

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS-UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas*
(Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-
Araguaia, Estado do Mato Grosso**

Débora Karla Silvestre Marques

SÃO CARLOS – SP

- 2003 -

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS-UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier)
(Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-Araguaia, estado
do Mato Grosso**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução 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 em Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP

-2003-

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M357cg

Marques, Débora karla Silvestre.

Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-Araguaia, estado do Mato Grosso / Débora Karla Silvestre Marques . -- São Carlos : UFSCar, 2003.
66 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Peixe. 2. Pirarucu (peixe). 3. *Arapaima*. 4. Citogenética. 5. RAPD. 6. Conservação. I. Título.

CDD: 597 (20^a)

Orientador

**Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti
Junior**

Co-orientador

Prof. Dr. Paulo Cesar Venere

Trabalho realizado com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa concedida.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela formação fornecida no decorrer do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro concedido.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior, pela amizade e pela orientação concedida, enfatizando sempre a competência para o sucesso futuro de seus alunos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo Cesar Venere, também pela amizade e pela orientação concedida, cujo apoio foi um importante fator na elaboração do presente trabalho.

Ao Sr. Ladislau Cristino Cortes *in memoriam*, proprietário da Fazenda Lago, onde foram realizadas as coletas de peixes, pelo apoio em campo e extremo interesse na realização do presente estudo.

Ao Laboratório de Citogenética de Peixes da UFSCar e ao Departamento de Ciências e Letras do Médio Araguaia, Campus avançado da Universidade Federal do Mato Grosso (ICLMA/UFMT) pelas condições em termos de formação e infra-estrutura fornecidas durante a realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Luís Antônio Carlos Bertollo e Orlando Moreira Filho, pela amizade e também orientação, que estão sempre disponíveis nos momentos que precisamos.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética de Peixes da UFSCar, cujas experiências foram sempre intercambiadas, construindo elos de amizade e respeito em todos que passam por este laboratório.

Em especial aos meus amigos Débora, Paulo, Alexandra e Ana Carina, pela amizade, pelas contribuições científicas e pelos momentos felizes que nos deram ânimo para continuar.

Aos amigos, muito queridos, do Departamento de Ciências e Letras do Médio Araguaia, Campus avançado da Universidade Federal do Mato Grosso (ICLMA/UFMT), cujo apoio foi fundamental para a realização do presente trabalho.

A Embrapa Pantanal pelo apoio e estímulo ao aperfeiçoamento profissional, que facilitaram os passos finais de elaboração deste estudo.

Aos amigos Issakar e Paulo Afonso, pela amizade, apoio e sempre disponibilidade em transferir conhecimentos foram importantes nos momentos que necessitaram de mais atenção na realização do presente trabalho.

Às amigas da Secretaria de Pós-Graduação por todo apoio, sem o qual tudo teria ficado mais difícil.

À amiga Renata Daniella Vargas, pela amizade, apoio e conversas sempre animadas.

Aos amigos Sandra Santos e Agostinho C. Catella pela correção séria dos textos da tese.

Às amigas Regina Célia e Cibele Orsini pela imensa ajuda e todo apoio concedido.

A minha mãe Iraci, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos.

Um agradecimento especial ao meu esposo Luciano e ao nosso filho Gabriel, a quem amo muito, por estarem na minha vida, tornando-a mais bonita, mais iluminada e mais colorida. Eles me dão a certeza de que tudo que faço não é em vão.

TABELAS

- Tabela I – Números cromossômicos observados em *Arapaima gigas* do Médio Araguaia/MT. A tabela mostra o número de metáfases por indivíduo por números cromossômicos encontrados. 2n (número diplóide). M (machos). F (fêmeas)..... **página 32**
- Tabela II: Seqüências dos primers testados e características dos produtos de amplificação..... **página 35**
- Tabela III: Comparação estatística entre os coeficientes de similaridade de Jaccard obtidos para cada *primer* e por ano de coleta (1999 e 2000) (teste Kruskal-Wallis: KW= 1,0472, P=0.3062)..... **página 38**
- Tabela IV: Medidas de identidade genética e distância genética de Nei (Nei, 1972) entre os anos de coleta. Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal)..... **página 38**
- Tabela V: Teste de homogeneidade (X^2) para as freqüências gênicas das amostras 1999+2000. * significa as freqüências alélicas significativamente diferentes entre os indivíduos das amostragem..... **página 40**

FIGURAS

- Figura 1: Pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier), coletado no médio Araguaia, município de Araguaia/MT **página 20**
- Figura 2:a)Lagoa onde foi realizada a coleta de 1999; b) Lagoa onde foi realizada a coleta de 2000 e que recebe os peixes provenientes da primeira lagoa; c) Tanque utilizado para transporte de peixes **página 21**
- Figura 3: Cariótipo de *Arapaima gigas* do rio Araguaia, composto por 28 cromossomos meta/submetacêntricos e 28 cromossomos subtelo/acrocêntricos. Em destaque, os cromossomos portadores de constrição secundária **página 32**
- Figura 4: a) Metáfase mostrando os cromossomos portadores de RON através da impregnação por nitrato de prata; b, c) FISH como sonda de rDNA 18S mostrando somente um par de cromossomos portador de RON e diferença de tamanho das RONs; d) Metáfase mostrando blocos centroméricos de heterocromatina constitutiva..... **página 33**
- Figura 5: Padrão RAPD-PCR em *Arapaima gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer C. m=marcador 1 Kb A=aruanã **página 36**
- Figura 6: Padrão RAPD-PCR em *Arapaima gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer 2. m=marcador 1 Kb A=aruanã..... **página 36**
- Figura 7: Padrão RAPD-PCR em *Arapaima gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer 3. m=marcador 1 Kb A=aruanã..... **página 36**
- Figura 8: Padrão RAPD-PCR em *Arapaima gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer 4. m=marcador 1 Kb A=aruanã..... **página 36**
- Figura 9: Padrão RAPD-PCR em *Arapaima gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer 5. m=marcador 1 Kb A=aruanã..... **página 37**
- Figura 10: Padrão RAPD-PCR em *Arapaima gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer 6. m=marcador 1 Kb A=aruanã **página 37**

