

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO ARUANÃ  
(*Osteoglossum bicirrhosum*) NA AMAZÔNIA CENTRAL**

Bolsista: Patrícia da Costa Gomes, CNPq

Manaus - AM

2009

**PATRÍCIA DA COSTA GOMES**

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO ARUANÃ**  
*(Osteoglossum bicirrhosum)* **NA AMAZÔNIA CENTRAL**

Orientadora: Prof. Dra. Izeni Pires Farias

Co-orientadora: M.Sc. Maria da Conceição F. Santos

Manaus - AM

2009

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01. Quantificação da extração de DNA total de aruanã (*O. bicirrhosum*) em gel de agarose 0,8% (282, 283, 284, 285 286). 12
- Figura 02. Quantificação de DNA de aruanã (*O. bicirrhosum*) amplificado (utilizando *primer* Ob\_F01) via PCR em gel de agarose 1%. De acordo com a corrida deste gel o tamanho deste DNA amplificado pode variar de 266-272 pb (pares de bases). 12
- Figura 03. Genotipagem de dois indivíduos de aruanã (*O. bicirrhosum*) das populações da localidade de Janauacá. 13

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Parâmetros populacionais por <i>loci</i> por população.	14
Tabela 02. Parâmetros de diversidade genética e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.	15
Tabela 03. Resultado da análise de variância molecular.	16
Tabela 04. Valores de $Nm$ (abaixo) e $F_{ST}$ (acima).	16

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	9
2.1 Objetivo Geral.....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
3.1 Locais de Coleta.....	10
3.2 Extração de DNA das Amostras.....	10
3.3 Genotipagens das Amostras de Aruanã.....	10
3.4 Análises das Genotipagens.....	11
3.5 Análises dos Dados.....	11
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	12
4.1 Locais de Coleta, Extração de DNA e Amplificação das Amostras.....	12
4.2 Análises das Genotipagens.....	13
4.3 Análises dos Dados.....	13
4.4 Análise da Variância Molecular (AMOVA).....	15
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	17
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	18

## 1. INTRODUÇÃO

A ordem dos Osteoglossiformes está representada por peixes predominantemente de água doce, que ocorrem na Índia e África, região Indo-Australiana, América do Sul e América do Norte (GREENWOOD et al., 1966). Esta ordem está representada pela família Osteoglossidae (ARAGÃO, 1984). A família Osteoglossidae abriga a subfamília Osteoglossinae, que está representada por um único gênero *Osteoglossum* que é compreendido pelo aruanã branco, espécie *Osteoglossum bicirrhosum*, (CUVIER, 1829) e aruanã preto *Osteoglossum ferreirai* Kanazawa, 1966.

O *O. bicirrhosum* encontra-se amplamente distribuído na Amazônia e Guianas (CALA, 1973) e segundo Schuwartz e Levy (1968) a sua distribuição pode estar relacionada com a qualidade da água. O aruanã preto (*O. ferreirai*) é encontrado em afluentes de águas ácidas do Rio Negro e o aruanã branco (*O. bicirrhosum*) nos afluentes de águas alcalinas.

Por pertencerem à família Osteoglossidae, os aruanãs são considerados como o único exemplo vivo dessa família primitiva. A espécie *O. bicirrhosum*, possui características morfológicas e fisiológicas peculiares, como corpo alongado e comprimido lateralmente, completamente coberto com escamas, tem uma boca grande e inclinada com dois barbelos. A sua cor é cinza metálico com uma camada azul, amarelo, nadadeira anal vermelha e língua óssea (GREENWOOD et al., 1966). Apresenta respiração aérea e um comportamento conhecido como “*mouth brooding*”, nos quais ovos e alevinos são carregados na boca do macho (NELSON, 1994). O desenvolvimento larval dos filhotes de aruanã ocorre dentro da cavidade bucal do macho (RABELLO-NETO, 1999). Estas características atrativas do aruanã branco induzem a sua exploração por dois ramos de atividades econômicas, da pesca para a alimentação e a comercialização como peixes ornamentais.

