shared sequences between the species. Chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Bar = 5  $\mu$ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214225.g004>

clustered according to their geographical distribution. Partial results for Notopteridae were also discussed in Barby et al. [60] (Fig 6).

## Discussion

Osteoglossiformes represents one of the most ancestral, yet not well-studied, teleost lineages, and it is now widespread across all continents, except for Antarctica [71]. The lacking data are

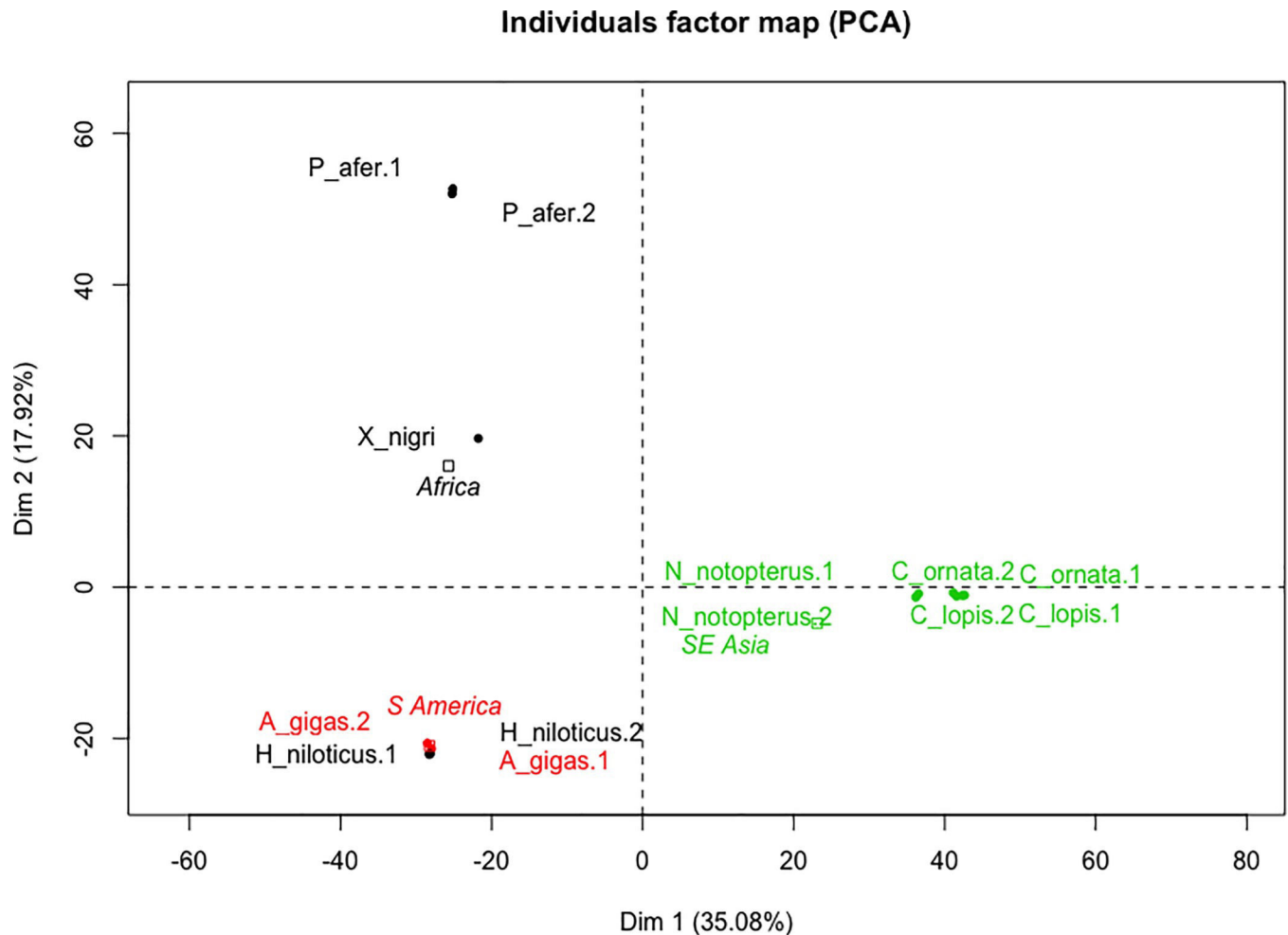


**Fig 5. Comparative genomic hybridization (CGH) on metaphase chromosomes of *Arapaima gigas*.** (A) DAPI-stained chromosomes (B) Hybridization pattern with probe derived from gDNA of *Arapaima gigas* (red); (C) Hybridization pattern with probe derived from gDNA of *Heterotis niloticus* (green); (D) Superposition of both gDNA probes showing the shared sequences between the species. Chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Bar = 5  $\mu$ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214225.g005>

probably associated with the wide geographic distribution of this group, with taxa endemic to different continents, hampering an integrative study that would allow a globalized view of its accompanying evolutionary processes. Therefore, the present study focuses on the osteoglossiform family Arapaimidae, with aims to investigate unique fish model group using advanced molecular cytogenetic tools in an attempt to better explore and clarify drivers and certain events that have shaped its evolutionary and distribution history.

Cytogenetic data are still sporadic and quite incomplete for Osteoglossiformes in general, limiting the progress in understanding of the evolutionary trends operating in this group. Despite this, the data show that these fishes have diversified chromosome numbers, ranging from 34 in *Gymnarchus niloticus* to 56 in *A. gigas* and *Osteoglossum bicirrhosum* and karyotypes dominated by acrocentric chromosomes in most osteoglossiform species (reviewed by [35]). However, some representatives of Mormyridae, Gymnarchidae, and Notopteridae families share specific karyotype features, such as reduced  $2n$  and a karyotype with bi-armed chromosomes, indicating a closer relationship among them (reviewed in [33]). On the other hand, while the majority of osteoglossiform species tend to maintain the karyotypes with acrocentric chromosomes, as stated before, the Arapaimidae and Gymnarchidae members represent exceptions to this general rule. Indeed, our data demonstrate  $2n = 56$  and a karyotype composed of 28 m/sm + 28 st/a chromosomes for *A. gigas* (FN = 84), agreeing well with some previous reports [34,35], but differing from Urushido [72]. In turn, *H. niloticus* displays  $2n = 40$  and a karyotype composed of 40 m/sm chromosomes (FN = 80) (Fig 2), also deviating from the single record previously published [73], who found the same diploid number ( $2n = 40$ ) but

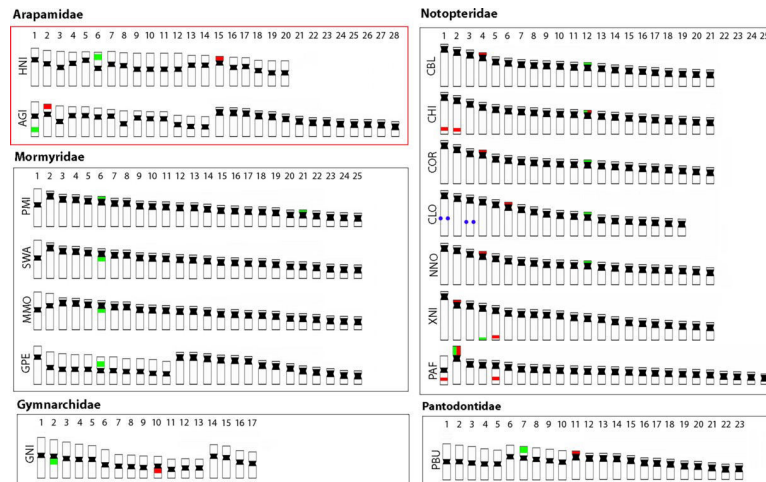


**Fig 6. Principal component analyses (PCA) of SNP data in DArT-seq alleles found in seven osteoglossiform species.** Individuals factor map using 3074 alleles (reference and alternative alleles). Osteoglossiform samples and presence/absence SNP were structured as observations (individual) and variable, respectively, as input matrix data. Notopteroideae genera (*Papyrocranus*, *Xenomystus*, *Notopterus* and *Chitala*) and Arapaimidae genera (*Heterotis* and *Arapaima*) together with their geographical distribution (Africa, Southeast Asia and South America); categorical variables are summarized in black (Africa), green (Southeast Asia) and red (South America) squares.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214225.g006>

inferred distinct karyotype composition (26m + 10sm + 4a chromosomes) for a West African population. The observed incongruences may have resulted from different morphological classification of some chromosomal pairs. Similar incongruences between karyotype studies are known also for osteoglossiform species *Pantodon buchholzi*, where the technical limitations in the former study were most likely responsible for improper karyotype characterization [33]. Unfortunately, as the locality of the *H. niloticus* specimens examined by [73] is not specified (since just “West Africa” is mentioned), we cannot exclude the possibility that these variations may also be related to some population variability.

In addition, the 18S rDNA probe identified a single locus in both species, with a very bright and hence arguably highly amplified signal in pair 15 of *H. niloticus* and in pair 2 of *A. gigas*, corresponding to the Ag-NOR sites in both species. In most of its analyzed species, osteoglossiform fishes possess only one chromosome pair bearing 18S and 5S rDNA sequences, with some exceptions, observed in *C. chitala*, *P. afer*, *X. nigri* and *Petrocephalus microphthalmus*) (for references and more detailed information about distribution of 18S and 5S rDNA sequences available to date in other osteoglossiform species, see Fig 7).



**Fig 7. Idiograms representing 2n and patterns of rDNA distribution in osteoglossiform species.** On the chromosomes, the distribution sites of 18S rDNA are highlighted in green, 5S rDNA in red, and Interstitial Telomeric Sites (ITS) in blue. HNI = *Heterotis niloticus*; AGI = *Arapaima gigas*; PMI = *Petrocephalus microphthalmus*; SWA = *Stomatorhinus walkeri*; MMO = *Marcusenius moorii*; GPE = *Gnathonemus petersii*; GNI = *Gymnarchus niloticus*; CBL = *Chitala blanci*; CCH = *Chitala chitala*; COR = *Chitala ornate*; CLO = *Chitala lopis*; NNO = *Notopterus notopterus*; XNI = *Xenomystus nigri*; PAF = *Papyrocranus afer*; and PBU = *Pantodon buchholzi*. Data are based on [57,60,74].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214225.g007>

A single site (i.e. one pair of loci) for each rDNA cluster appears to be also the general trend reported for most teleosts [75,76] and ancient non-teleost actinopterygian fishes [77,78]. The location of such sequences in similar positions of similar chromosomes may be evidence of homeologous chromosomes (but see [79]). Among arapaimids, 18S rDNA sites are associated with GC-rich heterochromatin (Fig 3), a feature also shared with other osteoglossiform species, like the ones belonging to the Notopteridae and Gymnarchidae families [57,60], supporting the view that it likely represents the ancestral pattern for actinopterygian fishes [78]. However, besides a single merged 18S rDNA/ CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> site, multiple additional CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> signals were also observed in both species, similarly to the pattern described in *P. buchholzi*, [33]. This pattern is otherwise very infrequent among teleosts (for references, see [80]).

To gain deeper insight into gross-scale sub-chromosomal dynamics on the level of composition and distribution of repetitive DNA sequences, we performed CGH experiments in interspecific comparative manner. These CGH comparisons showed overall high genomic divergence between the two species under study as might be expected due to their deep evolutionary divergence and corresponding advanced stage of repeat turnover (Figs 4 and 5). In fact, both genomic probes merged only in NOR sites which generally maintain high sequence conservatism [81]. In fact, when basically only the NOR regions are intensively labeled after cross-hybridization, it points to a large genomic divergence between both species. Such scenario has been also observed in several plants and other animal groups (e.g. [37,82]).

In summary, the genomes *A. gigas* and *H. niloticus* display remarkable chromosomal divergence, in terms of their karyotype macrostructure and repetitive DNA content and distribution. In striking contrast, the genomic diversity studies through PCA analyses demonstrated a very low genetic distance between these fishes on the level of unique/single copy regions (Fig 6). This scenario further deeply contrasts with the one found for African and Asian representatives of Old World knifefishes, family Notopteridae, where an opposite pattern was discovered, i.e., highly conserved karyotypes despite at least 80 My of isolation among the species [60]. Thus, what would have contributed to such enormous chromosomal diversity between Arapaimidae species?

An important hint may come from recently published genome of *Arapaima gigas* [83]. It is noteworthy that according to this study, only 21% of *Arapaima gigas* genome is composed of repetitive DNA, while other 33% represent coding regions. Similar proportion between repetitive DNA and coding sequences has been found also in the Asian arowana *Scleropages formosus* [84]. In the context of these genomic data and with respect to results yielded in this study, it might be imaginable that a strong selection might be operating in arapaimids to preserve sequence integrity of coding parts, which encompass substantial part of the genome. A possible outcome might be that repetitive sequences must accumulate in restricted genome areas and hence they might promote rearrangements in these specific locations due to elevated local dynamics (driven, for instance, by illegitimate recombination; e.g., [85]). This way, repetitive sequences may provide the fuel for karyotype variability, while coding regions retain high degree of sequence conservativity. The presence of elevated number of CMA+/GC-rich regions in both studied arapaimids may partly support our hypothesis as GC-rich regions, especially in conjunction with their terminal location on chromosomes, are more prone to high recombination rates (e.g., [86–88]). At the same time (or as an alternative explanation), higher flexibility of chromatin functional arrangement in interphase nuclei would be expected to be required to facilitate elevated plasticity for genome reshuffling and this flexibility might be, on the other hand, missing in Notopteridae fishes. This matter warrants further investigation especially in the context of current models of functional chromatin arrangement basing on topologically associating domains (TADs) [89–91].