Figura 11: Dendograma baseado no Coeficiente de Jaccard pelo método UPGMA para a amostragem total (1999+2000) de *Arapaima gigas* da região do médio Araguaia (todos os primers). As letras de “a” a “r” correspondem à amostra coletada em 1999. As letras de “s” a “y” correspondem à amostra coletada em 2000 **página 39**

RESUMO

Os Osteoglossiformes são representados na América do Sul pelos gêneros *Arapaima* e *Osteoglossum*, que ocorrem particularmente na região Amazônica, nas bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia. Os estudos genéticos neste grupo são praticamente inexistentes, evidenciando a necessidade de informações para programas de conservação. A espécie *Arapaima gigas* da bacia hidrográfica Tocantins-Araguaia apresentou um $2n=56$ cromossomos, com fórmula cariotípica $28M/SM+28ST/A$. A marcação por nitrato de prata evidenciou uma RON simples localizada intersticialmente no braço curto do par três, confirmada pela hibridação fluorescente *in situ* com sonda de rDNA 18S, que evidenciou um polimorfismo de tamanho nos sítios de RON. A heterocromatina constitutiva foi localizada na região centromérica de todos os cromossomos. Os estudos genéticos moleculares com marcador RAPD evidenciaram a ocorrência de uma única população de *Arapaima gigas* na região de coleta, com variabilidade intrapopulacional significativa. Os resultados obtidos no presente trabalho são contribuições importantes para o conhecimento da genética da espécie *Arapaima gigas* e do grupo Osteoglossiformes, fornecendo, ainda, subsídios para programas de manejo e conservação genética da espécie *Arapaima gigas* no Médio Araguaia, estado do Mato Grosso, Brasil.

SUMMARY

In South America the osteoglossiforms are represented by the Arapaima and the Osteoglossum sorts, which are mostly found in the Amazonic basin, Tocantins – Araguaia. There are virtually no genetic studies on this group, which highlights conservation groups' need for information. The Arapaima gigas species, of the hydrographic basin Tocantins – Araguaia, showed a $2n=56$ chromosomes, with cariotypal formula: $28M/SM+28ST/A$. Silver nitrate marking revealed a simple RON, located interstitially in the shorter arm of pair three, confirmed by a fluorescent hybridation *in situ*, with a rDNA 18S probe, that highlighted a polymorphism in the RON sites. The constituent heterochromatin was found in the centromerical region of all chromosomes. The molecular genetic studies with RAPD marker showed the presence of only one Arapaima gigas population, with a significant intrapopulational variation. The results obtained in this work are an important contribution to the understanding of the genetics of the Arapaima gigas species and the Osteoglossiforms group, providing, moreover, subsidies for genetic handling and conservation of the Arapaima gigas species in the Médio Araguaia, state of Mato Grosso do Sul, Brazil.

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO	01
Osteoglossiformes	06
Área de estudo.....	09
2 - OBJETIVOS	11
3 – MATERIAL E MÉTODOS	12
Local de coleta	12
3.1 – PREPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS MITÓTICOS	12
Cultura de células de tecido sangüíneo	12
Preparações de culturas de curta duração a partir de suspensão celular	13
Determinação do número diplóide e fórmula cariotípica.....	14
3.2 – DETECÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS (RONs)	14
Impregnação com Nitrato de Prata (AgRON)	14
Hibridação in situ fluorescente com sondas de rDNA 18S e 5S	15
3.3 – DETECÇÃO DE HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA (BANDAMENTO C)	18
3.4 – EXTRAÇÃO DE DNA	21
Extração de DNA a partir de tecido sangüíneo	21
Extração de DNA a partir de tecido sólido.....	22
3.5 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO (PCR-RAPD)	23

Ensaio RAPD	23
Análise dos resultados.....	24
4 – RESULTADOS	24
Caracterização citogenética	24
Caracterização molecular.....	24
5 – DISCUSSÃO	26
Caracterização citogenética	26
Caracterização molecular.....	31
6 – CONCLUSÕES	35
7 – REFERÊNCIAS	36

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - *Utilização dos Recursos Pesqueiros*

A manutenção e a conservação dos recursos naturais são preocupações de abrangência mundial e resultam em interesses sociais, políticos e científicos voltados para as questões ambientais. Como consequência, atualmente a meta é o uso sustentável desses recursos, com base em pesquisas detalhadas dos seus diversos aspectos biológicos.

Atualmente, não se pensa mais em recursos naturais como simples fontes de benefícios, mas também como unidades que possuem características particulares, que devem ser consideradas no planejamento do seu uso. Populações individuais diferem significativamente em suas características biológicas, incluindo recrutamento e mortalidade de indivíduos, como respostas à exploração e requerendo, portanto, manejos diferenciados (Ferguson *et al.*, 1995).

Segundo Ryman (1991), a habilidade de uma população para se adaptar a um determinado ambiente é inteiramente dependente de suas características genéticas - os alelos que ela carrega, suas combinações e suas frequências. Portanto, ao se estudar duas populações distintas de uma mesma espécie, situadas simpatricamente ou alopatricamente, pode-se esperar encontrar diferenças genéticas ou de padrões comportamentais e fisiológicos, que são adaptações ao ambiente em que ocorrem. Duas populações geneticamente isoladas, por motivos geográficos ou ecológicos, tendem a acumular diferentes alelos, em consequência de seleção, mutação ou deriva genética (Barker, 1994). Assim, quando há um interesse voltado para a conservação de estoques naturais, inicialmente deve-se ter uma preocupação com a manutenção das características ecológicas das espécies ou populações envolvidas no processo.

No mundo inteiro, uma das características da exploração dos recursos pesqueiros é o extrativismo, ou seja, a exploração sem reposição dos recursos naturais. Portanto, em regiões onde a pesca é economicamente indispensável, os problemas de impacto ambiental por esta atividade têm gerado uma série de impasses sócio-econômicos e ecológicos.