O pico anual da pesca do aruanã ocorre no período de seca, pois os peixes tornam-se mais concentrados e vulneráveis à pesca nos lagos, visto que esta espécie possui um comportamento sedentário (VIANA, 2004) e possuem uma tendência a baixo fluxo gênico entre sistemas e formação de subgrupos populacionais (BARTHEM e FABRÉ, 2004). Logo, vem sofrendo uma pesca excessiva, pois como peixe ornamental apenas os alevinos ainda com saco vitelino são comercializados. E no que diz respeito ao cuidado parental, é feito exclusivamente pelos machos que incubam os filhotes na boca (“*mouth brooder*”, em português significa: “boca chocadeira”). Portanto quando ocorre a captura dos alevinos, também são retirados da população os machos adultos, uma vez que eles realizam cuidado parental (RABELLO, 1999).

Devido a este grande interesse (ornamental e alimentício) é preciso conhecer a ecologia, fisiologia e principalmente a estrutura genética das populações de aruanãs, para que esta espécie não seja listada no **CITES** (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção) como ocorreu com a espécie asiática *Scleropage formosus* (peixe dragão) que faz parte da lista de 2006 dos seres vivos ameaçados de extinção (Lista Vermelha da IUCN). O aruanã asiático *Scleropage formosus* é uma das espécies mais caras no mercado de peixe ornamental. O número de indivíduos no ambiente natural tem sido reduzido rapidamente devido à sobrepesca, por isso a espécie tem sido listada como uma das ameaçadas pelo CITES desde 1975 (YUE, et al., 2003).

A extenuação da variabilidade genética dentro e entre populações pode ser um componente decisivo para a sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo. A habilidade de uma espécie de se adaptar às constantes modificações do meio ambiente depende em grande parte do nível de diversidade genética encontrada na mesma (FRANKHAM et al., 2002).

O estudo da variabilidade genética populacional e específica têm sido possível devido ao desenvolvimento de vários marcadores moleculares. O uso das técnicas moleculares na pesquisa pesqueira tem aumentado nos últimos anos devido ao desenvolvimento das técnicas e também a conscientização do valor dos dados genéticos (WARD e GRAVE, 1995).

Marcadores moleculares como os microssatélites, são ferramentas seguras para se estimar parâmetros genéticos fundamentais ou características importantes para a conservação, tais como estimativas do tamanho efetivo da população e a presença de populações que sofreram “*bottlenecks*”, ou seja, recente redução no tamanho populacional (HEDRICK, 2004).

Segundo Shlotterer e Pemberton (1998) as sequências denominadas DNA microssatélite têm unidades de repetição de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento repetidas em

tandem. Essas sequências são geralmente encontradas nas regiões não codificadoras do genoma (sendo considerados marcadores neutros) (GOLDSTEIN e SHLÖTTERER, 1999). Estes marcadores, também chamados de “*simple sequence repeats*” ou SSR, são hipervariáveis, co-dominantes e revelam variações no comprimento entre os alelos (PARKER et al., 1998; SUNNUCKS, 2000).

Estes marcadores têm se mostrado informativos para responder uma série de questões na área de genética de populações e da conservação. O uso das técnicas moleculares é importante para a genética da conservação, sendo útil para populações exploradas comercialmente e para espécies ameaçadas de extinção, tendo como função estudar a biodiversidade molecular de populações naturais das espécies sob o impacto antropogênico (FRANKHAM, et al 2002), como no caso dos aruanãs.

Considerando a importância econômica do aruanã (*O. bicirrhosum*) e suas características comportamentais, tais como baixa capacidade migratória (sedentários), desova em lagos e cuidado parental, esta espécie torna-se frágil e de alto risco com relação aos efeitos antropogênicos devendo, sua biologia ser mais bem estudada para que tais espécies possam ser conservadas e manejadas de forma sustentável (BARTHEM e FABRÉ, 2004).