Although separated by more than 50–80 Mya [5], *A. gigas* and *H. niloticus* still retain some similar morphological, physiological, and behavioral characteristics, such as obligatory branchial and aerial respiration, preference for low-oxygenated lentic environments, low migratory activities, and sophisticated parental care. Consequently, both species are sedentary, living in flocks with small population sizes and having a high degree of kinship and endogamy [10,92]. Molecular studies on individuals from the Amazon basin using microsatellite markers and mitochondrial genes have shown that different populations of *A. gigas* present some small degree of isolation by distance and fragmentation only in populations separated by distances greater than 1000 km [92,93]. In fact, higher karyotype variability is usually present in fish groups with low mobility and establishment of small isolated populations, in contrast with fish species characterized by higher mobility and population density [94–96]. In this context, chromosomal rearrangements spread and settle more easily in small populations, where the probability of generating homozygous rearranged forms, free of meiotic segregation problems, is greater than in large populations [97]. It is, however, worth mentioning that while the older theoretical models explained chromosomal speciation only in conjunction with geographic isolation in allopatric populations [98], current views enable to theorize about this issue to happen also in sympatry, as the reproductive barriers may still evolve in the persisting presence of a gene flow [99]. This may happen if the strong selection acts to maintain linkage disequilibrium between locally adapted alleles via recombination arrest (through structural rearrangements and/or recombination modifiers), leading to gradual accumulation of sequence divergence only in a restricted genomic region [100]. In fact, the diversity of chromosomal types in *Arapaima* and *Heterotis* karyotypes is a result of several chromosomal rearrangements accumulated over millions of years, in addition to the accumulation of different classes of repetitive DNAs in their genomes. A similar scenario was already observed in another osteoglossiform species, the Asian Arowana *Scleropage formosus*, where repetitive DNAs are thought to be the major contributors to the chromosomal diversity observed in this species [84].

Our data support the view that highly rearranged karyotypes tend to occur in South American osteoglossiforms. *A. gigas* ( $2n = 56$ ) and the South American arowana—*O. bicirrhosum*

( $2n = 56$ )—possess the highest  $2n$  found in the order. This was also documented and verified in cichlid fishes, in which representatives from the Neotropical region display  $2n = 48$  chromosomes, with a greater karyotype diversity in comparison to the African ones [101,102]. Several fossil taxa were assigned to the Arapaimidae and/or closely related lineages (Fig 1), and, although their evolutionary interrelationships are not well established [9,24,103,104], we cannot exclude that the intermediate  $2n$  numbers have occurred between them and the extant *A. gigas* and *H. niloticus*.

## Conclusions

Taken together, the genomes of *A. gigas* and *H. niloticus* displayed remarkable chromosomal divergence and repetitive DNA turn over. Our results demonstrated some general trends shared by most osteoglossiform species analyzed so far, like the presence of only one chromosome pair bearing 18S and 5S rDNA sites; karyotypes dominated by acrocentric chromosomes; and rDNA sites which are associated with GC-rich heterochromatin, supporting the view that it likely represents the ancestral state for teleost fishes. On the other hand, genomic diversity studied through PCA analyses demonstrated a very low genetic distance between these fishes despite separate evolutionary histories spanning approximately 50–80 My [5] and also the marked karyotype variability.

## Supporting information

**S1 Appendix. Detailed protocol for chromosomal obtainment in Arapaimidae fishes.** (DOCX)

**S1 Table. List of all SNP data generated by DArTseq.** FreqHomRef represents frequency of homozygotes for reference allele (more common major allele), FreqHomSnp represents frequency of homozygotes for SNP allele (less common minor allele), and FreqHets represents frequency of heterozygotes (CSV)

## Acknowledgments

The authors would like to thank the great effort of all collaborators from 5 different continents that added efforts to analyze the data. This belongs to a series of cytogenetic and cytogenomic studies on osteoglossiforms, aiming to comprehensively examine the chromosomal evolution in this phylogenetically important fish order.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Ezequiel Aguiar de Oliveira, Luiz Antonio Carlos Bertollo, Petr Rab, Tariq Ezaz, Alongklod Tanomtong, Marcelo de Bello Cioffi.

**Data curation:** Ezequiel Aguiar de Oliveira, Luiz Antonio Carlos Bertollo, Petr Rab, Tariq Ezaz, Cassia Fernanda Yano, Terumi Hatanaka, Oladele Ilesanmi Jegede, Alongklod Tanomtong, Thomas Liehr, Eliana Feldberg, Patrik Ferreira Viana, Marcelo de Bello Cioffi.

**Formal analysis:** Ezequiel Aguiar de Oliveira, Luiz Antonio Carlos Bertollo, Petr Rab, Tariq Ezaz, Cassia Fernanda Yano, Alongklod Tanomtong, Thomas Liehr, Sandra Regina Maruyama, Eliana Feldberg, Patrik Ferreira Viana, Marcelo de Bello Cioffi.

**Funding acquisition:** Petr Rab, Sandra Regina Maruyama, Marcelo de Bello Cioffi.



**Investigation:** Ezequiel Aguiar de Oliveira, Luiz Antonio Carlos Bertollo, Petr Rab, Tariq Ezaz, Cassia Fernanda Yano, Terumi Hatanaka, Oladele Ilesanmi Jegede, Alongklod Tanomtong, Alexandr Sember, Sandra Regina Maruyama, Eliana Feldberg, Patrik Ferreira Viana, Marcelo de Bello Cioffi.

**Methodology:** Ezequiel Aguiar de Oliveira, Cassia Fernanda Yano, Terumi Hatanaka, Oladele Ilesanmi Jegede, Alongklod Tanomtong, Alexandr Sember, Sandra Regina Maruyama, Eliana Feldberg, Patrik Ferreira Viana, Marcelo de Bello Cioffi.

**Project administration:** Luiz Antonio Carlos Bertollo, Petr Rab, Thomas Liehr, Marcelo de Bello Cioffi.

**Software:** Ezequiel Aguiar de Oliveira, Tariq Ezaz, Cassia Fernanda Yano, Terumi Hatanaka, Alexandr Sember, Sandra Regina Maruyama.

**Supervision:** Luiz Antonio Carlos Bertollo, Petr Rab, Tariq Ezaz, Marcelo de Bello Cioffi.

**Validation:** Ezequiel Aguiar de Oliveira, Luiz Antonio Carlos Bertollo, Petr Rab, Tariq Ezaz, Cassia Fernanda Yano, Terumi Hatanaka, Oladele Ilesanmi Jegede, Alongklod Tanomtong, Sandra Regina Maruyama, Eliana Feldberg, Patrik Ferreira Viana, Marcelo de Bello Cioffi.

**Visualization:** Ezequiel Aguiar de Oliveira, Luiz Antonio Carlos Bertollo, Petr Rab, Tariq Ezaz, Cassia Fernanda Yano, Terumi Hatanaka, Oladele Ilesanmi Jegede, Alongklod Tanomtong, Sandra Regina Maruyama, Eliana Feldberg, Patrik Ferreira Viana, Marcelo de Bello Cioffi.

**Writing – original draft:** Ezequiel Aguiar de Oliveira, Luiz Antonio Carlos Bertollo, Petr Rab, Tariq Ezaz, Cassia Fernanda Yano, Terumi Hatanaka, Oladele Ilesanmi Jegede, Alongklod Tanomtong, Sandra Regina Maruyama, Eliana Feldberg, Patrik Ferreira Viana, Marcelo de Bello Cioffi.

**Writing – review & editing:** Luiz Antonio Carlos Bertollo, Petr Rab, Tariq Ezaz, Cassia Fernanda Yano, Terumi Hatanaka, Oladele Ilesanmi Jegede, Alongklod Tanomtong, Thomas Liehr, Alexandr Sember, Sandra Regina Maruyama, Eliana Feldberg, Patrik Ferreira Viana, Marcelo de Bello Cioffi.

## References

1. Lundberg JG. African–South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. In: Goldblatt P, editor. *Biological relationships between Africa and South America*. USA, Yale University Press; 1993. pp. 156–198.
2. Bănărescu P. *Zoogeography of fresh waters*. Vol. 3, Distribution and dispersal of freshwater animals in Africa, Pacific areas and South America. Wiesbaden, Germany: AULA-Vlg; 1995.
3. Kumazawa Y, Nishida M. Molecular phylogeny of osteoglossoids: A new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. *Mol Biol Evol*. 2000; 17: 1869–1878. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026288> PMID: 11110903
4. Wilson MVH, Murray AM. Osteoglossomorpha: phylogeny, biogeography, and fossil record and the significance of key African and Chinese fossil taxa. *Geol Soc Spec Publ*. 2008; 295: 185–219.
5. Lavoué S. Was Gondwanan breakup the cause of the intercontinental distribution of Osteoglossiformes? A time-calibrated phylogenetic test combining molecular, morphological, and paleontological evidence. *Mol Phylogenet Evol*. 2016; 99: 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.008> PMID: 26979263
6. Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons; 2016.
7. Betancur-R R, Wiley EO, Arratia G, Acero A, Bailly N, Miya M, et al. Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evol Biol*. 2017; 17: 162. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0958-3> PMID: 28683774

8. Mirande JM. Combined phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) and the use of morphological characters in large-scale analyses. *Cladistics*. 2017; 33: 333–350.
9. Li G-Q, Wilson MVH. Phylogeny of osteoglossomorpha. *Interrelationships of fishes*. Elsevier; 1996. pp. 163–174.
10. Adite A, Winemiller KO, Fiogbe ED. Ontogenetic, seasonal, and spatial variation in the diet of *Heterotis niloticus* (Osteoglossiformes: Osteoglossidae) in the Sô River and Lake Hlan, Benin, West Africa. *Environ Biol Fishes*. 2005; 73: 367–378.
11. Hurtado LA, Carrera E, Adite A, Winemiller KO. Genetic differentiation of a primitive teleost, the African bonytongue *Heterotis niloticus*, among river basins and within a floodplain river system in Benin, West Africa. *J Fish Biol*. 2013; 83: 682–690. <https://doi.org/10.1111/jfb.12198> PMID: 23991884
12. Mustapha MK. *Heterotis niloticus* (Cuvier, 1829) a threatened fish species in Oyun reservoir, Offa, Nigeria; the need for its conservation. *Asian J Exp Biol Sci*. 2010; 1: 1–7.
13. Günther A. XV.—New fishes from the Gaboon and Gold Coast. *Ann Mag Nat Hist*. 1867; 20: 110–117.
14. Stewart DJ. A New Species of *Arapaima* (Osteoglossomorpha: Osteoglossidae) from the Solimões River, Amazonas State, Brazil. *Copeia*. 2013; 2013: 470–476.
15. Stewart DJ. Re-description of *Arapaima agassizii* (Valenciennes), a Rare Fish from Brazil (Osteoglossomorpha: Osteoglossidae). *Copeia*. 2013; 2013: 38–51.
16. Reis RE, Albert JS, Di Dario F, Mincarone MM, Petry P, Rocha LA. Fish biodiversity and conservation in South America. *J Fish Biol*. 2016; 89:12–47 <https://doi.org/10.1111/jfb.13016> PMID: 27312713
17. Castello L. Nesting habitat of *Arapaima gigas* (Schinz) in Amazonian floodplains. *J Fish Biol*. 2008; 72: 1520–1528.
18. McConnell R, Lowe-McConnell RH. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press; 1987.
19. Queiroz HL. Natural history and conservation of pirarucu, 'Arapaima gigas', at the Amazonian Várzea: red giants in muddy waters. PhD dissertation. University of St Andrews. 2000. Available from: <https://research-repository.st-andrews.ac.uk/handle/10023/2818>
20. Monteiro LBB, Soares MDC, Catanho MTJ, Honczaryk A. Aspectos reprodutivos e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822), em condições de cativeiro. *Acta Amaz*. 2010; 40: 435–449.
21. Gurdak DJ, Stewart DJ, Castello L, Arantes CC. Diversity in reproductive traits of arapaima (*Arapaima* spp., Müller, 1843) in Amazonian várzea floodplains: conservation implications. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst*. 2019; 1–13.
22. Santos RS. *Laeliichthys ancestralis*, novo gênero e espécie de Osteoglossiformes do Aptiano da Formação Areado, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Coletânea Trab Paleontológicos*. 1985; 27: 161–167.
23. Lundberg JG, Chernoff B. A Miocene fossil of the amazonian fish *Arapaima* (Teleostei, Arapaimidae) from the Magdalena River Region of Colombia-Biogeographic and Evolutionary Implications. *Biotropica*. 1992; 2–14.
24. Gayet M, Meunier FJ. Maastrichtian to early late Paleocene freshwater Osteichthyes of Bolivia: additions and comments. *Phylogeny Classif Neotrop Fishes*. 1998; 85–110.
25. Taverne L. Les ostéoglossomorphes marins de l'Éocène du Monte Bolca (Italie): *Monopterus Volta* 1796, *Thrissopterus Heckel*, 1856 et *Foreyichthys Taverne*, 1979. *Considérations sur la phylogénie des téléostéens ostéoglossomorphes*. *Stud e Ric sui Giacimenti Terziari di Bolca*. 1998; 7: 67–158.
26. Newbrey MG, Bozek MA. A new species of *Joffrichthys* (Teleostei: Osteossidae) from the Sentinel Butte Formation, (Paleocene) of North Dakota, USA. *J Vertebr Paleontol*. 2000; 20: 12–20.
27. Newbrey MG, Bozek MA. Age, growth, and mortality of *Joffrichthys triangulpterus* (Teleostei: Osteoglossidae) from the Paleocene Sentinel Butte Formation, North Dakota, U.S.A. *J Vertebr Paleontol*. 2003; 23: 494–500.
28. Pindell JL, Cande SC, Pitman WC III, Rowley DB, Dewey JF, LaBrecque J, et al. A plate-kinematic framework for models of Caribbean evolution. *Tectonophysics*. 1988; 155: 121–138.
29. Rabinowitz PD, LaBrecque J. The Mesozoic South Atlantic Ocean and evolution of its continental margins. *J Geophys Res*. 1979; 84: 5973.
30. Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard H. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science*. 2001; 294: 109–115. <https://doi.org/10.1126/science.1065042> PMID: 11588252
31. Biscotti MA, Olmo E, Heslop-Harrison JSP. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res*. 2015; 23: 415–20. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9499-z> PMID: 26514350