A conservação genética de populações naturais e de recursos genéticos animais visa fornecer as bases para as decisões racionais concernentes à conservação da biodiversidade (Barker, 1994). Essas decisões racionais estão normalmente inseridas em programas de manejo de recursos de interesse econômico e, mais raramente, de interesse puramente ecológico. O manejo científico de pescarias implica que a taxonomia, ecologia e distribuição das populações de peixes sejam conhecidas; que dados confiáveis de captura sejam registrados anualmente; que haja uma expectativa realística de qual lista de peixes é proposta para a economia e dieta da região; e que haja uma infraestrutura burocrática capaz de forçar a legislação desejada (Goulding, 1983).

Manejo de recursos naturais é o gerenciamento ou administração por meio de leis, decretos e resoluções. A pesca é especialmente enfocada na tomada de medidas de normatização em planos de manejo. Essas medidas visam a promoção do uso racional dos recursos pesqueiros, uma vez que a sobre-pesca é uma das maiores razões da redução em tamanho das populações selvagens de peixes. Quando se planeja o manejo de estoques pesqueiros, geralmente se adota alguma das seguintes opções: limitar acesso às áreas pesqueiras (zoneamento); restringir o uso de determinados aparelhos de pesca; controlar ou limitar o tamanho da malha das redes de pesca; proibir a pesca em estações definidas (defeso); controlar o esforço de pesca por meio de cotas e licenças para barcos de pesca e criar reservas em que se proíba a pesca ou esta seja limitada à pesca de subsistência (Bayley, 1981; Ribeiro e Petreire Jr., 1990; Petreire Jr., 1992). Essas medidas devem ter suporte científico para serem aplicadas com sucesso, uma vez que por meio das pesquisas as variáveis nas populações alvos tornam-se bem conhecidas (Barthem *et al.*, 1997).

Uma das metas finais dos planos de manejo de recursos naturais é a condução do desenvolvimento econômico-regional de forma a garantir a continuidade dos recursos naturais para usos futuros, promovendo o “uso sustentável” e levando ao “desenvolvimento sustentável”, que tem sido tópico obrigatório nos projetos políticos, econômicos e científicos. De acordo com Mattos *et al.* (2000) o desenvolvimento e o meio ambiente estão, indissolúvelmente vinculados e devem ser tratados mediante a mudança do conteúdo, das modalidades e das utilizações do crescimento, seguindo três critérios fundamentais, simultaneamente: equidade social, prudência ecológica e

eficiência econômica. O desenvolvimento sustentável envolve a maximização dos benefícios líquidos do desenvolvimento econômico, sujeito a manter os serviços e a qualidade dos recursos naturais ao longo do tempo (Pearce e Turner, 1991).

Segundo Mattos *et al.* (2000) o desenvolvimento sustentável envolverá, primordialmente, mudanças estruturais dentro da sociedade e da economia, mantendo os serviços e a qualidade da ação de recursos com o passar do tempo, implicando a aceitação de (a) utilização dos recursos renováveis com taxas menores ou iguais à taxa natural de regeneração e (b) otimização da eficiência dos recursos não renováveis utilizados, sujeito à substituição desses recursos por novas tecnologias.

Portanto, para haver um desenvolvimento sustentável é preciso que o crescimento seja definido de acordo com a capacidade de suporte dos ecossistemas. A utilização planejada dos recursos naturais é fundamentalmente ecológica e econômica, constituindo um aspecto positivo, pois abrange a preservação, manutenção, utilização sustentável, restauração e melhoria do ambiente natural (FAO,1971).

1.2 - Osteoglossiformes

Os Osteoglossiformes atuais são peixes predominantemente de água doce, que ocorrem na Índia e África (*Notopterus*, *Papyrocranus*, *Xenomystus*, *Clupsudis*, *Gymnarchus* e *Pantondon*), região Indo-Australiana (*Scleropages*), América do Sul (*Arapaima* e *Osteoglossum*) e América do Norte (*Hiodon*) (Greenwood *et al.*, 1966). A ampla distribuição geográfica dos Osteoglossiformes e as características que levam este grupo à posição basal na classificação geral dos peixes, como descrito por Greenwood *et al.* (1966), Patterson e Rosen (1977), Lê *et al.* (1993) e Nelson (1994), acentuam o interesse para a sua sistemática e evolução. Este grupo tem sido utilizado para comparações em estudos filogenéticos por autores como Greenwood *et al.* (1966), Patterson e Rosen (1977), Lê *et al.* (1993), Nelson (1994), Cavin e Forey (2001), Inoue *et al.* (2001), Elmerot *et al.* (2002) e Obermiller e Pfeiler (2003).

Este grupo de peixes também tem sido alvo de muito interesse para

estudos bioquímicos. Isaacks *et al.* (1977) e Val *et al.* (1992) registraram a presença de inositol pentafosfato (IPP) como principal modulador da afinidade hemoglobina-oxigênio nos eritrócitos de pirarucu. Val *et al.* (1992), observaram as variações nos níveis de IPP em eritrócitos durante o crescimento de exemplares no primeiro ano de vida. Hochachka *et al.* (1979), encontraram variações nos mecanismos de transporte de oxigênio em brânquias dos osteoglossídeos *Arapaima gigas*, cuja respiração depende obrigatoriamente do ar atmosférico, e *Osteoglossum bicirrhosum* que respira obrigatoriamente pelas brânquias. Os autores compararam, nestas duas espécies, os ciclos malato-aspartato e α -glicerofosfato (α -GP) e registraram que, comparado ao ciclo α -glicerofosfato, o ciclo malato aspartato foi relativamente mais ativo em pirarucu que no aruanã.

Diferentes aspectos morfológicos dos osteoglossiformes têm sido estudados. Pinese (1996) explicou que as características morfológicas do sistema digestivo de *Arapaima gigas* levam aparentemente à dedução de uma origem filtradora, apesar de seu hábito restritamente piscívoro. Emde e Prechtl (1999) encontraram conexões entre as áreas do telencélo dorsal correspondentes à audição e à linha lateral em *Gnathonemus petersii*.