Outra questão relevante é a unidade populacional explorada pela pesca. A maioria das espécies importantes para a pesca comercial é razoavelmente bem conhecida, mas pouco se sabe se os indivíduos destas estão agrupados numa única população, ou estoque pesqueiro, ou em várias populações (BALEY e PETRERE, 1989; BATISTA, 2001). Desta forma, torna-se indispensável o conhecimento da genética populacional dos aruanãs através de análises moleculares para a contribuição da preservação e uso sustentável deste recurso na Amazônia Central.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a variabilidade genética de populações naturais de *Osteoglossum bicirrhosum* da Amazônia Central.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar e avaliar a variabilidade genética das populações de aruanãs oriundos de rios da Amazônia Central por meio de marcadores nucleares de microssatélites;
- Identificar a existência de populações geneticamente diferenciadas.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Locais de Coleta**

Foram utilizadas amostras de indivíduos provenientes de quatro localidades da bacia Amazônica: Coari, Janauacá, Santarém e Tefé. Essas amostras foram obtidas a partir de idas a campo, coletando diretamente da pesca artesanal e em mercados/feiras dos municípios ou comunidades arredores.

De cada exemplar, foi coletado a nadadeira ou pedaço de tecido muscular e em seguida preservado em álcool 100%. Foram utilizados 52 indivíduos e todas as amostras já se encontram depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal (CTGA)/ICB/UFAM.

### **3.2 Extrações de DNA das Amostras**

O DNA de todas as amostras foi extraído utilizando o método Fenol/Clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). Ao término da extração foi realizada a quantificação do DNA em gel de agarose 0,8%, onde é feita a verificação da concentração de DNA obtida de cada amostra, comparando-as com amostras de DNA com concentrações já conhecidas.

### **3.3 Genotipagem das Amostras de Aruanã**

O DNA das amostras foi amplificado nas regiões ricas em microssatélites utilizando seis pares de *primers* (Ob\_A08, Ob\_C04, Ob\_F01, Ob\_F06, Ob\_F09 e Ob\_H06) desenvolvidos para aruanã (*O. bicirrhosum*) (SILVA et al, 2009).

As genotipagens foram feitas utilizando o método econômico de Schuelke (2000) que usa juntamente com o *primer* específico da região microssatélite uma seqüência chamada de

cauda M13, marcado com fluorescência que possibilita a leitura no seqüenciador automático *MegaBACE*<sup>TM</sup> 1000 (GE Healthcare).

As condições das genotipagens foram realizadas em um volume final de 10 µL contendo: 1,25 µL de tampão de PCR (10X); 1,25 µL de dNTPs (2,5 mM); 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0,5 µL de *primer forward* (2,5 pmol); 1,0 µL de *primer reverse* (2,5 pmol); 0,5 µL de *primer* M13 marcado com FAM (2,5 pmol); 0,4 µL de Taq DNA polimerase (1U/ml) e 1 µL de DNA (10 ng/µL).

No termociclador as condições utilizadas foram: 94 °C por 1 minuto para a desnaturação inicial seguido por 35 ciclos de: 94 °C para a desnaturação por 20 segundos, 60 e 65° C por 20 segundos para anelamento dos *primers* e 72° C por 30 segundos para extensão, seguidas por outros 20 ciclos para anelamento dos *primers* M13 com as seguintes condições: 94 °C por 20 segundos para a desnaturação, 53 °C por 20 segundos que é a temperatura de anelamento do *primer* M13, 72 °C por 30 segundos para a extensão e uma extensão final de 30 minutos a 72 °C, sendo então mantidos a 10 °C.

Em seguida os produtos de amplificação foram observados em gel de agarose a 1% corados com brometo de etídio e fotodocumentados. Amostras que apresentaram intensidade de banda muito forte passaram por testes de diluições que variaram de: 1 µL de PCR para 20 µL de água até 1 µL PCR para 150 µL de água (1/19, 1/49, 1/69, 1/99 e 1/149).

Os fragmentos amplificados do PCR foram genotipados no seqüenciador automático *MegaBACE*<sup>TM</sup> 1000 (GE Healthcare) usando protocolo recomendado pelo fabricante.

### **3.4 Análises das Genotipagens**

A análise das genotipagens foi realizada no programa *Fragment Profiler* onde foi possível observar o tamanho dos alelos para cada indivíduo comparado ao padrão ET 400 ROX (GE Healthcare).