32. Cioffi MB, Bertollo LAC. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish In: Garrido R, editor. Repetitive DNAs genome dynamics. Basel: Karger; 2012. pp. 197–221. <https://doi.org/10.1159/000337950>
33. Ráb P, Yano CF, Lavoué S, Jegede OI, Bertollo LAC, Ezaz T, et al. Karyotype and mapping of repetitive DNAs in the African butterfly fish *Pantodon buchholzi*, the sole species of the family Pantodontidae. *Cytogenet Genome Res.* 2016; 149: 312–320. <https://doi.org/10.1159/000450534> PMID: [27710958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27710958/)
34. Marques DK, Venere PC, Galetti Junior PM. Chromosomal characterization of the bonytongue *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes: Arapaimidae). *Neotrop Ichthyol.* 2006; 4: 215–218.
35. Da Rosa R, Rubert M, Caetano-Filho M, Giuliano-Caetano L. Conserved cytogenetic features in the Amazonian Arapaima, *Arapaima gigas* (Schinz 1822) from Jamari River, Rondonia-Brazil. *Open Biol J.* 2009; 2: 91–94.
36. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992; 258: 818–821. PMID: [1359641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1359641/)
37. Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Chase MW, Clarkson JJ, Grandbastien MA, et al. Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years. *New Phytol.* 2007; 175: 756–763. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02121.x> PMID: [17688590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17688590/)
38. Mahelka V, Kopecný D, Paštová L. On the genome constitution and evolution of intermediate wheat-grass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae). *BMC Evol Biol.* 2011; 11: 127. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-127> PMID: [21592357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21592357/)
39. Symonová R, Sember A, Majtánová Z, Ráb P. Characterization of fish genomes by GISH and CGH. *Fish Cytogenet Tech Ray-Fin Fishes Chondrichthyans* CCR Press Boca Rat. 2015; 118–131.
40. Kato A, Vega JM, Han F, Lamb JC, Birchler JA. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Curr Opin Plant Biol.* 2005; 8: 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.01.014> PMID: [15752994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15752994/)
41. Chester M, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE. Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). *Genes.* 2010; 1: 166–192. <https://doi.org/10.3390/genes1020166> PMID: [24710040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24710040/)
42. Sember A, Bertollo LAC, Ráb P, Yano CF, Hatanaka T, de Oliveira EA, et al. Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Front Genet.* 2018; 9: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00001>
43. Cavallini MM, Bertollo LAC. Indução de mitoses em *Hoplias cf. malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). *Simposio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*. Maringá, Universidade Estadual de Maringá.; 1988.
44. Bertollo LAC, Cioffi MB, Moreira-Filho O. Direct chromosome preparation from freshwater teleost fishes. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF, editors. *Fish cytogenetic techniques (Chondrichthyans and Teleosts)*. CRC Press: Enfield USA; 2015. pp.21–26.
45. Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 1980; 36: 1014–1015. PMID: [6160049](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6160049/)
46. Schmid M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma.* 1980; 77: 83–103. PMID: [7371452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7371452/)
47. Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research.* 1972. 75: 304–306. PMID: [4117921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4117921/)
48. Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PM. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica.* 2006; 127: 133–141. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-2674-y> PMID: [16850219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16850219/)
49. Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC. Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenet Genome Res.* 2009; 125: 132–141. <https://doi.org/10.1159/000227838> PMID: [19729917](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19729917/)
50. Pinkel D, Straume T, Gray J. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83: 2934–2938. PMID: [3458254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3458254/)
51. Zwick MS, Hanson RE, Islam-Faridi MN, Stelly DM, Wing RA, Price HJ, et al. A rapid procedure for the isolation of C 0 t-1 DNA from plants. *Genome.* 1997; 40: 138–142. PMID: [18464813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18464813/)
52. Yano CF, Bertollo LAC, Ezaz T, Trifonov V, Sember A, Liehr T, et al. Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triporthus* (Characiformes, Triporthidae). *Heredity.* 2017; 118: 276. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.83> PMID: [28000659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28000659/)
53. de Freitas NL, Al-Rikabi ABH, Bertollo LAC, Ezaz T, Yano CF, de Oliveira EA, et al. Early stages of XY sex chromosomes differentiation in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae)

- revealed by dna repeats accumulation. *Curr Genomics*. 2018; 19: 216–226. <https://doi.org/10.2174/1389202918666170711160528> PMID: 29606909
54. de Moraes RLR, Bertollo LAC, Marinho MMF, Yano CF, Hatanaka T, Barby FF, et al. Evolutionary relationships and cytotaxonomy considerations in the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). *Zebrafish*. 2017; 14: 536–546. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1465> PMID: 28767325
  55. de Oliveira EA, Sember A, Bertollo LAC, Yano CF, Ezaz T, Moreira-Filho O, et al. Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY1Y2 system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). *Chromosoma*. 2018; 127: 115–128. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0648-3> PMID: 29124392
  56. Carvalho PC, de Oliveira EA, Bertollo LAC, Yano CF, Oliveira C, Decru E, et al. First chromosomal analysis in Hepsetidae (Actinopterygii, Characiformes): Insights into relationship between African and Neotropical fish groups. *Front Genet*. 2017; 8: 203. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00203> PMID: 29312435
  57. Hatanaka T, de Oliveira EA, Ráb P, Yano CF, Bertollo LAC, Ezaz T, et al. First chromosomal analysis in *Gymnarchus niloticus* (Gymnarchidae: Osteoglossiformes): insights into the karyotype evolution of this ancient fish order. *Biol J Linn Soc*. 2018; 125: 83–92.
  58. Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 1964; 52.
  59. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
  60. Barby F, Rab P, Lavoue S, Ezaz T, Bertollo LAC, Kilian A, et al. From chromosomes to genome: insights into the evolutionary relationships and biogeography of Old World knifefishes (Notopteridae; Osteoglossiformes). *Genes*. 2018; 9: 306.
  61. Kilian A, Wenzl P, Huttner E, Carling J, Xia L, Blois H, et al. Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology on open platforms. In *Data production and analysis in population genomics*. Humana Press, Totowa, NJ; 2012. pp. 67–89.
  62. Lambert MR, Skelly DK, Ezaz T. Sex-linked markers in the North American green frog (*Rana clamitans*) developed using DArTseq provide early insight into sex chromosome evolution. *BMC Genomics*. 2016; 17: 844. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3209-x> PMID: 27793086
  63. Dice LR. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 1945; 26: 297–302.
  64. Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J Stat Softw*. 2008; 25: 1–18.
  65. Suzuki R, Shimodaira H. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*. 2006; 22: 1540–1542. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl117> PMID: 16595560
  66. Traut W, Winking H. Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: zebrafish, platyfish and guppy. *Chromosom Res*. 2001; 9: 659–672.
  67. Targino Valente G, Henrique Schneider C, Claudia Gross M, Feldberg E, Martins C. Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. *Chromosom Res*. 2009; 17: 791–799.
  68. Koubová M, Pokorná MJ, Rovatsos M, Farkačová K, Altmanová M, Kratochvíl L. Sex determination in Madagascar geckos of the genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae): are differentiated sex chromosomes indeed so evolutionary stable? *Chromosom Res*. 2014; 22: 441–452.
  69. Altmanová M, Rovatsos M, Kratochvíl L, Johnson Pokorná M. Minute Y chromosomes and karyotype evolution in Madagascan iguanas (Squamata: Iguania: Opluridae). *Biol J Linn Soc*. 2016; 118: 618–633.
  70. Trifonov VA, Vorobieva NN, Rens W. FISH with and without COT1 DNA. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)—Application Guide*. Springer; 2009. pp. 99–109.
  71. Hilton EJ, Lavoué S. A review of the systematic biology of fossil and living bony-tongue fishes, Osteoglossomorpha (Actinopterygii: Teleostei). *Neotrop Ichthyol*. 2018; 16: 1–35.
  72. Urushido T. Karyotype of three species of fishes in the order Osteoglossiformes. *Chromosom Inform Serv*. 1975; 18: 20–22.
  73. Hirata J, Urushido T. Karyotypes and DNA content in the Osteoglossiformes. *Sci Rep Res Inst Evol Biol*. 2000; 9: 83–90.
  74. Ozouf-Costaz C, Coutanceau J-P, BONILLO C, Belkadi L, Fermon Y, Agnès J-F, et al. First insights into karyotype evolution within the family Mormyridae. *Cybiuim*. 2015; 39: 227–236.

75. Gornung E. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: a review of research. *Cytogenet Genome Res.* 2013; 141: 90–102. <https://doi.org/10.1159/000354832> PMID: [24080951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24080951/)
76. Sochorová J, Garcia S, Gálvez F, Symonová R, Kovařík A. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma.* 2017; 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0573-x>
77. Majtánová Z, Symonová R, Arias-Rodriguez L, Sallan L, Ráb P. “Holostei versus Halecostomi” problem: insight from cytogenetics of ancient Nonteleost Actinopterygian fish, bowfin *Amia calva*. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol.* 2017; 328: 620–628.
78. Symonová R, Majtánová Z, Arias-Rodriguez L, Mořkovský L, Kořínková T, Cavin L, et al. Genome Compositional Organization in Gars Shows More Similarities to Mammals than to Other Ray-Finned Fish. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol.* 2017; 328: 607–619.
79. Milhomem SSR, Scacchetti PC, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA, Pansonato-Alves JC, O’Brien PCM, et al. Are NORs always located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). *PLoS One.* 2013; 8: e55608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055608> PMID: [23405178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23405178/)
80. Sember A, Bohlen J, Šlechtová V, Altmanová M, Pelikánová Š, Ráb P. Dynamics of tandemly repeated DNA sequences during evolution of diploid and tetraploid botiid loaches (Teleostei: Cobitidae: Botiidae). *PLoS One.* 2018; 13: 1–27.
81. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol.* 1991; 66: 411–453. PMID: [1784710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1784710/)
82. Symonová R, Vrbová I, Lamatsch D, Paar J, Matzke-Karasz R, Schmit O, et al. Karyotype variability and inter-population genomic differences in freshwater ostracods (Crustacea) showing geographical parthenogenesis. *Genes.* 2018; 9: 150.
83. Vialle RA, de Souza JES, de Paiva Lopes K, Teixeira DG, de Azevedo Alves Sobrinho P, Ribeiro-dos-Santos AM, et al. Whole genome sequencing of the pirarucu (*Arapaima gigas*) supports independent emergence of major teleost clades. *Genome Biol Evol.* 2018; 10: 2366–2379. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy130> PMID: [29982381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29982381/)
84. Bian C, Hu Y, Ravi V, Kuznetsova IS, Shen X, Mu X, et al. The Asian arowana (*Scleropages formosus*) genome provides new insights into the evolution of an early lineage of teleosts. *Sci Rep.* 2016; 6: 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-016-0001-8>
85. Delprat A, Negre B, Puig M, Ruiz A. The transposon *Galleo* generates natural chromosomal inversions in *Drosophila* by ectopic recombination. *PLoS One.* 2009; 4.
86. Bailey JA, Baertsch R, Kent WJ, Haussler D, Eichler EE. Hotspots of mammalian chromosomal evolution. *Genome Biol.* 2004; 5: R23. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-4-r23> PMID: [15059256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15059256/)
87. Axelsson E, Webster MT, Smith NGC, Burt DW, Ellegren H. Comparison of the chicken and turkey genomes reveals a higher rate of nucleotide divergence on microchromosomes than macrochromosomes. *Genome Res.* 2005; 15: 120–125. <https://doi.org/10.1101/gr.3021305> PMID: [15590944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15590944/)
88. Webber C, Ponting CP. Hotspots of mutation and breakage in dog and human chromosomes. *Genome Res.* 2005; 15: 1787–1797. <https://doi.org/10.1101/gr.3896805> PMID: [16339377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16339377/)
89. Cavalli G, Misteli T. Functional implications of genome topology. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; 20: 290–299. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2474> PMID: [23463314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23463314/)
90. Fraser J, Williamson I, Bickmore WA, Dostie J. An overview of genome organization and how we got there: from FISH to Hi-C. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015; 79: 347–372. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-15> PMID: [26223848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26223848/)
91. Razin SV, Gavrilov AA, Vassetzky YS, Ulianov SV. Topologically-associating domains: gene warehouses adapted to serve transcriptional regulation. *Transcription.* 2016; 7: 84–90. <https://doi.org/10.1080/21541264.2016.1181489> PMID: [27111547](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111547/)
92. Hrbek T, Farias IP, Crossa M, Sampaio I, Porto JIR, Meyer A. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: Implications for its conservation. *Anim Conserv.* 2005; 8: 297–308.
93. Araripe J, Rêgo PS do, Queiroz H, Sampaio I, Schneider H. Dispersal capacity and genetic structure of *Arapaima gigas* on different geographic scales using microsatellite markers. *PLoS One.* 2013; 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054470> PMID: [23372730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23372730/)
94. Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti PM. Cytogenetics and taxonomy: consideration based on chromosome studies of freshwater fish. *J Fish Biol.* 1986; 28.
95. de Oliveira EA, Bertollo LAC, Yano CF, Liehr T, Cioffi M de B. Comparative cytogenetics in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae) highlights contrasting karyotype evolution among congeneric species. *Mol Cytogenet.* 2015; 8: 56. <https://doi.org/10.1186/s13039-015-0161-4> PMID: [26225139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26225139/)