Alguns estudos comparativos têm sido feitos utilizando características anatômicas em osteoglossiformes. Cavin e Forey (2001) a partir de descrições dos ossos do crânio de *Palaeonotopterus greenwoodi* encontraram relações de semelhanças deste peixe com notopterídeos e mormiroídeos. Sanford Fls (2001) comparou a estrutura da língua óssea, uma das principais características de osteoglossiformes, entre *Xenomystus nigri* e *Chitala ornata* (família Notopteridae).

A genética de Osteoglossiformes, entretanto, ainda é pouco conhecida. Nayyar (1965) registrou um número diplóide igual a 48 cromossomos (12M+36A) para duas espécies da família Notopteridae, *N. notopterus* e *N. chitala*. Entretanto, Akinori e Yoshio (1998) encontraram número diplóide de 42 cromossomos acrocêntricos na espécie *Notopterus chitala*. Ojima *et al.* (1976) registraram um $2n=56$ (1SM+1ST+54A). para *Osteoglossum bicirrhosum*.

Farias *et al* (2003) realizaram estudos em *Arapaima gigas* utilizando 14 marcadores moleculares de microssatélites para determinar níveis de

variabilidade genética das populações da bacia amazônica e registraram um alto nível de variabilidade intra-populacional, o que significa, segundo os autores, que a população estudada tem condições genéticas satisfatórias para se manter no ambiente.

A ordem Osteoglossiformes abrange seis famílias, 29 gêneros e cerca de 217 espécies (Nelson, 1994). Na América do Sul são encontrados os gêneros *Arapaima* e *Osteoglossum*, que ocorrem na região Amazônica, nas bacias Amazônica e Tocantins- Araguaia. Nelson (1994) descreveu o gênero *Arapaima* dentre os quatro gêneros da família Osteoglossidae, modificando a classificação proposta por Fowler (1948), que situou a espécie *Arapaima gigas* (Cuvier) como único representante da família Arapaimidae.

O pirarucu, *Arapaima gigas*, está entre as espécies de maior porte dos peixes primários de água doce. Por essa característica, este peixe despertou grande interesse para a exploração pesqueira, tornando-se, segundo Goulding (1983), a primeira base econômica pesqueira de considerável escala na região amazônica, em parte, em virtude da crença na super-abundância de seus estoques.

Menezes (1951) ressaltou o valor do pirarucu na economia nacional e a necessidade de sua proteção e do aperfeiçoamento dos métodos para sua industrialização. Esse autor cita, ainda, o trabalho pioneiro de criação desse peixe em cativeiro, no Brasil, realizado em 1935, no Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém, Pará). Desde a década de 40, essa espécie vem sendo introduzida em açudes localizados em estados do Nordeste brasileiro, visando a sua manutenção e propagação em cativeiro.

A tentativa de entender a biologia do pirarucu foi iniciada pelos estudos de Gudger (1943) e Fontenele (1948), que descreveram alguns dos aspectos biológicos, tais como hábito alimentar, padrão reprodutivo e comportamental deste peixe.

O pirarucu realiza desova parcelada e apresenta baixa fecundidade, que é compensada pelos cuidados dispensados à prole, evitando a predação da ninhada por outros peixes (Fontenele, 1948). Uma das características mais notáveis deste peixe é a de que cerca de 90% do oxigênio de que necessita é adquirido por respiração aérea pela bexiga natatória.

Pinese (1996) descreveu o pirarucu como presumivelmente de origem filtradora, apresentando padrões anatômicos característicos de animais onívoros ou até filtradores. Entretanto, o pirarucu é essencialmente piscívoro (Fontenele, 1948; Menezes, 1951; Pinese e Peret, 2001). Assim, seu hábito alimentar reforça uma importância ecológica além da econômica, já que espécies predadoras participam do equilíbrio ambiental como reguladoras das populações de outras espécies. De acordo com Nikolsky (1976), os peixes carnívoros constituem elementos que aumentam a estabilidade do ecossistema, na medida em que regulam a abundância de diferentes espécies forrageiras.

A morfologia desse peixe foi estudada por autores como Greenwood e Liem (1984), Meunier (1984), Tsuneki (1986) e Saidel e Bradford (1987). Estudos do crescimento de *Arapaima gigas* foram realizados por Wosnitzamendo (1984) e Honczaryk e Maeda (1998). Muitos aspectos bioquímicos desta espécie são bem conhecidos (Isaacks *et al.*, 1977; Fields *et al.*, 1978; Galdamesportus *et al.*, 1979; Val *et al.*, 1992 e West *et al.*, 1999).

A espécie *Arapaima gigas* tem o tamanho mínimo de captura definido em 150 cm na Bacia Amazônica (Portaria do IBAMA Nº 08/96), nas bacias dos rios Araguaia e Tocantins (Portaria IBAMA Nº 107/98) e no trecho entre as cabeceiras do rio Araguaia em Goiás até a altura do município de Antonico Rosa em Mato Grosso e o Parque Nacional do Araguaia em Tocantins (Portaria IBAMA Nº 106/98). O período de defeso desta espécie vai de outubro a março nos rios Araguaia e Tocantins (Portaria IBAMA Nº 480/91) (www.ibama.gov.br).

1.3 - A bacia Tocantins-Araguaia

O rio Araguaia nasce no limite sul da divisa entre os estados de Mato Grosso e Goiás. Próximo a essa região partem duas grandes bacias hidrográficas brasileiras: a bacia Paraná-Paraguai, cujos primeiros afluentes correm rumo ao sul do continente e uma das mais importantes bacias do Brasil, a bacia Tocantins-Araguaia.