### **3.5 Análises dos Dados**

Para a análise dos dados foi utilizado o programa ARLEQUIN v3.1 (EXCOFFIER ET al., 2006) que calcula o número de alelos, a heterozigidade observada e heterozigidade esperada de cada loco e o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

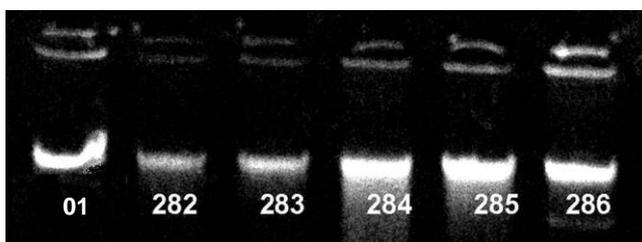
As medidas de estruturação genética foram realizadas utilizando-se a Análise de Variância Molecular (AMOVA). Os coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) e de diferenciação

genética ( $F_{ST}$ ) e número de migrantes por geração ( $N_m$ ) foram determinados utilizando-se o programa ARLEQUIN v3.11 (EXCOFFIER et al., 2006). A significância dos métodos foi avaliada por testes de permutação (1000 réplicas) e todos os níveis de significância para os testes envolvendo comparações múltiplas foram ajustados seguindo a correção de Bonferroni (RICE, 1989).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

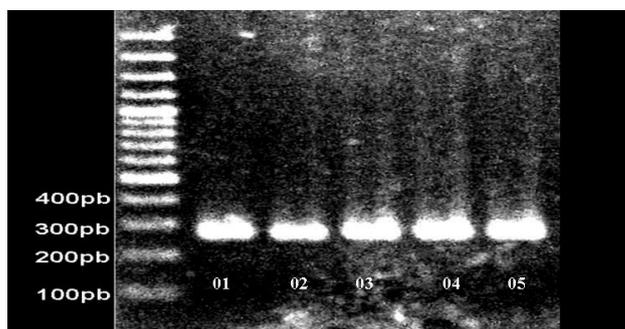
### 4.1 Locais de Coleta, Extração de DNA e Amplificação das Amostras

Um total de 52 amostras de tecidos de aruanã foram coletadas abrangendo quatro localidades/rios de (Coari, Janauacá, Santarém e Tefé). De acordo com a quantificação do DNA. Algumas das amostras foram diluídas por apresentarem grande concentração de DNA (Figura 01). Segundo o teste de diluição, onde a mais satisfatória foi a de 1 $\mu$ L de DNA para 99 $\mu$ L de água.



**Figura 01.** Quantificação da extração de DNA total de aruanã (*O. bicirrhosum*) em gel de agarose 0,8% (282, 283, 284, 285 e 286). A amostra (01) da esquerda para a direita corresponde a um marcador padrão de DNA (de peso molecular de 50 ng).

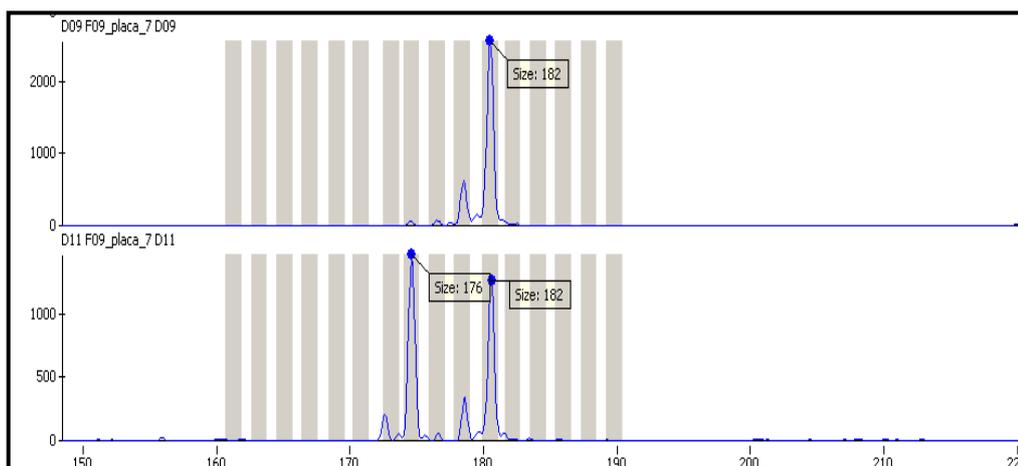
Após a quantificação, o DNA foi utilizado para amplificação *in vitro* através da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). A quantificação dos produtos da PCR foram comparados com o marcador de 100 pb observado em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio, onde foram visualizadas bandas intensas que depois foram diluídas. Através dos testes, a diluição de 1 $\mu$ L de DNA amplificado para 49 $\mu$ L de água foi a mais satisfatória para que os produtos amplificados fossem genotipados (Figura 02).