96. Oliveira C, Toledo LFA, Foresti F, Toledo F SA. Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*. 1988; 41: 227–236.
97. Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Updat*. 2011; 17: 476–494.
98. Bird CE, Fernandez-Silva I, Skillings DJ, Toonen RJ. Sympatric speciation in the post “modern synthesis” era of evolutionary biology. *Evol Biol*. 2012; 39: 158–180.
99. Smadja CM, Butlin RK. A framework for comparing processes of speciation in the presence of gene flow. *Mol Ecol*. 2011; 20: 5123–5140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05350.x> PMID: [22066935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22066935/)
100. Ortiz-Barrientos D, Engelstädter J, Rieseberg LH. Recombination rate evolution and the origin of species. *Trends Ecol Evol*. 2016; 31: 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.12.016> PMID: [26831635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26831635/)
101. Poletto AB, Ferreira IA, Martins C. The B chromosome of the cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbors 18 S rRNA genes. *BMC Genet*. 2010; 11:1. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-1> PMID: [20051104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20051104/)
102. Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In Val AL, Kapoor BG. *Fish Adaptation*. New Dehli: Science Publishers; 2003; pp. 285–308.
103. Hilton EJ. Comparative osteology and phylogenetic systematics of fossil and living bony-tongue fishes (Actinopterygii, Teleostei, Osteoglossomorpha). *Zool J Linn Soc*. 2003; 137: 1–100.
104. Li G-Q, Wilson MVH, Grande L. Review of *Eohiodon* (Teleostei: Osteoglossomorpha) from western North America, with a phylogenetic reassessment of Hiodontidae. *J Paleontol*. 1997; 71: 1109–1124.

**3. 1ª Página da versão publicada dos outros artigos publicados durante o doutorado**



Article

# Chromosomal Evolution and Evolutionary Relationships of *Lebiasina* Species (Characiformes, Lebiasinidae)

Francisco de Menezes Cavalcante Sassi <sup>1</sup>, Ezequiel Aguiar de Oliveira <sup>1,2</sup>, Luiz Antonio Carlos Bertollo <sup>1</sup>, Mauro Nirchio <sup>3</sup>, Terumi Hatanaka <sup>1</sup>, Manoela Maria Ferreira Marinho <sup>4</sup>, Orlando Moreira-Filho <sup>1</sup>, Rouben Aroutiounian <sup>5</sup>, Thomas Liehr <sup>6,\*</sup>, Ahmed B.H. Al-Rikabi <sup>6</sup> and Marcelo de Bello Cioffi <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Citogenética de Peixes, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil; francisco.sassi@hotmail.com (F.d.M.C.S.); ezebio@gmail.com (E.A.d.O.); bertollo@ufscar.br (L.A.C.B.); hterumi@yahoo.com.br (T.H.); omfilho@ufscar.br (O.M.-F.); mbcioffi@ufscar.br (M.d.B.C.)

<sup>2</sup> Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso—SEDUC-MT, Cuiabá, MT 78049-909, Brazil

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Machala, Machala 070151, Ecuador; mauro.nirchio@gmail.com

<sup>4</sup> Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), São Paulo, SP 04263-000, Brazil; manumfm@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Department of Genetics and Cytology, Yerevan State University, Yerevan 0063, Armenia; rouben\_a@hotmail.com

<sup>6</sup> Institute of Human Genetics, University Hospital Jena, Jena 07747, Germany; Ahmed.Al-Rikabi@med.uni-jena.de

\* Correspondence: Thomas.Liehr@med.uni-jena.de

Received: 15 May 2019; Accepted: date; Published: 16 June 2019

**Abstract:** We present the first cytogenetic data for *Lebiasina bimaculata* and *L. melanoguttata* with the aim of (1) investigating evolutionary events within *Lebiasina* and their relationships with other Lebiasinidae genera and (2) checking the evolutionary relationships between Lebiasinidae and Ctenoluciidae. Both species have a diploid number  $2n = 36$  with similar karyotypes and microsatellite distribution patterns but present contrasting C-positive heterochromatin and CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> banding patterns. The remarkable interstitial series of C-positive heterochromatin occurring in *L. melanoguttata* is absent in *L. bimaculata*. Accordingly, *L. bimaculata* shows the ribosomal DNA sites as the only GC-rich (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>) regions, while *L. melanoguttata* shows evidence of a clear intercalated CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> banding pattern. In addition, the multiple 5S and 18S rDNA sites in *L. melanoguttata* contrast with single sites present in *L. bimaculata*. Comparative genomic hybridization (CGH) experiments also revealed a high level of genomic differentiation between both species. A polymorphic state of a conspicuous C-positive, CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, and (CGG)<sub>n</sub> band was found only to occur in *L. bimaculata* females, and its possible relationship with a nascent sex chromosome system is discussed. Whole chromosome painting (WCP) and CGH experiments indicate that the *Lebiasina* species examined and *Boulengerella maculata* share similar chromosomal sequences, thus supporting the relatedness between them and the evolutionary relationships between the Lebiasinidae and Ctenoluciidae families.

**Keywords:** fish; karyotype evolution; whole chromosome painting; comparative genomic hybridization





# Comparative Cytogenetics and Neo-Y Formation in Small-Sized Fish Species of the Genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae)

Renata Luiza Rosa de Moraes<sup>1†</sup>, Alexandr Sember<sup>2†</sup>, Luiz Antônio Carlos Bertollo<sup>1</sup>, Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>1,3</sup>, Petr Ráb<sup>2</sup>, Terumi Hatanaka<sup>1</sup>, Manoela Maria Ferreira Marinho<sup>4</sup>, Thomas Liehr<sup>5\*</sup>, Ahmed B. H. Al-Rikabi<sup>5</sup>, Eliana Feldberg<sup>6</sup>, Patrik F. Viana<sup>6</sup> and Marcelo de Bello Cioffi<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Citogenética de Peixes, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil, <sup>2</sup> Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Liběchov, Czechia, <sup>3</sup> Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso – SEDUC-MT, Cuiabá, Brazil, <sup>4</sup> Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, (MZUSP), São Paulo, Brazil, <sup>5</sup> Institute of Human Genetics, University Hospital Jena, Jena, Germany, <sup>6</sup> Laboratório de Genética Animal, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade, Manaus, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Philipp G. Maass,  
Hospital for Sick Children,  
Canada

### Reviewed by:

Ricardo Utsunomia,  
São Paulo State University,  
Brazil  
Mara Cristina De Almeida,  
Universidade Estadual  
de Ponta Grossa, Brazil

### \*Correspondence:

Thomas Liehr  
Thomas.Liehr@med.uni-jena.de

<sup>†</sup>These authors share first authorship.

### Specialty section:

This article was submitted  
to Genetic Disorders,  
a section of the journal  
Frontiers in Genetics

**Received:** 04 April 2019

**Accepted:** 27 June 2019

**Published:** 02 August 2019

### Citation:

de Moraes RLR, Sember A, Bertollo LAC, de Oliveira EA, Ráb P, Hatanaka T, Marinho MMF, Liehr T, Al-Rikabi ABH, Feldberg E, Viana PF and Cioffi MdB (2019) Comparative Cytogenetics and Neo-Y Formation in Small-Sized Fish Species of the Genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). *Front. Genet.* 10:678. doi: 10.3389/fgene.2019.00678

Although fishes have traditionally been the subject of comparative evolutionary studies, few reports have concentrated on the application of multipronged modern molecular cytogenetic techniques (such as comparative genomic hybridization = CGH and whole chromosome painting = WCP) to analyze deeper the karyotype evolution of specific groups, especially the historically neglected small-sized ones. Representatives of the family Lebiasinidae (Characiformes) are a notable example, where only a few cytogenetic investigations have been conducted thus far. Here, we aim to elucidate the evolutionary processes behind the karyotype differentiation of *Pyrrhulina* species on a finer-scale cytogenetic level. To achieve this, we applied C-banding, repetitive DNA mapping, CGH and WCP in *Pyrrhulina semifasciata* and *P. brevis*. Our results showed  $2n = 42$  in both sexes of *P. brevis*, while the difference in  $2n$  between male and female in *P. semifasciata* ( $\text{♂}41/\text{♀}42$ ) stands out due to the presence of a multiple  $X_1X_2Y$  sex chromosome system, until now undetected in this family. As a remarkable common feature, multiple 18S and 5S rDNA sites are present, with an occasional synteny or tandem-repeat amplification. Male-vs.-female CGH experiments in *P. semifasciata* highlighted the accumulation of male-enriched repetitive sequences in the pericentromeric region of the Y chromosome. Inter-specific CGH experiments evidenced a divergence between both species' genomes based on the presence of several species-specific signals, highlighting their inner genomic diversity. WCP with the *P. semifasciata*-derived Y (PSEMI-Y) probe painted not only the entire metacentric Y chromosome in males but also the  $X_1$  and  $X_2$  chromosomes in both male and female chromosomes of *P. semifasciata*. In the cross-species experiments, the PSEMI-Y probe painted four acrocentric chromosomes in both males and females of the other tested *Pyrrhulina* species. In summary, our results show that both intra- and interchromosomal rearrangements together with the dynamics of repetitive DNA significantly contributed to the karyotype divergence among *Pyrrhulina*



Article

# Deciphering the Origin and Evolution of the $X_1X_2Y$ System in Two Closely-Related *Oplegnathus* Species (*Oplegnathidae* and *Centrarchiformes*)

Dongdong Xu <sup>1,2</sup> , Alexandr Sember <sup>3</sup>, Qihui Zhu <sup>1</sup> , Ezequiel Aguiar de Oliveira <sup>4,5</sup> , Thomas Liehr <sup>6</sup>, Ahmed B. H. Al-Rikabi <sup>6</sup>, Zhizhong Xiao <sup>7</sup>, Hongbin Song <sup>1,2</sup> and Marcelo de Bello Cioffi <sup>4,6,\*</sup>

<sup>1</sup> Key Lab of Mariculture and Enhancement of Zhejiang Province, Marine Fishery Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China

<sup>2</sup> College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316100, China

<sup>3</sup> Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Czech Republic

<sup>4</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz Km. 235, C.P. 676, São Carlos SP 13565-905, Brazil

<sup>5</sup> Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso—SEDUC-MT, Cuiabá MT 78049-909, Brazil

<sup>6</sup> University Clinic Jena, Institute of Human Genetics, 07747 Jena, Germany

<sup>7</sup> Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 7 Nanhai Road, Qingdao 266071, China

\* Correspondence: mbcioffi@ufscar.br; Tel.: +55-1633066885

Received: 12 June 2019; Accepted: 13 July 2019; Published: 22 July 2019



**Abstract:** *Oplegnathus fasciatus* and *O. punctatus* (Teleostei: Centrarchiformes: Oplegnathidae), are commercially important rocky reef fishes, endemic to East Asia. Both species present an  $X_1X_2Y$  sex chromosome system. Here, we investigated the evolutionary forces behind the origin and differentiation of these sex chromosomes, with the aim to elucidate whether they had a single or convergent origin. To achieve this, conventional and molecular cytogenetic protocols, involving the mapping of repetitive DNA markers, comparative genomic hybridization (CGH), and whole chromosome painting (WCP) were applied. Both species presented similar  $2n$ , karyotype structure and hybridization patterns of repetitive DNA classes. 5S rDNA loci, besides being placed on the autosomal pair 22, resided in the terminal region of the long arms of both  $X_1$  chromosomes in females, and on the  $X_1$  and Y chromosomes in males. Furthermore, WCP experiments with a probe derived from the Y chromosome of *O. fasciatus* (OFAS-Y) entirely painted the  $X_1$  and  $X_2$  chromosomes in females and the  $X_1$ ,  $X_2$ , and Y chromosomes in males of both species. CGH failed to reveal any sign of sequence differentiation on the Y chromosome in both species, thereby suggesting the shared early stage of neo-Y chromosome differentiation. Altogether, the present findings confirmed the origin of the  $X_1X_2Y$  sex chromosomes via Y-autosome centric fusion and strongly suggested their common origin.