Segundo Borges (1987), menos de 30 km de chapadões da Serra dos Caiapós separam muitos dos pequenos afluentes com destino norte e sul. As nascentes do rio Araguaia situam-se nesta mesma serra, na divisa entre os

estados de Mato Grosso e Goiás, a cerca de 850 m de altitude, dirigindo-se ao norte, num percurso quase paralelo ao rio Tocantins, no qual deságua. Sua extensão total atinge 2.115 km (Innocencio, 1989) e suas águas são relativamente calmas, diferentes daquelas que caracterizam grande parte do rio Tocantins, antes da confluência. Estes dois grandes sistemas hidrográficos são geralmente considerados, por muitos ictiologistas, como a grande bacia Tocantins-Araguaia.

As margens do rio Araguaia, na altura do município de Araguaiana (Mato Grosso), correspondente à região do Médio Araguaia, são sazonalmente sujeitas a inundações, facilitando a invasão das diversas espécies de peixes da região em novos habitats nos campos alagados, com maior fornecimento de alimento e proteção. Ao secar, há a formação de lagoas nas quais fica retida boa parte das populações de peixes. No entanto, na nova estação de cheias, os sobreviventes têm acesso a um novo aporte de água e alimento. Essa dinâmica certamente influencia a ecologia das diversas espécies animais da região. Particularmente as populações de peixes respondem a estas variações com flutuações na sua estrutura quanto à alimentação, estratégias de reprodução, crescimento em número de indivíduos devido à estação de reprodução e estrutura genética.

1.4 - Estudos citogenéticos de peixes

A citogenética tem gerado resultados importantes na compreensão das relações de parentesco entre ou dentro de diferentes ordens, famílias e gêneros de peixes. Em peixes há registros de grande número de variações cromossômicas que significam, em parte, a adaptabilidade das espécies aos diferentes ambientes onde ocorrem.

Oliveira *et al.* (1998), em revisão, listaram as fórmulas cariotípicas de 433 espécies de peixes neotropicais de água doce e observaram que destas, 11,3% apresentam variações no número de cromossomos, 5,8% tem cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados e 2,3% tem cromossomos supranumerários.

Segundo Galetti *et al.* (1994), de forma geral, dois padrões de diversificação cromossômica podem ser verificados em Characiformes. Gêneros

como *Hoplias* e *Astyanax* mostram um padrão heterogêneo de diversificação cromossômica, caracterizado por extensa variação numérica e estrutural dos cromossomos. Num segundo grupo estão aquelas famílias que mostram uma acentuada constância na macroestrutura cariotípica, tais como Anostomidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Chilodontidae, Hemiodontidae e Parodontidae.

Há registros de conservadorismo cariotípico em Siluriformes da família Pimelodidae, nas espécies *Pimelodus maculatus*, *P. fur* e *Pimelodus* sp. nas quais o $2n=56$ e a fórmula cariotípica é $30M+14SM+12 A$ (Toledo e Ferrari, 1976). Entretanto, Oliveira *et al.* (1988) descreveram nesta ordem de peixes uma variação de números diplóides de 22 a 102, com maior freqüência de $2n=58$. Os autores sugeriram que as mudanças cromossômicas foram freqüentemente associadas com processos de especiação.

Segundo Nelson (1994), sob o ponto de vista morfológico, a ordem Perciformes é a mais diversificada de todas as ordens de peixes. Entretanto, essa diversidade não se reflete no complemento cromossômico das espécies do grupo. Molina e Galetti Jr. (2002), por exemplo, afirmaram que a maioria das espécies de Pomacentridae mostram preferencialmente cariótipos conservados de 48 cromossomos, com diferenças na fórmula (Número Fundamental igual a 48-90). Estes autores, entretanto, registram variações no número diplóide de três espécies dessa família coletadas na região costeira dos estados da Bahia e Espírito Santo, onde a espécie *Chromis multilineata* tem $2n=48$ cromossomos acrocêntricos, *C. flavicauda* tem $2n=38$ ($9M+6SM+38 A$) e *C. insolata* apresentou dois citótipos de $2n=46$ ($4M+6SM+36 A$) e $2n=47$ ($3M+6SM+38 A$). Os autores atribuíram essa variedade cariotípica a rearranjos Robertsonianos.

Feldberg *et al.* (1999) também encontraram algumas diferenças cariotípicas em duas espécies de Perciformes. A espécie *Plagioscion squamisissimus* apresentou um número diplóide de 48 cromossomos acrocêntricos. Em *Plagioscion* sp. foram registrados dois citótipos. O citótipo a com 48 cromossomos ($2M+46 A$) e o citótipo b com 48 cromossomos acrocêntricos. Os autores acreditam que o surgimento do citótipo "a" se deu a partir do citótipo "b" por inversões pericêntricas. Os autores sugerem, ainda, que atualmente ambos os citótipos podem corresponder a duas espécies crípticas, com mesma morfologia e distribuição geográfica, mas geneticamente distintas.

1.5 - *Genética molecular de peixes*

Uma das metas dos estudos baseados em marcadores moleculares é a reconstrução do padrão evolutivo de uma dada espécie ou de uma determinada população, que segundo Eizirik (1996) está bastante ligada à determinação de prioridades para a conservação biológica. O autor ressaltou que a reconstrução do padrão evolutivo intra-específico é também de grande importância para a determinação de estratégias adequadas para a conservação biológica, pois permite a identificação de estrutura geográfica e subdivisões populacionais históricas e/ou atuais em espécies ameaçadas.

Trabalhar com marcadores genéticos significa utilizar características herdáveis em indivíduos de uma dada população, considerando que todos os marcadores refletem diferenças nas seqüências de DNA (Sunnucks, 2000). Variantes genéticas podem ser aplicadas como marcadores para estudos em populações de peixes, na identificação de espécies e de híbridos, estabelecimento da filogenia ou da história filogeográfica de populações e espécies, medida do nível de variação genética em populações cultivadas e selvagens, determinação do impacto da introdução de indivíduos de populações cultivadas em populações selvagens (Ferguson *et al.*, 1995).