**Figura 02.** Quantificação de DNA de aruanã (*O. bicirrhosum*) amplificado (utilizando *primer* Ob\_F01) via PCR em gel de agarose 1%. De acordo com a corrida deste gel o tamanho deste DNA amplificado pode variar de 266-272 pb (pares de bases). De acordo com o marcador de 100 pb, as bandas dos produtos amplificados (01,02, 03, 04, 05) correram entre 200 e 300 pb.

## 4.2 Análises das Genotipagens

No programa *Fragment Profiler* foi possível a observação do tamanho dos alelos de cada indivíduo comparado ao padrão ET 400 ROX (GE Healthcare) (Figura 03). No *Fragment Profiler* já é possível observar se o indivíduo é heterozigoto ou homozigoto de acordo com a presença dos alelos.



**Figura 03.** Genotipagem de dois indivíduos de aruanã (*O. bicirrhosum*) da localidade de Janauacá. (D09 – indivíduo homozigoto) e (D11 – indivíduo heterozigoto) com *primer* (Ob\_F09) analisada no programa *Fragment Profiler*.

## 4.3 Análises dos Dados

Foram analisados 6 *loci* de microssatélites que apresentaram um total de trinta e três alelos diferentes para as 4 populações estudadas. O número de alelos por loco para todas as populações variou de 3 (loco F06) a 9 (loco F09). Entretanto, apenas para população de Januacá o loco F01 mostrou-se monomórfico. (Tabela 01).

Dentro dos 52 indivíduos analisados, o número de heterozigotos encontrados nas 4 populações (Tefé, Coari, Januacá e Santarém) foram de 14, 6, 7 e 11 respectivamente,

enquanto que o número de homozigotos encontrados nessas populações foram de 4, 6, 4 e 0, respectivamente.

Os menores valores da heterozigosidade observada ( $H_O$ ) foram encontrados nas populações de Coari e Janauacá (0.000), enquanto que o maior valor foi encontrado na população de Santarém (0.8181). A heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) variou de 0.0625 a 0.5844 (nas populações de Tefé e Santarém, respectivamente) (Tabela 01).

De acordo com os pressupostos de Hardy-Weinberg (FRANKHAM et al., 2008), a frequência dos alelos está dentro do esperado para a maioria dos *loci* estudados (A08, C04, F06, F09 e H06), sugerindo uma boa qualidade desses *loci* como marcadores moleculares. Somente nos *loci* F01 e F06 considerando-se todas as localidades em conjunto foi observado valor de  $P$  significativo, mesmo após a correção de Bonferroni ( $P < 0,008$ ) (Tabela 01).

**Tabela 01.** Parâmetros populacionais por *loci* por população. A: Numero de alelos;  $H_O$ : Heterozigosidade Observada;  $H_E$ : Heterozigosidade Esperada. \* Valores significantes após a correção de Bonferroni ( $P < 0.008$ ).

		A08	C04	F01	F06	F09	H06
<b>Tefé</b>	A	3	4	3	2	5	2
	$H_O$	0.12500	0.52941	0.11765	0.06250	0.38889	0.29412
	$H_E$	0.23185	0.47950	0.11586	0.06250	0.39048	0.48663
	$P$	0.19117	1.00000	1.00000	1.00000	0.62456	0.13783
<b>Coari</b>	A	2	2	3	2	4	5
	$H_O$	0.16667	0.27273	0.00000	0.00000	0.33333	0.33333
	$H_E$	0.15942	0.36797	0.30435	0.18947	0.52536	0.52899
	$P$	1.00000	0.43894	0.00234	0.05206	0.07685	0.04181
<b>Janauacá</b>	A	3	3	1	2	4	2
	$H_O$	0.18182	0.27273	-	0.00000	0.36364	0.18182
	$H_E$	0.17749	0.43723	-	0.17316	0.56710	0.41558
	$P$	1.00000	0.10787	-	0.04789	0.04841	0.10839
<b>Santarém</b>	A	3	4	3	2	4	3
	$H_O$	0.09091	0.36364	0.09091	0.10000	0.60000	0.81818
	$H_E$	0.25541	0.45455	0.39394	0.10000	0.55263	0.58442
	$P$	0.04596	0.61280	0.00764	1.00000	0.30762	0.10839
<b>Todos</b>	A	6	5	5	3	9	5