**Keywords:** comparative genomic hybridization; centric fusion; multiple sex chromosomes; *Oplegnathus*; whole chromosome painting

## 1. Introduction

The marine fish family Oplegnathidae (order Centrarchiformes) includes only one genus *Oplegnathus*, which is currently composed of seven extant species [1]. Two of them, *O. fasciatus* and *O. punctatus*, are commercially valuable taxa in East Asia, representing important fishery resources



## Cytogenetics and DNA barcode reveal an undescribed *Apareiodon* species (Characiformes: Parodontidae)

Emanoel Oliveira dos Santos<sup>1</sup>, Geize Aparecida Deon<sup>2</sup>, Rafael Bonfim de Almeida<sup>1</sup>, Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>3</sup>, Viviane Nogaroto<sup>2</sup>, Hugmar Pains da Silva<sup>4</sup>, Carla Simone Pavanelli<sup>5</sup>, Marta Margarete Cestari<sup>1</sup>, Luiz Antonio Carlos Bertollo<sup>3</sup>, Orlando Moreira-Filho<sup>3</sup> and Marcelo Ricardo Vicari<sup>1,2\*</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratório de Citogenética e Genética Animal, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil.

<sup>5</sup>Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil.

### Abstract

Parodontidae is a small group of fish and some species are particularly difficult to identify due to the lack of sufficiently consistent morphological traits. Cytogenetically, the species possess  $2n = 54$  chromosomes and are either sex-homomorphic or sex-heteromorphic (regarding its chromosomes). We evaluated data on color, tooth morphology, cytogenetics, and mitochondrial markers (COI) in *Apareiodon* specimens from the Aripuanã River (Amazon basin) and the results were compared to other congeneric taxa. Morphological results show an overlap of body color and tooth morphology to other known *Apareiodon*. The cytogenetics data showed that the  $2n = 54$  chromosomes, 50 m/sm + 4 st and, a ZZ/ZW sex chromosome system in *Apareiodon* sp. are common to other species of the genus. However, the number and chromosomal localization of the 45S ribosomal and pPh2004 satellite DNA sites, in addition to W chromosome localization of the pPh2004 appear to be exclusive cytogenetic features in *Apareiodon* sp. Our phylogenetic tree revealed well-supported clades and confirmed, by barcode species delimitation analysis, a new Molecular Operational Taxonomic Unit (MOTU) for *Apareiodon* sp. (Aripuanã River). As a whole, the above features support the occurrence of a new species of the *Apareiodon*, thus far unknown for the Parodontidae.

**Keywords:** Chromosomal differentiation, hidden diversity, repetitive DNA, sex chromosomes.

Received: March 03, 2018; Accepted: August 01, 2018.

### Introduction

The family Parodontidae is currently composed of three genera: *Apareiodon* Eigenmann, 1916; *Parodon* Valenciennes, 1849 and *Saccodon* Kner, 1863 (Pavanelli, 2003), with 32 valid species (Eschmeyer and Fong, 2017). Its species can be differentiated from the other Characiformes by the following combined features: an edentulous lower jaw in the anterior region and spatulate mandible, pedunculated and multicuspid premaxillary teeth with wide distal border distributed in a single series,

and by the absence of upper lip and fontanelle (Pavanelli, 2003). The genera are mainly characterized by variation in the number of undivided rays in the pectoral fins. However, the color pattern with one regular black longitudinal stripe or several vertical bands, in addition to the shape and number of the tooth cusps adjacent to the premaxillary symphyseal tooth, can also be used in the species identification (Pavanelli, 2003).

Cytogenetic analyzes in Parodontidae revealed a conserved diploid number of 54 chromosomes, most of them meta/submetacentric, with few or none subtelocentric chromosome (Moreira-Filho *et al.*, 1980; Jesus and Moreira-Filho, 2000; Rosa *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2006). Acrocentric chromosomes are an exception, only found in *A. affinis* of the lower Paraná River system (Jorge and

Send correspondence to Marcelo Ricardo Vicari. Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil. E-mail: vicarimr@uepg.br

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Emerging patterns of genome organization in Notopteridae species (Teleostei, Osteoglossiformes) as revealed by Zoo-FISH and Comparative Genomic Hybridization (CGH)

Felipe Faix Barby<sup>1</sup>, Luiz Antônio Carlos Bertollo<sup>1</sup>, Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>1</sup>, Cassia Fernanda Yano<sup>1</sup>, Terumi Hatanaka<sup>1</sup>, Petr Ráb<sup>2</sup>, Alexandr Sember<sup>2</sup>, Tariq Ezaz<sup>3</sup>, Roberto Ferreira Artoni<sup>4</sup>, Thomas Liehr<sup>4</sup>, Ahmed B. H. Al-Rikabi<sup>5</sup>, Vladimir Trifonov<sup>6</sup>, Edivaldo H. C. de Oliveira<sup>7</sup>, Wagner Franco Molina<sup>8</sup>, Oladele Ilesanmi Jegede<sup>9</sup>, Alongklod Tanomtong<sup>10</sup> & Marcelo de Bello Cioffi<sup>1</sup>

Notopteridae (Teleostei, Osteoglossiformes) represents an old fish lineage with ten currently recognized species distributed in African and Southeastern Asian rivers. Their karyotype structures and diploid numbers remained conserved over long evolutionary periods, since African and Asian lineages diverged approximately 120 Mya. However, a significant genetic diversity was already identified for these species using molecular data. Thus, why the evolutionary relationships within Notopteridae are so diverse at the genomic level but so conserved in terms of their karyotypes? In an attempt to develop a more comprehensive picture of the karyotype and genome evolution in Notopteridae, we performed comparative genomic hybridization (CGH) and cross-species (Zoo-FISH) whole chromosome painting experiments to explore chromosome-scale intergenomic divergence among seven notopterid species, collected in different African and Southeast Asian river basins. CGH demonstrated an advanced stage of sequence divergence among the species and Zoo-FISH experiments showed diffuse and limited homology on inter-generic level, showing a temporal reduction of evolutionarily conserved syntenic regions. The sharing of a conserved chromosomal region revealed by Zoo-FISH in these species provides perspectives that several other homologous syntenic regions have remained conserved among their genomes despite long temporal isolation. In summary, Notopteridae is an interesting model for tracking the chromosome evolution as it is (i) ancestral vertebrate group with Gondwanan distribution and (ii) an example of animal group exhibiting karyotype stasis. The present study brings new insights into degree of genome divergence vs. conservation at chromosomal and sub-chromosomal level in representative sampling of this group.

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz Km. 235, C.P. 676, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil. <sup>2</sup>Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, Liběchov, 277 21, Czech Republic. <sup>3</sup>Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Canberra, ACT 2617, Australia. <sup>4</sup>Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 84030-900, Brazil. <sup>5</sup>Institute of Human Genetics, University Hospital Jena, 07747, Jena, Germany. <sup>6</sup>Molecular and Cellular Biology, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. <sup>7</sup>Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Belém, Brazil. <sup>8</sup>Department of Cellular Biology and Genetics, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. <sup>9</sup>Department of Fisheries and Aquaculture, Adamawa State University, P.M.B. 25, Mubi, Adamawa State, Nigeria. <sup>10</sup>Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, KhonKaen University, Muang, KhonKaen, 40002, Thailand. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.C. (email: [mbcioffi@ufscar.br](mailto:mbcioffi@ufscar.br))

Received: 29 June 2018  
Accepted: 3 January 2019  
Published online: 04 February 2019

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Karyotype diversity and evolutionary trends in the Asian swamp eel *Monopterus albus* (Synbranchiformes, Synbranchidae): a case of chromosomal speciation?

Weerayuth Supiwong<sup>1</sup>, Krit Pinthong<sup>2</sup>, Kriengkrai Seetapan<sup>3</sup>, Pasakorn Saenjundaeng<sup>1</sup>, Luiz A. C. Bertollo<sup>4</sup>, Ezequiel A. de Oliveira<sup>4</sup>, Cassia F. Yano<sup>4</sup>, Thomas Liehr<sup>5</sup>, Sumalee Phimphan<sup>6</sup>, Alongklod Tanomtong<sup>6</sup> and Marcelo B Cioffi<sup>4,5\*</sup>

## Abstract

**Background:** Synbranchidae or swamp eels are fishes belonging to the order Synbranchiformes that occur in both freshwater and occasionally in brackish. They are worldwide distributed in tropical and subtropical rivers of four different continents. A large degree of chromosomal variation has been found in this family, mainly through the use of conventional cytogenetic investigations. Inside this group, a still almost unexplored species under the cytogenetic point of view is the Asian swamp eel *Monopterus albus*, a widely distributed species throughout Asia. Here, we tested the hypothesis of chromosomal speciation, where a case of sympatric speciation may occur as the primary consequence of chromosomal rearrangements. We performed a comparative chromosomal analysis of *M. albus* from 22 different localities in Thailand, using distinct staining methods (C-banding, Ag-NO<sub>3</sub>, and Chromomycin A<sub>3</sub>), and FISH with repetitive DNA probes (5S rDNA, 18S rDNA, *Rex1* element and microsatellite repeats).

**Results:** This approach evidenced two contrasting karyotypes (named karyomorphs A and B) that varied concerning their 2n and repetitive DNAs distribution, where chromosomal fusions and pericentric inversions were involved in such differentiation. While the karyomorph A has 2n = 24 chromosomes, the karyomorph B has only 2n = 18, both with NF = 24. In addition, karyomorph A contains only acrocentric chromosomes, while karyomorph B contains three unique metacentric pairs. These features highlight that *M. albus* has already gone through a significant genomic divergence, and may include at least two cryptic species.

**Conclusions:** This marked chromosomal differentiation, likely linked to the lifestyle of these fishes, point to the occurrence of a chromosomal speciation scenario, in which fusions and inversions had a prominent role. This highlights the biodiversity of *M. albus* and justifies its taxonomic revision, since this nominal species may constitute a species complex.

**Keywords:** Tropical freshwater fish, Reproductive isolation, Repetitive DNAs, Centric fusion, Species complex

\* Correspondence: [mbcioffi@ufscar.br](mailto:mbcioffi@ufscar.br)

<sup>4</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Kollegiengasse 10, D-07743 Jena, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



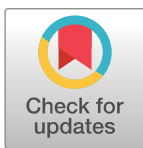
## RESEARCH ARTICLE

# Cytogenetics, genomics and biodiversity of the South American and African Arapaimidae fish family (Teleostei, Osteoglossiformes)

Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>1,2</sup>, Luiz Antonio Carlos Bertollo<sup>1</sup>, Petr Rab<sup>3</sup>, Tariq Ezaz<sup>4</sup>, Cassia Fernanda Yano<sup>1</sup>, Terumi Hatanaka<sup>1</sup>, Oladele Ilesanmi Jegede<sup>5</sup>, Alongklod Tanomtong<sup>6</sup>, Thomas Liehr<sup>7</sup>, Alexandr Sember<sup>3</sup>, Sandra Regina Maruyama<sup>1</sup>, Eliana Feldberg<sup>8</sup>, Patrik Ferreira Viana<sup>8</sup>, Marcelo de Bello Cioffi<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz, São Carlos, SP, Brazil, **2** Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso—SEDUC-MT, Cuiabá, MT, Brazil, **3** Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Czech Republic, **4** Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Canberra, Australia, **5** Department of Fisheries and Aquaculture, Adamawa State University, Adamawa State, Nigeria, **6** Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, KhonKaen University, Muang, KhonKaen, Thailand, **7** Institute of Human Genetics, University Hospital Jena, Jena, Germany, **8** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade, Laboratório de Genética Animal, Petrópolis, CEP: Manaus, AM, Brazil

\* [mbcioffi@ufscar.br](mailto:mbcioffi@ufscar.br)



## OPEN ACCESS

**Citation:** de Oliveira EA, Bertollo LAC, Rab P, Ezaz T, Yano CF, Hatanaka T, et al. (2019) Cytogenetics, genomics and biodiversity of the South American and African Arapaimidae fish family (Teleostei, Osteoglossiformes). PLoS ONE 14(3): e0214225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214225>

**Editor:** Zuogang Peng, SOUTHWEST UNIVERSITY, CHINA

**Received:** October 2, 2018

**Accepted:** March 9, 2019

**Published:** March 25, 2019

**Copyright:** © 2019 de Oliveira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.




**Funding:** MBC was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. nos 401962/2016-4 and 302449/2018-3), CNPQ: [www.cnpq.br](http://www.cnpq.br), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. No 2016/22196-2), FAPESP: [www.fapesp.br](http://www.fapesp.br), and CAPES/Alexander von Humboldt (Proc. No. 88881.136128/2017-01),

## Abstract

Osteoglossiformes represents one of the most ancestral teleost lineages, currently widespread over almost all continents, except for Antarctica. However, data involving advanced molecular cytogenetics or comparative genomics are yet largely limited for this fish group. Therefore, the present investigations focus on the osteoglossiform family Arapaimidae, studying a unique fish model group with advanced molecular cytogenetic genomic tools. The aim is to better explore and clarify certain events and factors that had impact on evolutionary history of this fish group. For that, both South American and African representatives of Arapaimidae, namely *Arapaima gigas* and *Heterotis niloticus*, were examined. Both species differed markedly by diploid chromosome numbers, with  $2n = 56$  found in *A. gigas* and  $2n = 40$  exhibited by *H. niloticus*. Conventional cytogenetics along with fluorescence *in situ* hybridization revealed some general trends shared by most osteoglossiform species analyzed thus far, such as the presence of only one chromosome pair bearing 18S and 5S rDNA sites and karyotypes dominated by acrocentric chromosomes, resembling thus the patterns of hypothetical ancestral teleost karyotype. Furthermore, the genomes of *A. gigas* and *H. niloticus* display remarkable divergence in terms of repetitive DNA content and distribution, as revealed by comparative genomic hybridization (CGH). On the other hand, genomic diversity of single copy sequences studied through principal component analyses (PCA) based on SNP alleles genotyped by the DArT seq procedure demonstrated a very low genetic distance between the South American and African Arapaimidae species; this pattern contrasts sharply with the scenario found in other osteoglossiform species. Underlying evolutionary mechanisms potentially explaining the obtained data have been suggested and discussed.