Os marcadores uniloco são caracteristicamente co-dominantes, ou seja, em um indivíduo diplóide, ambos os alelos de um determinado loco são identificados, o que os torna altamente informativos. São marcadores uniloco os RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e as seqüências de DNA repetitivo minissatélites e microssatélites. Os marcadores multiloco permitem a visualização de muitos genes anônimos simultaneamente. Entretanto, sua característica dominante, onde somente um dos alelos é identificado, torna-os pouco informativos. No entanto, esses marcadores, tais como RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), são largamente utilizados em estudos populacionais, pois, com base em eventos recentes, permitem a inferência de relações de parentesco entre indivíduos de uma dada população e da história de divergência entre populações de uma mesma espécie.

Os estudos moleculares acerca das variações genéticas nas diversas espécies animais e vegetais tiveram início com o desenvolvimento da

eletroforese, nos anos 50, quando poucas marcas uni-loco foram descobertas (Parker *et al.*, 1998). Sua base está na migração diferenciada de moléculas com cargas diferentes quando submetidas a um campo elétrico. As pesquisas nesse campo fundamentam-se nas múltiplas formas moleculares (alélicas) da mesma enzima (isoenzimas) que ocorrem em uma espécie e que desempenham, portanto, a mesma atividade catalítica, mas que podem ter diferentes propriedades cinéticas (Ferreira e Grattapaglia, 1995), podendo-se inferir que as diferenças apresentadas entre as isoenzimas sejam resultantes de diferenças ao nível das seqüências de DNA que as codificam.

Uma das vantagens técnicas deste marcador é a expressão co-dominante das bandas geradas em gel de eletroforese. Para interpretação do padrão de bandas é necessário o conhecimento da estrutura quaternária da enzima. Assim, uma enzima monomérica (constituída por uma única cadeia polipeptídica) apresentará duas bandas no heterozigoto, uma enzima dimérica (formada pela união de duas cadeias polipeptídicas) apresentará três bandas no heterozigoto e uma enzima tetramérica apresentará cinco (Solferini e Scheepmarker, 2001).

As enzimas têm sido usadas em pesquisas de biologia evolutiva principalmente através do estudo detalhado de um loco e as suas variantes alélicas (alozimas) e a utilização de muitos locos para estudos populacionais. Lembrando, entretanto, que mutações no material genético nem sempre levam a alterações na estrutura protéica e nem toda alteração na seqüência de aminoácidos provoca diferenças na mobilidade eletroforética, de forma que os níveis de variabilidade podem ser subestimados (Solferini e Scheepmarker, 2001). Toledo Filho *et al.* (1992) consideraram que a eletroforese de proteínas é a mais aconselhada para o monitoramento de estoques de peixes em projetos de repovoamento, pois constitui uma das técnicas mais eficientes para a análise genética de populações de peixes. As proteínas também têm sido utilizadas em estudos de filogenia (Tringali *et al.*, 1999) e variabilidade de populações de peixes (Calcagnotto e Toledo-Filho, 2000). Entretanto, para Sunnucks (2000) este marcador molecular revela pequenas variações e gera informações genealógicas limitadas. O autor ressalta, portanto, as vantagens do uso de DNA para estudos em populações.

Ao contrário de marcadores enzimáticos, o DNA pode ser extraído de tecidos fixados por tempo ilimitado e permite a visualização direta das variações

ocorridas no genoma individual. Outra vantagem surgiu com o uso da reação em cadeia da enzima polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) permitindo a amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos, resolvendo os problemas relacionados à quantidade de DNA a ser utilizado nas reações em laboratório.

Segundo Matioli e Passos-Bueno (2001) a concepção inicial da técnica da PCR foi de Kary Mullis, um bioquímico que trabalhava com síntese química de oligonucleotídeos em uma firma biotecnológica da Califórnia, a Cetus Corporation. A PCR consiste, basicamente, na repetição *in vitro* dos ciclos de duplicação da fita de DNA, já conhecidos através dos estudos de biologia molecular possibilitando a amplificação exponencial de segmentos de DNA flanqueados por seqüências iniciadoras (*primers*). A técnica consiste em submeter uma mistura de *primers*, tampões, nucleotídeos, enzima polimerase e o DNA de interesse a uma seqüência de cerca de 35 ciclos de variações de temperatura ótima para o pareamento dos *primers* (variando conforme a seqüência e o tamanho do *primer* utilizado) e para a extensão do segmento a ser amplificado. Os produtos da amplificação podem ser visualizados diretamente em gel de agarose ou poliacrilamida.

No uso de RFLP, as variações (polimorfismos) apresentadas são baseadas na aceitação de que o sítio de corte de uma mesma enzima encontra-se em diferentes pontos do DNA de indivíduos diferentes. Assim, não é necessário o conhecimento prévio das seqüências de DNA a serem utilizadas e isto constitui uma das vantagens observadas neste método. As variações são explicadas pela diferença entre os tamanhos dos fragmentos gerados pela digestão com enzimas escolhidas pela especificidade dos seus sítios de corte (chamadas enzimas de restrição). Se há a segregação Mendeliana de tais fragmentos, conclui-se que elas representam um loco de RFLP e, portanto, podem ser utilizadas como marcador genético (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Uma característica importante do marcador RFLP é sua expressão co-dominante, que o torna vantajoso para estudos de segregação alélica, estimativa da variabilidade genética populacional e geração de árvores filogenéticas.

O uso mais amplo para as enzimas de restrição nos estudos de população tem sido o estudo da diversidade alélica e diferenciação de populações em DNA mitocondrial, onde a freqüência alélica pode ser quantificada pela presença ou ausência de sítios de restrição entre os indivíduos

(Parker *et al.*, 1998). Os autores explicam que grandes moléculas como DNA nuclear não podem ser analisadas pelo uso direto de enzimas de restrição devido à grande quantidade de sítios de clivagem enzimática, gerando padrões de bandas de difícil interpretação. Este problema é solucionado com o uso da técnica de hibridização em membrana, após eletroforese, com sondas que consistem de seqüências complementares aos segmentos de interesse.