$H_O$	0.14000	0.38000	0.05882	0.04255	0.41176	0.39216
$H_E$	0.20566	0.43879	0.20287	0.12263	0.49369	0.49796
$P$	0.03229	0.61756	0.00000*	0.00038*	0.03513	0.24378

Analisando-se os parâmetros de diversidade genética verificou-se que o menor valor está na população de Janauacá (0,295094), que também apresenta a menor média no número de alelos (2,3).

A maior variação gênica foi encontrada na população de Santarém (0,422078) que juntamente com a população de Tefé apresentaram uma média de 3,1 de número de alelos para todos os *loci* estudados (Tabela 02).

Os resultados da heterogeneidade nos parâmetros de diversidade genética, bem como os valores baixos para a diversidade gênica e heterozigosidades observados na tabela 02 devem ser vistos com cautela ao compararmos estes com valores observados em outros grupos de peixes (AMADO, 2008; LEÃO, 2009). Os valores observados para o aruanã branco podem ser considerados muito baixos. Somente com um trabalho incluindo um maior número de indivíduos de outras regiões e aumentando o número de *loci* poderemos sugerir se estes valores baixos podem estar associados a pesca predatória, ou se é o reflexo da biologia da espécie.

**Tabela 02.** Parâmetros de diversidade genética e Equilíbrio de Hardy-Weinberg. N= número amostral.

Populações	N	Média Diversidade Gênica	Média Nº de Alelos	Média da $H_O - H_E$
Tefé	18	0,3904 +/- 0,4165	3,1	0,2529 – 0,2944
Coari	12	0,3795 +/- 0,2633	3,0	0,1843 – 0,3459
Janauacá	11	0,2950 +/- 0,1981	2,3	0,2000 – 0,3541
Santarém	11	0,4220 +/- 0,2865	3,1	0,3439 – 0,3901
Total	52	0,3488 +/- 0,2264	2,9	0,2375– 0,3269

#### 4.4 Análise da Variância Molecular (AMOVA)

Os resultados da AMOVA global mostraram que a maior variação genética de aruanã é intrapopulacional, do que entre as populações caracterizando uma população panmítica (Tabela 03). O valor do  $F_{ST}$  para esta análise foi baixo e não significativo ( $F_{ST} = -0.00803$ ,  $P = 0.99$ ).

**Tabela 03.** Resultado da análise de variância molecular

Tipos de variantes	Componentes variantes	Porcentagem de variação
Entre populações	-0,00763	-0,87
Entre indivíduos dentro das populações	0,87989	100,87
Total	0,87226	

Desta maneira, como esperado, os valores para o índice de fixação ( $F_{ST}$ ) referente às comparações par a par entre as localidades amostradas, não mostraram ocorrência de populações geneticamente estruturadas. Os valores encontrados para o  $F_{ST}$  são inversamente proporcionais aos valores de  $Nm$ , ou seja, quanto maior número de migrantes os valores de  $F_{ST}$  foram menores, como pode ser mostrado na tabela 04. Estes resultados sugerem um alto fluxo gênico para o aruanã entre as localidades apresentadas nesse estudo.

Tais resultados são importantes do ponto de vista de possíveis projetos de manejo a serem realizados com a espécie, uma vez que com populações não diferenciadas geneticamente pode-se promover translocações dos animais entre diferentes áreas, e promover repovoamentos em regiões afetadas pela pesca predatória. Atividades como estas que evitariam o colapso da espécie.

Quanto aos níveis de endogamia, somente os indivíduos da população de Coari apresentaram nível alto e significativo valor do  $F_{IS}$  ( $F_{IS} = 0.41752$ ,  $P < 0.001$ ), o que pode estar caracterizando uma coleta feita com indivíduos mais relacionados.