Article

# From Chromosomes to Genome: Insights into the Evolutionary Relationships and Biogeography of Old World Knifefishes (Notopteridae; Osteoglossiformes)

Felipe Faix Barby<sup>1</sup>, Petr Ráb<sup>2</sup>, Sébastien Lavoué<sup>3</sup>, Tariq Ezaz<sup>4</sup> , Luiz Antônio Carlos Bertollo<sup>1</sup>, Andrzej Kilian<sup>5</sup>, Sandra Regina Maruyama<sup>1</sup> , Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>1</sup> , Roberto Ferreira Artoni<sup>6</sup>, Mateus Henrique Santos<sup>6</sup>, Oladele Ilesanmi Jegede<sup>7</sup>, Terumi Hatanaka<sup>1</sup>, Alongklod Tanomtong<sup>8</sup>, Thomas Liehr<sup>9</sup> and Marcelo de Bello Cioffi<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz Km. 235, C.P. 676, São Carlos, SP 13565-905, Brazil; felipe\_barby@hotmail.com (F.F.B.); bertollo@ufscar.br (L.A.C.B.); srmaruyama@gmail.com (S.R.M.); ezebio@gmail.com (E.A.d.O.); hterumi@yahoo.com.br (T.H.)

<sup>2</sup> Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Czech Republic; rab@iapg.cas.cz

<sup>3</sup> Institute of Oceanography, National Taiwan University, Roosevelt Road, Taipei 10617, Taiwan; microceb@hotmail.com

<sup>4</sup> Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Canberra, ACT 2617, Australia; Tariq.Ezaz@canberra.edu.au

<sup>5</sup> Diversity Arrays Technology, University of Canberra, Bruce, Australian Capital Territory, Canberra, ACT 2617, Australia; zej@diversityarrays.com

<sup>6</sup> Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR 84030-900 Brazil; rfartoni@gmail.com (R.F.A.); mhsantos@uepg.br (M.H.S.)

<sup>7</sup> Department of Fisheries and Aquaculture, Adamawa State University, P.M.B. 25 Mubi. Adamawa State, Nigeria; jegedeio@yahoo.co.uk

<sup>8</sup> Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, KhonKaen University, Muang, KhonKaen 40002, Thailand; tanomtong@hotmail.com

<sup>9</sup> Institute of Human Genetics, University Hospital Jena, 07747 Jena, Germany; Thomas.Liehr@med.uni-jena.de

\* Correspondence: mbcioffi@ufscar.br; Tel.: +55-016-3306-6885

Received: 23 May 2018; Accepted: 15 June 2018; Published: 19 June 2018



**Abstract:** In addition to its wide geographical distribution, osteoglossiform fishes represent one of the most ancient freshwater teleost lineages; making it an important group for systematic and evolutionary studies. These fishes had a Gondwanan origin and their past distribution may have contributed to the diversity present in this group. However, cytogenetic and genomic data are still scarce, making it difficult to track evolutionary trajectories within this order. In addition, their wide distribution, with groups endemic to different continents, hinders an integrative study that allows a globalized view of its evolutionary process. Here, we performed a detailed chromosomal analysis in Notopteridae fishes, using conventional and advanced molecular cytogenetic methods. Moreover, the genetic distances of examined species were assessed by genotyping using diversity arrays technology sequencing (DARtSeq). These data provided a clear picture of the genetic diversity between African and Asian Notopteridae species, and were highly consistent with the chromosomal, geographical, and historical data, enlightening their evolutionary diversification. Here, we discuss the impact of continental drift and split of Pangea on their recent diversity, as well as the contribution to biogeographical models that explain their distribution, highlighting the role of the Indian subcontinent in the evolutionary process within the family.

**Keywords:** Out-of-India; Lemurian stepping-stones; Notopteridae; Osteoglossiformes; fluorescent in situ hybridization (FISH); DARtSeq NGS; chromosomal evolution

# First chromosomal analysis in *Gymnarchus niloticus* (Gymnarchidae: Osteoglossiformes): insights into the karyotype evolution of this ancient fish order

TERUMI HATANAKA<sup>1</sup>, EZEQUIEL A. DE OLIVEIRA<sup>1,2</sup>, PETR RÁB<sup>3</sup>, CASSIA F. YANO<sup>1</sup>, LUIZ A. C. BERTOLLO<sup>1</sup>, TARIQ EZAZ<sup>4</sup>, OLADELE OLADELE ILESANMI JEGEDE<sup>5</sup>, THOMAS LIEHR<sup>6</sup>, VICTOR F. OLALLEYE<sup>7</sup> and MARCELO DE BELLO CIOFFI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil*

<sup>2</sup>*Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso – SEDUC-MT, Cuiabá, MT, Brazil*

<sup>3</sup>*Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, Liběchov 277 21, Czech Republic*

<sup>4</sup>*Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Bruce, Canberra, ACT 2601, Australia*

<sup>5</sup>*Department of Fisheries and Aquaculture, Adamawa State University, Mubi, Adamawa State, Nigeria*

<sup>6</sup>*Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Am Klinikum 1, D-07747 Jena, Germany*

<sup>7</sup>*Department of Zoology, Obafemi Awolowo University, Ile-Ife, Nigeria*

Received 21 May 2018; revised 19 June 2018; accepted for publication 20 June 2018

Osteoglossiformes is one of the most ancient (Early Triassic) groups of freshwater teleosts and has at least one representative on each continent of the Southern Hemisphere, with the exception of Antarctica. Among its six described families, the Gymnarchidae occurs in many African rivers, including the river Nile, where *Gymnarchus niloticus* is its only representative. In this study we provide, for the first time, a comprehensive cytogenetic analysis for *G. niloticus*, which includes definition of the standard karyotype, C-banding, repetitive DNA mapping and comparative genomic hybridization, in order to investigate its chromosomal patterns and provide new data for comparative analyses with other Osteoglossiformes species. The  $2n$  was 34 (26 metacentric + 8 submetacentric) in both sexes, and C-positive heterochromatic bands were detected in the centromeric/pericentromeric regions of all chromosomes. The simultaneous detection of 18S and 5S ribosomal DNAs showed simple and non-syntactical locations for such sequences, and a Chromomycin A3-positive band was observed, which is co-localized within the 18S ribosomal RNA gene sequences. Fluorescence *in situ* hybridization using U2 small nuclear RNA, *Rex6* and some microsatellites as probes showed a scattered distribution among chromosomes. Data from comparative genomic hybridization experiments with some other African Osteoglossiformes species showed that all these species have an advanced stage of sequence divergence. The results highlight the evolutionary diversification of osteoglossiform fishes.

**ADDITIONAL KEYWORDS:** ancient fishes – chromosome banding – comparative genomic hybridization – karyotype evolution – molecular cytogenetics.

## INTRODUCTION

The fish order Osteoglossiformes, superorder Osteoglossomorpha, comprises the suborders Osteoglossoidae and Notopteroidei (Li & Wilson, 1996), with the Osteoglossidae, Pantodontidae and Arapaimidae families in the former suborder and Gymnarchidae, Mormyridae and Notopteridae in the latter (Nelson

*et al.*, 2016). The superorder Osteoglossomorpha represent a morphologically heterogeneous group, including unspecialized representatives, such as those belonging to the genus *Hiodon* (order Hiodontiformes), whereas others have more highly derived characteristics, such as the electric fishes of the families Gymnarchidae and Mormyridae. Osteoglossiform fishes are distributed in freshwaters of tropical regions, in Africa, South America, South-East Asia, New Guinea and North Australia (reviewed by Lavoué & Sullivan, 2004).

\*Corresponding author. E-mail: [mbcioffi@ufscar.br](mailto:mbcioffi@ufscar.br)



RESEARCH

Open Access



# Chromosomes of Asian cyprinid fishes: cytogenetic analysis of two representatives of small paleotetraploid tribe Probarbini

Pasakorn Saenjundaeng<sup>1</sup>, Marcelo de Bello Cioffi<sup>2\*</sup>, Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>2,3</sup>, Alongklod Tanomtong<sup>1</sup>, Weerayuth Supiwong<sup>4</sup>, Sumalee Phimphan<sup>1</sup>, Maria João Collares-Pereira<sup>5</sup>, Alexandr Sember<sup>6</sup>, Luiz Antonio Carlos Bertollo<sup>2</sup>, Thomas Liehr<sup>7</sup>, Cassia Fernanda Yano<sup>2</sup>, Terumi Hatanaka<sup>2</sup> and Petr Ráb<sup>6</sup>

## Abstract

**Background:** Polyploidy, although still poorly explored, represents an important evolutionary event in several cyprinid clades. Herein, *Catlocarpio siamensis* and *Probarbus jullieni* - representatives of the paleotetraploid tribe Probarbini, were characterized both by conventional and molecular cytogenetic methods.

**Results:** Alike most other paleotetraploid cyprinids (with  $2n = 100$ ), both species studied here shared  $2n = 98$  but differed in karyotypes: *C. siamensis* displayed  $18m + 34sm + 46st/a$ ;  $NF = 150$ , while *P. jullieni* exhibited  $26m + 14sm + 58st/a$ ;  $NF = 138$ . Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rDNA probes revealed two (5S) and eight (18S) signals in *C. siamensis*, respectively, and six signals for both probes in *P. jullieni*. FISH with microsatellite motifs evidenced substantial genomic divergence between both species. The almost doubled size of the chromosome pairs #1 in *C. siamensis* and #14 in *P. jullieni* compared to the rest of corresponding karyotypes indicated chromosomal fusions.

**Conclusion:** Based on our findings, together with likely the same reduced  $2n = 98$  karyotypes in the remainder Probarbini species, we hypothesize that the karyotype  $2n = 98$  might represent a derived character, shared by all members of the Probarbini clade. Besides, we also witnessed considerable changes in the amount and distribution of certain repetitive DNA classes, suggesting complex post-polyploidization processes in this small paleotetraploid tribe.

**Keywords:** Fish cytogenetics, Cyprinidae, Chromosomal markers, rDNAs, Microsatellites

## Background

One of the most important evolutionary characteristics of Teleostei is a lineage-specific polyploidization (i.e. teleost-specific whole-genome duplication = TS-WGD) that occurred approximately 226–316 Mya [1], subsequently to its divergence from the remaining actinopterygians (i.e. bichirs, sturgeons, paddlefishes, gars and bowfin) [2, 3]. Furthermore, additional whole-genome duplications (WGDs) took place independently in several other teleostean lineages, such as, e.g., Catostomidae [4], Cobitidae [5], Callichthyidae [6, 7], Salmoniformes [8] and especially Cyprinidae [9–11].