RFLP tem sido aplicado com sucesso em estudos de populações de peixes, na determinação de variações genéticas (O'Connell *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 2000), avaliação de impacto da introdução de indivíduos de cativeiro em populações selvagens (Ferguson *et al.*, 1995; Clifford *et al.*, 1998) e filogenia (Michael e Phillips, 1995).

Moysés e Almeida-Toledo (2002) aplicaram RFLP na análise de DNA mitocondrial para caracterizar espécies e populações do gênero *Astyanax* das bacias do Alto Paraná e do São Francisco e encontraram a ocorrência de padrões de bandas espécie-específicos nos géis analisados.

Apesar da vasta utilização do marcador RFLP, há uma série de desvantagens, tais como a necessidade de grandes quantidades de DNA, uma vez que esta técnica não utiliza a PCR, e os gastos em termos de tempo e dinheiro no procedimento de hibridização em membrana (Southern Blot Hybridization).

Células de eucariotos apresentam DNA nuclear e DNA de organelas, tais como mitocôndrias em animais e cloroplastos em plantas denominados "genomas extranucleares" (Zaha *et al.*, 1996). O DNA de organelas apresenta fita dupla circular. Segundo Arias e Infante-Malachias (2001), o DNA mitocondrial animal codifica aproximadamente 5% de toda maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria, onde são descritos 37 genes, dos quais 13 codificam RNAs mensageiros para proteínas envolvidas diretamente no processo de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, dois para subunidades ribossômicas e 22 para RNAs transportadores e há uma região não codificadora conhecida como A+T nos invertebrados e como D-loop nos vertebrados, que contém o controle da replicação e transcrição desse genoma. Ao contrário do DNA nuclear de herança biparental, o DNA de organelas encontra-se no citoplasma e, portanto, apresenta herança uniparental.

Suas seqüências são extremamente conservadas. Assim, comparações de genótipos nucleares e mitocondriais podem ajudar a reconhecer indivíduos híbridos, acasalamentos preferenciais e efeitos estocásticos sobre variantes para as quais o taxa ancestral foi polimórfico, podendo-se gerar árvores filogenéticas (Sunnukcs, 2000).

O DNA mitocondrial, em virtude de sua alta taxa de mutação em comparação com DNA nuclear de fita simples (scnDNA), em adição à sua herança maternal e falta de recombinação, oferece muitas vantagens para estudos de populações (Ferguson *et al.*, 1995).

Segundo Pereira (2000), o DNA mitocondrial de vários vertebrados tem sido amplamente utilizado para estudos de população. O autor também explica que a região controle do genoma mitocondrial é freqüentemente usada em estudos de populações devido à alta variabilidade em suas seqüências de nucleotídeos, cujos genes codificantes de proteínas tais como citocromo b (Cyt b), são geralmente usados para análises filogenéticas.

Regiões de DNA mitocondrial animal podem exibir considerável variação intra e entre populações (Parker *et al.*, 1998). Assim, o DNA mitocondrial foi usado com sucesso nos estudos realizados em diversas espécies de peixes, tais como no gênero *Salmo* (Ferguson *et al.*, 1995), em estudos de filogenia de peixes (Morita, 1999; Harris e Mayden, 2001; Nagl *et al.*, 2001; Perdices *et al.*, 2002; Obermiller e Pfeiler, 2003), assim como em estudos de estrutura de população (Chenoweth e Hughes, 1997) e de impacto da introdução de indivíduos cultivados em populações selvagens (Clifford *et al.*, 1998). Martins *et al.* (2003) utilizou com sucesso a região D-Loop do DNA mitocondrial para estimar níveis de variabilidade intra e interpopulacionais em seis populações selvagens de *Leporinus elongatus*.

No genoma de diversas espécies ocorrem seqüências repetitivas organizadas em tandem cujos tamanhos podem variar. São chamados DNA satélite ou VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) e representam *locos* individuais onde alelos são compostos por repetições em tandem que variam no número de unidades do cerne (Nakamura *et al.*, 1987). O DNA satélite foi primeiro identificado na década de 60, quando o DNA centrifugado sob certas condições foi separado em duas ou mais camadas: uma banda média contendo

genes e bandas secundárias que tornaram-se conhecidas como bandas satélites, onde foram encontradas as seqüências de DNA repetitivo (Moxon e Wills, 1999). Quando os blocos de DNA repetitivo são compostos por 10 a 64 pares de bases, cujo tamanho total varia de 0,1 a 7,0 Kb, estas seqüências são denominadas minissatélites (Jeffreys *et al.*, 1985). Os minissatélites têm sido marcadores muito eficientes na identificação dos estoques pesqueiros (Beacham *et al.*, 1996; Angers *et al.*, 1995; Galvin *et al.*, 1995; Tessier *et al.*, 1995).

Segundo Schlötterer e Pemberton (1998) as seqüências denominadas DNA microssatélite têm unidades de repetição de 1 a 5 nucleotídeos. Estes marcadores, também chamados “simple sequence repeats (SSRs)”, são hipervariáveis, co-dominantes e revelam variações de comprimento entre os alelos (Parker *et al.*, 1998; Sunnucks, 2000).

Sondas baseadas em VNTRs podem detectar simultaneamente grande quantidade de locos hipervariáveis, fornecendo um padrão “fingerprint” utilizável para identificação de indivíduos, testes de paternidade e mapeamento genético (Jeffreys *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1987). Em estudos de populações, o uso de VNTRs é considerado um dos métodos mais efetivos para avaliar o nível de variabilidade genética em casos de reduções do número de alelos e de heterozigosidade (Ferguson *et al.*, 1995). Devido à expressão co-dominante e ao multialelismo, os marcadores microssatélites são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo, ideais para mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1995). O fator limitante para o emprego de microssatélites é a disponibilidade de informações em termos das seqüências de nucleotídeos das regiões de repetições no genoma do organismo que se deseja estudar, sendo necessária a construção de uma biblioteca genômica do organismo em questão (Matioli e Passos-Bueno, 2001).

