

**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

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral.....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	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
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	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
5. CONCLUSÃO	17
6. REFERÊNCIAS	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 microsatélites 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 microsatélite uma seqüência chamada de

cauda M13, marcado com fluorescência que possibilita a leitura no seqüenciador automático *MegaBACE*TM 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 MgCl₂ (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*TM 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 μ L de DNA para 99 μ L de água.

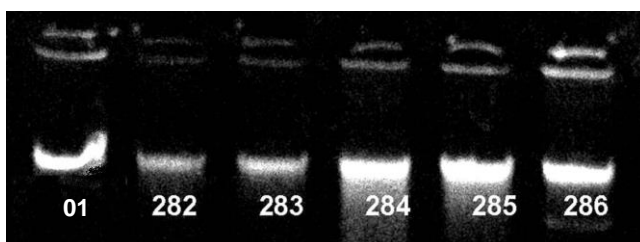


Figura 01. Quantificação da extração de DNA total de aruanã (*O. bicirrhosum*) em gel de agarose 0,8% (282, 283, 284, 285 e 286). A amostra (01) da esquerda para a direita corresponde a um marcador padrão de DNA (de peso molecular de 50 ng).

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 μ L de DNA amplificado para 49 μ L de água foi a mais satisfatória para que os produtos amplificados fossem genotipados (Figura 02).

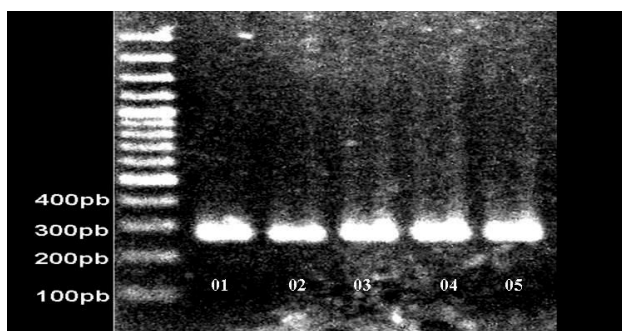


Figura 02. Quantificação de DNA de aruanã (*O. bicirrhosum*) amplificado (utilizando *primer* Ob_F01) via PCR em gel de agarose 1%. De acordo com a corrida deste gel o tamanho deste DNA amplificado pode variar de 266-272 pb (pares de bases). De acordo com o marcador de 100 pb, as bandas dos produtos 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.

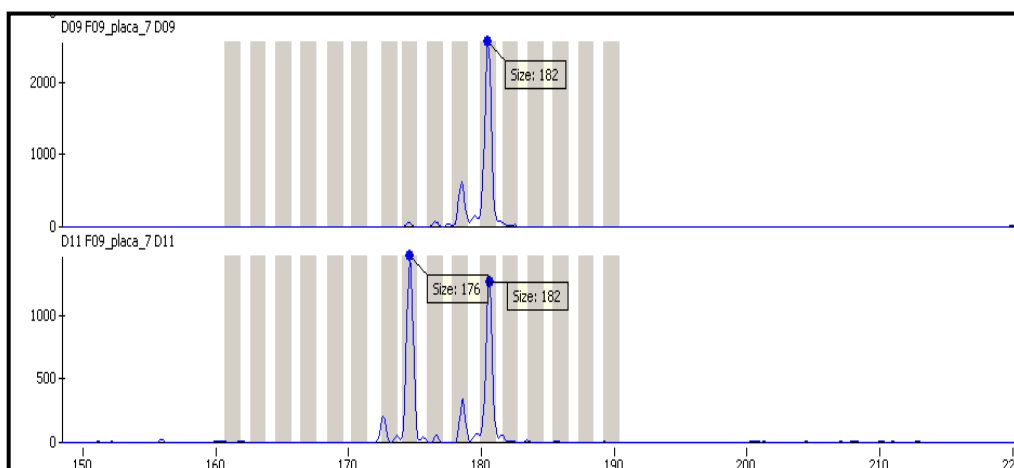


Figura 03. Genotipagem de dois indivíduos de aruanã (*O. bicirrhosum*) da localidade de Janauacá. (D09 – indivíduo homozigoto) e (D11 – indivíduo heterozigoto) com *primer* (Ob_F09) analisada no programa *Fragment Profiler*.

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
Tefé	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
Coari	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
Janauacá	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
Santarém	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
Todos	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**. 2nd 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