Independent evolutionary tetraploidy and even recurrent hexaploid events of allopolyploid origin have already been evidenced for several cyprinid clades taxonomically recognized as tribes [9]; these are Probarbini, Torini, Smiliogastrini, Cyprinini, Spinibarbini, Schizothoracini, Schizopygopsini and Barbini and overall account for more than 400 polyploid species. Probarbini represents the most early-diverging group [9], with only two genera: (i) the monotypic *Catlocarpio* (*C. siamensis* Boulenger, 1898) being the largest known cyprinid species attaining a length of up to three meters [12, 13], and (ii) the genus *Probarbus*, with three valid species [14] (*P. jullieni* Sauvage, 1880, *P. labeamajor* Roberts, 1992 and *P. labeaminor* Roberts, 1992). These four potamodromous species from large river systems in South-east Asia have been and are heavily declining in the sizes of populations due to fishery pressures, but also due to

\* Correspondence: [mbcioffi@ufscar.br](mailto:mbcioffi@ufscar.br)

<sup>2</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article





# Sex Chromosome Evolution and Genomic Divergence in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae)

Alexandr Sember<sup>1</sup>, Luiz A. C. Bertollo<sup>2</sup>, Petr Ráb<sup>1</sup>, Cassia F. Yano<sup>2</sup>, Terumi Hatanaka<sup>2</sup>, Ezequiel A. de Oliveira<sup>2,3</sup> and Marcelo de Bello Cioffi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Liběchov, Czechia, <sup>2</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, <sup>3</sup> Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso (SEDUC-MT), Cuiabá, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Roberto Ferreira Artoni,  
Ponta Grossa State University, Brazil

### Reviewed by:

Julio Cesar Pleczarka,  
Universidade Federal do Pará, Brazil  
Daniel Pacheco Bruschi,  
Universidade Federal do Paraná, Brazil

### \*Correspondence:

Marcelo de Bello Cioffi  
mbcioffi@ufscar.br

### Specialty section:

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

Received: 29 August 2017

Accepted: 16 February 2018

Published: 05 March 2018

### Citation:

Sember A, Bertollo LAC, Ráb P,  
Yano CF, Hatanaka T, de Oliveira EA  
and Cioffi MdB (2018) Sex  
Chromosome Evolution and Genomic  
Divergence in the Fish *Hoplias  
malabaricus* (Characiformes,  
Erythrinidae). *Front. Genet.* 9:71.  
doi: 10.3389/fgene.2018.00071

The Erythrinidae family (Teleostei: Characiformes) is a small Neotropical fish group with a wide distribution throughout South America, where *Hoplias malabaricus* corresponds to the most widespread and cytogenetically studied taxon. This species possesses significant genetic variation, as well as huge karyotype diversity among populations, as reflected by its seven major karyotype forms (i.e., karyomorphs A-G) identified up to now. Although morphological differences in their bodies are not outstanding, *H. malabaricus* karyomorphs are easily identified by differences in  $2n$ , morphology and size of chromosomes, as well as by distinct evolutionary steps of sex chromosomes development. Here, we performed comparative genomic hybridization (CGH) to analyse both the intra- and inter-genomic status in terms of repetitive DNA divergence among all but one (E) *H. malabaricus* karyomorphs. Our results indicated that they have close relationships, but with evolutionary divergences among their genomes, yielding a range of non-overlapping karyomorph-specific signals. Besides, male-specific regions were uncovered on the sex chromosomes, confirming their differential evolutionary trajectories. In conclusion, the hypothesis that *H. malabaricus* karyomorphs are result of speciation events was strengthened.

**Keywords:** fish cytogenetics, multiple sex chromosomes, sex-determining region, sex chromosome turnover, CGH, intraspecific variability, species complex, speciation

## INTRODUCTION

The Erythrinidae family (Teleostei: Characiformes) is a small group of Neotropical fishes with a wide distribution throughout South America. This family currently consists of three well-recognized genera—*Erythrinus* (Scopoli, 1777), *Hoplias* (Gill, 1903), and *Hoplerythrinus* (Gill, 1895) with at least 15 until now recognized species (Oyakawa, 2003; Oyakawa and Mattox, 2009). Erythrinids live in diverse habitats, from small lakes and lagoons to large rivers (Oyakawa, 2003). However, unlike the large migratory Neotropical fishes, they are usually not able to overcome obstacles such as waterfalls and large rapids, due to their sedentary lifestyle (Oyakawa, 2003). This situation may have contributed to reduced gene flow between sub-populations in the same hydrographic basin. Consequently, great genome diversity has been documented within the

## RESEARCH ARTICLE

# Early Stages of XY Sex Chromosomes Differentiation in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) Revealed by DNA Repeats Accumulation

Natália Lourenço de Freitas<sup>1</sup>, Ahmed Basheer Hamid Al-Rikabi<sup>1,2</sup>, Luiz Antonio Carlos Bertollo<sup>1</sup>, Tariq Ezaz<sup>3</sup>, Cassia Fernanda Yano<sup>1</sup>, Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>1</sup>, Terumi Hatanaka<sup>1</sup> and Marcelo de Bello Cioffi<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil; <sup>2</sup>Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Kollegiengasse 10, D-07743 Jena, Germany; <sup>3</sup>Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Australia

**Abstract: Background:** Species with ‘young’ or nascent sex chromosomes provide unique opportunities to understand early evolutionary mechanisms (e.g. accumulation of repetitive sequences, cessation of recombination and gene loss) that drive the evolution of sex chromosomes. Among vertebrates, fishes exhibit highly diverse and a wide spectrum of sex-determining mechanisms and sex chromosomes, ranging from cryptic to highly differentiated ones, as well as, from simple to multiple sex chromosome systems. Such variability in sex chromosome morphology and composition not only exists within closely related taxa, but often within races/populations of the same species. Inside this context, the wolf fish *Hoplias malabaricus* offers opportunity to investigate the evolution of morphologically variable sex chromosomes within a species complex, as homomorphic to highly differentiated sex chromosome systems occur among its different karyomorphs.

**Material & Method:** To discover various evolutionary stages of sex chromosomes and to compare their sequence composition among the wolf fish’s karyomorphs, we applied multipronged molecular cytogenetic approaches, including C-banding, repetitive DNAs mapping, comparative genomic hybridization (CGH) and whole chromosomal painting (WCP). Our study was able to characterize a cryptically differentiated XX/XY sex chromosome system in the karyomorph F of this species.

**Conclusion:** The Y chromosome was clearly identified by an interstitial heterochromatic block on the short arms, primarily composed of microsatellite motifs and retrotransposons. Additionally, CGH also identified a male specific chromosome region in the same chromosomal location, implying that the accumulation of these repeats may have initiated the Y chromosome differentiation, as well as played a critical role towards the evolution and differentiation of sex chromosomes in various karyomorphs of this species.

## ARTICLE HISTORY

Received: October 10, 2016  
Revised: January 27, 2017  
Accepted: January 30, 2017

DOI: ?????????????????

**Keywords:** Fish, Early XY differentiation, Comparative genomic hybridization, Whole chromosome painting, Repetitive DNAs, Sex chromosomes.

## 1. INTRODUCTION

Sex chromosomes evolve from an autosomal pair, when one chromosome acquired a sex determining locus [1, 2]. This process involves the accumulation of constitutive heterochromatin and/or the occurrence of structural changes (e.g. chromosomal inversions or translocations) leading to the suppression of recombination between the homologous chromosomes [3]. This evolutionary process can be better explored among lower vertebrates where

the sex chromosomes exist either in incipient or in advanced forms.

Notably, fishes exhibit the widest spectrum of sex-determining modes among vertebrates, ranging from environmental sex determination to a variety of chromosomal sex determining systems [4-8]. Neotropical fish species display diverse patterns of sex chromosome differentiation, ranging from simple to highly reorganized multiple sex chromosomes [9, 10], representing both XX/XY and ZZ/ZW sex systems. The Erythrinidae family (Teleostei, Characiformes) represents an ideal model group to understand the evolution of sex chromosomes, since different evolutionary stages, from cryptic to highly differentiated ones, can occur among closely related species (Fig. 1). Heteromorphic sex chromo-

\*Address correspondence to this author at the Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brazil; Tel: +55 16 3351 8431; Fax: +55 16 3351 8377; E-mail: [mbcioffi@ufscar.br](mailto:mbcioffi@ufscar.br)

# Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes)

Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>1,2</sup> · Alexandr Sember<sup>3</sup> · Luiz Antonio Carlos Bertollo<sup>1</sup> · Cassia Fernanda Yano<sup>1</sup> · Tariq Ezaz<sup>4</sup> · Orlando Moreira-Filho<sup>1</sup> · Terumi Hatanaka<sup>1</sup> · Vladimir Trifonov<sup>5</sup> · Thomas Liehr<sup>6</sup> · Ahmed Basheer Hamid Al-Rikabi<sup>6</sup> · Petr Ráb<sup>3</sup> · Hugmar Pains<sup>7</sup> · Marcelo de Bello Cioffi<sup>1</sup>

Received: 29 August 2017 / Revised: 16 October 2017 / Accepted: 17 October 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

**Abstract** The Neotropical fish, *Hoplias malabaricus*, is one of the most cytogenetically studied fish taxon with seven distinct karyomorphs (A–G) comprising varying degrees of sex chromosome differentiation, ranging from homomorphic to highly differentiated simple and multiple sex chromosomes. Therefore, this fish offers a unique opportunity to track evolutionary mechanisms standing behind the sex chromosome evolution and differentiation. Here, we focused on a high-

resolution cytogenetic characterization of the unique XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> multiple sex chromosome system found in one of its karyomorphs (G). For this, we applied a suite of conventional (Giemsa-staining, C-banding) and molecular cytogenetic approaches, including fluorescence in situ hybridization FISH (with 5S and 18S rDNAs, 10 microsatellite motifs and telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences as probes), comparative genomic hybridization (CGH), and whole chromosome painting

Both Ezequiel Aguiar de Oliveira and Alexandr Sember will share the first authorship of this manuscript.

✉ Marcelo de Bello Cioffi  
mbcioffi@ufscar.br

Ezequiel Aguiar de Oliveira  
ezebio@gmail.com

Alexandr Sember  
alexandr.sember@seznam.cz

Luiz Antonio Carlos Bertollo  
bertollo@ufscar.br

Cassia Fernanda Yano  
yanocf@ufscar.br

Tariq Ezaz  
Tariq.Ezaz@canberra.edu.au

Orlando Moreira-Filho  
omfilho@ufscar.br

Terumi Hatanaka  
hterumi@yahoo.com.br

Vladimir Trifonov  
vlad@mcb.nsc.ru

Thomas Liehr  
Thomas.Liehr@med.uni-jena.de

Ahmed Basheer Hamid Al-Rikabi  
ahmed.al-rikabi@med.uni-jena.de

Petr Ráb  
rab@iapg.cas.cz

Hugmar Pains  
painsbio@gmail.com

<sup>1</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

<sup>2</sup> Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso – SEDUC-MT, Cuiabá, MT, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Czech Republic

<sup>4</sup> Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Canberra, Australia

<sup>5</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>6</sup> Jena University Hospital, Universitätsklinikum Jena, Institute of Human Genetics, Am Klinikum 1, D-07747 Jena, Germany

<sup>7</sup> Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brazil



# First Chromosomal Analysis in Hepsetidae (Actinopterygii, Characiformes): Insights into Relationship between African and Neotropical Fish Groups

Pedro C. Carvalho<sup>1</sup>, Ezequiel A. de Oliveira<sup>1,2</sup>, Luiz A. C. Bertollo<sup>1</sup>, Cassia F. Yano<sup>1</sup>, Claudio Oliveira<sup>3</sup>, Eva Decru<sup>4</sup>, Oladele I. Jegede<sup>5</sup>, Terumi Hatanaka<sup>1</sup>, Thomas Liehr<sup>6</sup>, Ahmed B. H. Al-Rikabi<sup>6</sup> and Marcelo de B. Cioffi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, <sup>2</sup> Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso (Seduc-MT), Cuiabá, Brazil, <sup>3</sup> Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil, <sup>4</sup> Section Vertebrates, Ichthyology, Royal Museum for Central Africa, Tervuren, Belgium, <sup>5</sup> Department of Fisheries and Aquaculture, Adamawa State University, Mubi, Nigeria, <sup>6</sup> Institute of Human Genetics, University Hospital Jena, Jena, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Roberto Ferreira Artoni,  
Ponta Grossa State University, Brazil

### Reviewed by:

Maelin Silva,  
Universidade Federal da Fronteira Sul,  
Brazil  
Lukas Kratochvil,  
Charles University, Czechia

### \*Correspondence:

Marcelo de B. Cioffi  
mbcioffi@ufscar.br

### Specialty section:

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

**Received:** 18 October 2017

**Accepted:** 22 November 2017

**Published:** 12 December 2017

### Citation:

Carvalho PC, de Oliveira EA, Bertollo LAC, Yano CF, Oliveira C, Decru E, Jegede OI, Hatanaka T, Liehr T, Al-Rikabi ABH and Cioffi MB (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

Hepsetidae is a small fish family with only the genus *Hepsetus*, with six described species distributed throughout the South, Central and Western regions of Africa, showing a close relationship with the Alestidae and some Neotropical fish families. However, no cytogenetic information is available for both Hepsetidae and Alestidae species, thus preventing any evolutionary comparative studies at the chromosomal level. In the present study, we are providing new cytogenetic data for *Hepsetus odoe*, including the standard karyotype, C-banding, repetitive DNAs mapping, comparative genomic hybridization (CGH) and whole chromosome painting (WCP), providing chromosomal patterns and subsidies for comparative cytogenetics with other characiform families. Both males and females *H. odoe* have  $2n = 58$  chromosomes (10m + 28sm + 20st/a), with most of the C-band positive heterochromatin localized in the centromeric and subtelomeric regions. Only one pair of chromosomes bears proximal 5S rDNA sites in the short arms, contrasting with the 18S rDNA sequences which are located in the terminal regions of four chromosome pairs. Clear interstitial hybridization signals are evidenced for the U1 and U2 snDNA probes, but in only one and two chromosome pairs, respectively. Microsatellite motifs are widely distributed in the karyotype, with exception for the (CGG)<sub>10</sub>, (GAA)<sub>10</sub> and (GAG)<sub>10</sub> probes, which highlight conspicuous interstitial signals on a unique pair of chromosomes. Comparative data from conventional and molecular cytogenetics, including CGH and WCP experiments, indicate that *H. odoe* and some Erythrinidae species, particularly *Erythrinus erythrinus*, share similar chromosomal sequences suggesting some relatedness among them, although bearing genomic specificities in view of their divergent evolutionary histories.