**Tabela 04.** Valores de  $Nm$  (abaixo) e  $F_{ST}$  (acima).

	Tefé (1)	Coari (2)	Janauacá (3)	Santarém (4)
Tefé (1)	•	0,00009	0,00676	-0,00122

Coari (2)	5642,18182	•	0,00654	-0,02001
Janauacá (3)	73,46553	75,99030	•	0,01508
Santarém (4)	Infinito	Infinito	32,65979	•

---

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho foi pioneiro no estudo com marcadores microssatélites para *O. bicirrhosum*. Os seis *loci* estudados apresentam grande qualidade como marcadores moleculares, entretanto deve-se estudar a variabilidade de outros *loci* desenvolvidos para esta espécie para a confirmação e continuação deste trabalho. Adicionalmente deve-se incluir também outras localidades na bacia Amazônica. Nossas principais conclusões são:

- Os níveis de variabilidade genética observados no aruanã podem ser considerados baixos e heterogêneos entre as diferentes localidades amostradas;
- As populações de aruanãs analisadas não estão estruturadas geneticamente e formam uma única população panmítica;

Por fim, recomenda-se a continuação deste trabalho para confirmar os padrões observados e responder a outras questões genéticas, não só como os marcadores microssatélites, como os mitocondriais.

## 6. REFERÊNCIAS

AMADO, M. V. **Caracterização Genética de Populações do Peixe Ornamental Acará-Disco** (*Symphysodon* spp., **Cichlidae, Perciformes**), **Utilizando Marcadores Microsatélites**. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil. 174p. 2008.

ARAGÃO, L. P. Contribuição ao Estudo da Biologia do Aruanã, *Osteoglossum bicirrhosum* Vandelli 1829, Do Lago Janauaçã – Estado do Amazonas, Brasil. I - Desenvolvimento e Alimentação Larval (Osteichthys – Osteoglossiformes). **Ciência Agrônômica**. 17p. 1984.

BARTHEM, R. B. e FABRÉ, N. N. Biologia e Diversidade dos Recursos Pesqueiros da Amazônia. *In: A Pesca e os Recursos Pesqueiros na Amazônia Brasileira*. ProVárzea. 2004.

CALA, P. Presencia de *Osteoglossum* em los Ilanos (Orinoquia). **Acta Zool. Colombiana**. 8p. 1973.

BROWN, C. L. Raising the Silver Arowana (*Osteoglossum bicirrhosum*) **Center for Tropical and Subtropical Aquaculture Publication**. N 117. 1995.

BAYLEY, P.B. e PETRERE J. M. Amazon Fisheries: Assessment Methods, Current Status, and Management Options. Dodge, D.P. **Proceedings of the International Large River Symposium**: 385-398. 1989.

CUVIER, G. (Mar.) Le Règne Animal, distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée. Edition 2. **Règne Animal**. (ed. 2) v. 2. 1829.

EXCOFFIER, L., Laval, G., Schneider, S. Arlequin ver. 3.11: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** 1, 47-50. 2006.

FRANKHAM R, BALLOU JR, BRISCOE DA. Introduction to conservation genetics. Cambridge, UK: **Cambridge University Press**. 617p. 2002.

FRANKHAM R, BALLOU JR, BRISCOE DA. Fundamentos de Genética da Conservação. **SBG**, Ribeirão Preto, 280 p. 2008.

GOLDSTEIN D. B. e SCHLOTTERER C. Microsatellites: evolution and applications, p. 352. **Oxford University Press, New York, NY**. 1999.

GREENWOOD, P.H.; ROSEN, D.E.; WETZMAN, S.H. e MYERS, G.S. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** 131: 33-455. 1966.

HERDRICK, P. W. Recent Developments in Conservation Genetics. **Forest Ecology and Management**. 197: 3–19. 2004.

KANAZAWA, R. H. The fishes of the genus *Osteoglossum* with a description of a new species from the Rio Negro. **Ichthyol. Aquarium J.** v. 37 (no.4): 161-172. 1966.

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 microssatélites**. Dissertação de mestrado. INPA, Manaus, Brasil. 72p. 2009.

LI, G. Q. & WILSON, M. V. H. The Discovery of Heterotidae (Teleostei: Osteoglossidae) from the Paleocene Paskapoo Formation of Alberta, Canada. **J. Vert. Paleont.** 16: 198-209. 1996.