**Keywords:** fishes, molecular cytogenetics, chromosomal painting, comparative genomic hybridization (CGH), karyotype evolution

RESEARCH

Open Access



# Comparative cytogenetics in three Sciaenid species (Teleostei, Perciformes): evidence of interspecific chromosomal diversification

Dongdong Xu<sup>1\*</sup>, Wagner Franco Molina<sup>2</sup>, Cassia Fernanda Yano<sup>3</sup>, Yurong Zhang<sup>1</sup>, Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>3,4</sup>, Bao Lou<sup>1</sup> and Marcelo de Bello Cioffi<sup>3</sup>

## Abstract

**Background:** Species belonging to the Sciaenidae family present a karyotype composed by 48 acrocentric chromosomes and are thus considered a striking example of chromosomal conservation. In this family, three species are extensively studied including *Larimichthys crocea*, *Larimichthys polyactis* and *Nibea albiflora* due to their importance in fishery and aquaculture in East Asia. Despite abundant data of population genetics available for some of them, cytogenetic information on these species is still scarce and obtained by conventional cytogenetic protocols. Therefore, a more detailed cytogenomic investigation was performed in these species to analyze their karyotype differentiation using conventional staining techniques and fluorescence in situ hybridization to map several repetitive DNAs.

**Results:** The three species showed a slight karyotype differentiation with 4sm + 2st + 42a in *L. polyactis*, 20st + 28a in *L. crocea* and 48a in *N. albiflora*. Additionally, the mapping of repetitive sequences further revealed a number of interspecific differences among them. Particularly, 18S and 5S rDNA sites showed syntenic arrangements in *N. albiflora* and non-syntenic arrangements in both *Larimichthys* species. The microsatellites (CA)<sub>15</sub> and (GA)<sub>15</sub> showed conspicuous terminal clusters in some chromosomes of all species. On the other hand, (CGG)<sub>10</sub> repeats, *Rex6* elements and U2 snRNA displayed a scattered distribution on the chromosomes.

**Conclusions:** Although the three Sciaenid species examined displayed a general pattern of karyotypic conservatism, we explored chromosomal diversification among them. The diversified karyotypic macrostructure is followed by intergeneric evolutionary diversification of the repetitive sequences. The data indicate some degree of intergeneric evolutionary diversification at chromosomal level, and suggest the evolutionary dynamics among Sciaenid species, higher than previously thought. The present cytogenetic data provide new insight into the chromosomal diversification in Sciaenidae, and contribute to inferring the chromosomal rearrangements and trends of karyotype evolution in this fish group.

**Keywords:** Sciaenidae, Chromosome evolution, Repetitive sequences, Pericentric inversions, U2 snRNA

## Background

Sciaenidae form one of the largest Perciformes' families, comprising 66 genera and approximately 291 species [1]. They are commonly called croakers or drums because of their propensity to produce sounds using sonic muscles and swim bladder. Sciaenid fishes are among the top priced seafood species in Asian cuisine due to their

delicate flavor and rich nutritional value. The genera *Larimichthys* and *Nibea* include three of the most popular species in this family, which are the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), the small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) and the yellow drum (*Nibea albiflora*) [2]. They are commercially important species distributed along the coasts of East Asia (Fig. 1). In fact, *L. crocea* is one of the most highlighted aquaculture species in China, with the annual yield exceeding any other net-cage-farmed marine fish species [3], while *L. polyactis* is one of the principal marine fishery species in China and

\* Correspondence: xudong0580@163.com

<sup>1</sup>Marine Fishery Institute of Zhejiang Province, Key Lab of Mariculture and Enhancement of Zhejiang Province, 316100 Zhoushan, Zhejiang Province, People's Republic of China

Full list of author information is available at the end of the article



# Karyotype and Mapping of Repetitive DNAs in the African Butterfly Fish *Pantodon buchholzi*, the Sole Species of the Family Pantodontidae

Petr Ráb<sup>a</sup> Cassia F. Yano<sup>b</sup> Sébastien Lavoué<sup>c</sup> Oladele I. Jegede<sup>d</sup>  
Luiz A.C. Bertollo<sup>b</sup> Tariq Ezaz<sup>e</sup> Zuzana Majtánová<sup>a</sup> Ezequiel A. de Oliveira<sup>b</sup>  
Marcelo B. Cioffi<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Liběchov, Czech Republic; <sup>b</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil; <sup>c</sup>Institute of Oceanography, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC; <sup>d</sup>Department of Fisheries and Aquaculture, Adamawa State University, Mubi, Nigeria; <sup>e</sup>Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Canberra, A.C.T., Australia

## Key Words

African butterfly fish · Conventional staining techniques · Fluorescence in situ hybridization · Karyotype · Osteoglossiformes · Repetitive DNAs

## Abstract

The monophyletic order Osteoglossiformes represents one of the most ancestral groups of teleosts and has at least 1 representative in all continents of the southern hemisphere, with the exception of Antarctica. However, despite its phylogenetic and biogeographical importance, cytogenetic data in Osteoglossiformes are scarce. Here, karyotype and chromosomal characteristics of the lower Niger River population of the African butterfly fish *Pantodon buchholzi*, the sole species of the family Pantodontidae (Osteoglossiformes), were examined using conventional and molecular cytogenetic approaches. All specimens examined had  $2n = 46$  chromosomes, with a karyotype composed of 5 pairs of metacentric, 5 pairs of submetacentric, and 13 pairs of acrocentric chromosomes in both sexes. No morphologically differentiated sex chromosomes were identified. C-bands were located in the centromeric/pericentromeric region of all chromosomes and were associated with the single AgNOR site. FISH with

ribosomal DNA probes revealed that both 5S and 18S rDNA were present in only 1 pair of chromosomes each, but did not colocalize.  $CMA_3^+$  bands were observed near the telomeres in several chromosome pairs and also at the 18S rDNA sites. The mapping of di- and trinucleotide repeat motifs, *Rex6* transposable element, and U2 snRNA showed a scattered distribution over most of the chromosomes, but for some microsatellites and the U2 snRNA also a preferential accumulation at telomeric regions. This study presents the first detailed cytogenetic analysis in the African butterfly fish by both conventional and molecular cytogenetic protocols. This is the first of a series of further cytogenetic and cytogenomic studies on osteoglossiforms, aiming to comprehensively examine the chromosomal evolution in this phylogenetically important fish order.

© 2016 S. Karger AG, Basel

The monophyletic order Osteoglossiformes is an ancient group of fishes that are restricted to freshwater [Bănărescu, 1990; Greenwood and Wilson, 1998; Hilton, 2003]. These fishes belong to the Osteoglossomorpha, one of the 3 monophyletic lineages making up Teleostei [Near et al., 2012], defined by their possession of bony tongues

RESEARCH

Open Access

# Comparative cytogenetics in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae) highlights contrasting karyotype evolution among congeneric species



Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>1,2</sup>, Luiz Antônio Carlos Bertollo<sup>1</sup>, Cassia Fernanda Yano<sup>1</sup>, Thomas Liehr<sup>3</sup> and Marcelo de Bello Cioffi<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** The Erythrinidae fish family contains three genera, *Hoplias*, *Erythrinus* and *Hoplerythrinus* widely distributed in Neotropical region. Remarkably, species from this family are characterized by an extensive karyotype diversity, with 2n ranging from 39 to 54 chromosomes and the occurrence of single and/or multiple sex chromosome systems in some species. However, inside the *Hoplias* genus, while *H. malabaricus* was subject of many studies, the cytogenetics of other congeneric species remains poorly explored. In this study, we have investigated chromosomal characteristics of four *Hoplias* species, namely *H. lacerdae*, *H. brasiliensis*, *H. intermedius* and *H. aimara*. We used conventional staining techniques (C-banding, Ag-impregnation and CMA<sub>3</sub>-fluorescence) as well as fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with minor and major rDNA and microsatellite DNAs as probes in order to analyze the karyotype evolution within the genus.

**Results:** All species showed invariably 2n = 50 chromosomes and practically identical karyotypes dominated only by meta- and submetacentric chromosomes, the absence of heteromorphic sex chromosomes, similar pattern of C-positive heterochromatin blocks and homologous Ag-NOR-bearing pairs. The cytogenetic mapping of five repetitive DNA sequences revealed some particular interspecific differences between them. However, the examined chromosomal characteristics indicate that their speciation was not associated with major changes in their karyotypes.

**Conclusion:** Such conserved karyotypes contrasts with the extensive karyotype diversity that has been observed in other Erythrinidae species, particularly in the congeneric species *H. malabaricus*. Nevertheless, what forces drive such particularly different modes of karyotype evolution among closely related species? Different life styles, population structure and inner chromosomal characteristics related to similar cases in other vertebrate groups can also account for the contrasting modes of karyotype evolution in *Hoplias* genus.

**Keywords:** Trahiras, Fish cytogenetics, FISH, Repetitive DNA, Chromosome change and speciation

## Background

Erythrinidae is a small family of freshwater fishes composed by three genera, *Hoplias* Gill 1903, *Erythrinus* Scopoli 1777 and *Hoplerythrinus* Gill 1895 [1]. Its species are characterized by a remarkable karyotype diversity with 2n ranging from 39 to 54 chromosomes and the occurrence of single and multiple sex chromosome systems in some species.

Thus, they represent an interesting and suitable model to investigate the process of chromosomal evolution among fishes [2–5].

Although small, the actual diversity, systematics and corresponding taxonomic construction of Erythrinidae is still not well resolved. Especially in the *Hoplias* genus, three major groups of species were identified based on their morphological characters: *H. lacerdae*, *H. malabaricus* and *H. macrophtalmus* [6]. The *lacerdae* group was recently revised and 5 valid species are now recognized namely *H. lacerdae*, *H. intermedius*, *H. brasiliensis*, *H. curupira* and

\* Correspondence: mbcioffi@ufscar.br

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



RESEARCH ARTICLE

# Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and Its Implications for the Chromosomal Evolution of Channid Fishes (Actinopterygii, Perciformes)

Marcelo de Bello Cioffi<sup>1</sup>, Luiz Antonio Carlos Bertollo<sup>1</sup>, Mateo Andres Villa<sup>2</sup>, Ezequiel Aguiar de Oliveira<sup>1</sup>, Alongklod Tanomtong<sup>3</sup>, Cassia Fernanda Yano<sup>1</sup>, Weerayuth Supiwong<sup>4</sup>, Arunrat Chaveerach<sup>3,5\*</sup>

**1** Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil, **2** Franklin College of Arts and Sciences, University of Georgia, Athens, Georgia, United States of America, **3** Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang District, Khon Kaen, Thailand, **4** Faculty of applied science and engineering, Khon Kaen University, Nong Kai Campus, Muang, Nong Kai, 43000, Thailand, **5** Genetics and Environmental Toxicology Research Group, Khon Kaen University, Muang District, Khon Kaen, Thailand

\* [raccha@kku.ac.th](mailto:raccha@kku.ac.th)



OPEN ACCESS

**Citation:** Cioffi MdB, Bertollo LAC, Villa MA, de Oliveira EA, Tanomtong A, Yano CF, et al. (2015) Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and Its Implications for the Chromosomal Evolution of Channid Fishes (Actinopterygii, Perciformes). PLoS ONE 10(6): e0130199. doi:10.1371/journal.pone.0130199

**Academic Editor:** Kunbo Wang, Institute of Cotton Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, CHINA

**Received:** February 17, 2015

**Accepted:** May 18, 2015

**Published:** June 12, 2015

**Copyright:** © 2015 Cioffi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was financially supported by the Genetics and Environmental Toxicology Research Group (Khon Kaen University) and by the Brazilian agency CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Channid fishes, commonly referred to as “snakeheads”, are currently very important in Asian fishery and aquaculture due to the substantial decline in natural populations because of overexploitation. A large degree of chromosomal variation has been found in this family, mainly through the use of conventional cytogenetic investigations. In this study, we analyzed the karyotype structure and the distribution of 7 repetitive DNA sequences in several *Channa* species from different Thailand river basins. The aim of this study was to investigate the chromosomal differentiation among species and populations to improve upon the knowledge of its biodiversity and evolutionary history. Rearrangements, such as pericentric inversions, fusions and polyploidization, appear to be important events during the karyotypic evolution of this genus, resulting in the chromosomal diversity observed among the distinct species and even among populations of the same species. In addition, such variability is also increased by the genomic dynamism of repetitive elements, particularly by the differential distribution and accumulation of rDNA sequences on chromosomes. This marked diversity is likely linked to the lifestyle of the snakehead fishes and their population fragmentation, as already identified for other fish species. The karyotypic features highlight the biodiversity of the channid fishes and justify a taxonomic revision of the genus *Channa*, as well as of the Channidae family as a whole, as some nominal species may actually constitute species complexes.