LIMA A.C.;PRANG G. A Exploração de Filhotes do Aruanã Preto (*Osteoglossum. Ferreirai*) e (*Osteoglossum bicirrhosum*)Aruanã Branco como Peixes Ornamentais no Médio Rio Negro. In Biologia, **Conservação e Manejo dos aruanãs na Amazônia Brasileira**. 2008.

LIU, Z. J. & CORDES J. F. DNA Marker Technologies and Their Applications in Aquaculture Genetics. . **Aquaculture**. 238 1-37. 2004.

NELSON, J. S. Fishes of the World. 3nd. **New York: John Wiley**. 1994.

PARKER, P. G., SNOW, A. A.; SCHUG, M. D.; BOOTON, G. C.; FUERST, P.A.. What molecules can tell us about populations: choosing using a molecular marker. **Ecology**, v. 79. n. 2, p.361-382. 1998.

PEREIRA, H. S, SOUZA D. S. R. e RAMOS M. M. A Diversidade da Pesca nas Comunidades da Área Focal do Projeto PIATAM. *In Comunidades Ribeirinhas Amazônicas - Modos de Vida e Uso dos Recursos Naturais*. 223p. 2007.

QUINN, T. W. Molecular Evolution of the Mitochondrial Genome. **Avian Molecular Evolution and Systematics**. Academic Press. pp.: 03-23. 1997.

RABELLO-NETO J. G. Biología Reprodutiva e Alimentação Natural do Aruanã Preto *O.ferreirai* (Kanazawa, 1966), no Município de Barcelos, Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil. **Monografia para o grau de Engenheiro de Pesca**. Departamento de Ciências Pesqueiras. Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil. 32p. 1999.

RABELLO-NETO J. G. A Exploração de Filhotes do Aruanã Preto (*Osteoglossum. ferreirai*) e (*Osteoglossum bicirrhosum*)Aruanã Branco como Peixes Ornamentais no Médio Rio Negro. In Biologia, **Conservação e Manejo dos aruanãs na Amazônia Brasileira**. 2008.

RICE, W.R., Analyzing tables of statistical tests. **Evolution** 43, 223-225. 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY. 1989.

SÁNCHEZ, C L e ALONSO, J C. **Evaluación ecológica y biología reproductiva de la Arawana en el parque Nacional Natural La Paya. Informe Inedito.** Instituto Sinchi. Puerto Leguízamo, Putumayo. 2003.

SCHWARTZ, H. W. & LEVY, D. *Osteoglossum*. The Arowana. **Tropical Fish Hobbyist**. March – 1968. 84-91. 1968.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotech.** 18: 233-234. 2000.

SILVA, F. R. e MONTAG, L. F. A. ETNOECOLOGIA DE Peixes em Comunidades Ribeirinhas da Floresta Nacional de Caxiuanã, Município de Melgaço – PA. **Estação Científica Ferreira Penna.** CZ0 – 002. 2003.

SILVA, T.J.; HRBEK T.; FARIAS I.P. Microsatellite markers for the silver arowana (*Osteoglossum bicirrhosum*, Osteoglossidae, Osteoglossiformes). **Molecular Ecology Resources.** in press. 2009.

SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J The use of microsatelites for genetic analyllis of natural populations – a critical review. In: DESALLE, R.; SCHIERWATER, B. **Molecular approaches to ecology and evolution.** Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1998.

TRIANAFYLLIDIS, A.; ABATZOPOULOS, T. J.; LEONARDOS J. and GUYOMARD, R. Microsatellite Analysis of the Genetic Population Structure of Native and Translocated Aristotle´s Catfish (*Silurus aristotelis*). **Aquatic Living Resources.** 15 351-359. 2002.

VIANA, J. P. A Pesca no Médio Solimões. *In:* A Pesca e os Recursos Pesqueiros na Amazônia Brasileira. **ProVárzea-IBAMA.** 2004.

YUE, G. H.; ONG, D.; LIM, L. C. and ORBAN, L. A Strain-specific and a Sex-associated STS Marker for Asian Arowana (*Sleropages formosus*, Osteoglossidae). **Aquaculture Research.** 34, 951-957. 2003.

WARD, R. D.; GRAVE, P. M. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In:  
**Molecular genetics in fisheries.** (Carvalho, G. R.; Pitcher, T.J.). p. 29-5. 1995