Vários microssatélites têm sido isolados e caracterizados a partir de DNA de algumas espécies de peixes, principalmente em salmonídeos (Estoup *et al.*, 1993; Pfeiffer *et al.*, 1997; Banks *et al.*, 1999; Ostberg e Thorgaard, 1999). Poteaux *et al.* (1999) utilizaram microssatélites para investigar o impacto genético da restocagem de truta marrom do Mediterrâneo (*Salmo trutta*).

Segundo O'Reilly e Wright (1995), os microsátélites exibem características que os tornam particularmente adequados como marcadores genéticos para várias aplicações em pesquisas em aquicultura e pesca, tais como (1) são abundantes no genoma; (2) exibem variados níveis de polimorfismo; (3) exibem alelos co-dominantes de herança mendeliana; (4) a técnica que utiliza os microsátélites requer pouca quantidade de tecido e (5) os locos são conservados em espécies próximas.

Na RAPD, é desnecessário o conhecimento prévio da seqüência do DNA, uma vez que as variações genômicas detectadas por este método baseiam-se na diferença, entre indivíduos, da distribuição dos sítios complementares a um *primer* curto (10 bases), de seqüência aleatória. Utilizando-se um único *primer* por reação, observa-se a geração de numerosos segmentos amplificados, cujas seqüências são desconhecidas e os tamanhos são variados. Assim, assume-se que diferentes indivíduos produzem distintos padrões de fragmentos amplificados com base nas diferentes localizações dos sítios de hibridação dos *primers* ao longo da fita de DNA. As análises são feitas considerando a distribuição, presença e ausência das bandas geradas pela reação de amplificação.

Apesar do uso de seqüências desconhecidas e aleatórias, a RAPD permite as análises de grau de parentesco, de estrutura de populações (como por exemplo, grau de diversidade genética, tamanho efetivo da população e grau de consangüinidade) e identificação de indivíduos (Haig, 1998). Nas análises estatísticas dos padrões da RAPD considera-se que (1) a interpretação dos padrões de bandas pode ser realizada de maneira não-ambígua; (2) os alelos de diferentes locos não co-migram no gel e que (3) o investigador é completamente capaz de comparar bandas de diferentes indivíduos no mesmo gel e entre diferentes géis e é também assumido que cada loco pode ser tratado como um sistema de dois alelos com somente um dos alelos por loco sendo amplificável por PCR (Lynch e Milligan, 1994).

Técnicas baseadas em RAPD não necessariamente envolvem regiões genômicas responsáveis por adaptações evolutivas em populações locais ou espécies (Allendorf, 1995; Dergam *et al.*, 2002). Marcadores RAPD-PCR são considerados como derivados de regiões repetitivas do genoma (Haymer, 1994) e assumidos como neutros (Dergam *et al.*, 2002).

Visto que os *primers* utilizados na RAPD consistem de seqüências aleatórias e não discriminam entre regiões codificadoras e não-codificadoras, é razoável supor que esta técnica amostra o genoma de uma forma mais aleatória que os outros métodos de análise do genoma (Lynch e Milligan, 1994).

Os marcadores RAPD podem ser uma ferramenta extremamente útil na diferenciação de populações geograficamente e geneticamente isoladas (Hatanaka e Galetti Jr., 2003), permitindo a avaliação da estrutura genética de populações selvagens de peixes.

Os marcadores RAPD foram eficientes na diferenciação de populações de *Hoplias malabaricus* na bacia hidrográfica do Rio Doce (Dergam *et al.*, 2002) e também revelou alta diversidade genética intrapopulacional, baixa distância genética e alto fluxo gênico de duas populações de *Astyanax altiparanae* e uma população de *A. bimaculatus* (Prioli *et al.*, 2002).

Segundo Gravilets e Hastings (1996) marcadores moleculares multiloco são sensíveis a curtos períodos de isolamento genético e, devido aos baixos níveis de fluxo gênico, populações podem acumular diferenças genéticas num espaço de relativamente poucas gerações. Assim, o marcador RAPD é aplicável em estudos de populações de peixes para estimativa de variabilidade e similaridade entre populações, possibilitando a inferência da história recente de determinadas populações. Os marcadores RAPD são eficientes na discriminação de espécies onde a identificação por características morfológicas tem se mostrado limitada, como por exemplo em peixes do gênero *Barbus* (Callejas e Ochando, 1998). Além do uso clássico na estimativa de similaridade genética entre populações, os marcadores RAPD foram utilizados com sucesso em grande número de pesquisas em peixes na obtenção de padrões espécie específicos (Dinesh *et al.*, 1993, Takagi e Taniguchi, 1995 e Callejas e Ochando, 1998) e na estimativa de relações filogenéticas entre espécies e subespécies (Bardakci e Skibinski, 1994, Callejas e Ochando, 1998).

Segundo Comincini *et al.* (1996), a análise de RAPD é um método eficiente e sensível para estimar a posição de organismos de sistemática controversa.

Em estudo de diversidade genética, marcadores RAPD foram eficientes

para revelar que o *pool* gênico das variedades cultivadas é menor que o das variedades selvagens de acará-disco (*Symphysodon* spp.) (Koh *et al.*, 1999).

A principal limitação dos marcadores de RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco, pelo fato de ser dominante e, portanto, não permitir a detecção de genótipos heterozigotos (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Há, também, a possibilidade de que produtos de diferentes locos apresentem peso similar e sejam, portanto, indistinguíveis no gel, devido à comigração (Lynch e Milligan, 1994).

2 - OBJETIVOS

Esse estudo teve como objetivo contribuir para o conhecimento das características genéticas do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier), do Médio Araguaia, região compreendida entre os paralelos 15° 30'S/15° 45'S e 52°W/51° 45'W, bacia hidrográfica Tocantins-Araguaia, Estado do Mato Grosso, sob os seguintes aspectos:

1 – Descrever as características citogenéticas básicas de *Arapaima gigas*, utilizando a coloração convencional Giemsa para caracterização do cariótipo; a coloração com nitrato de prata para a localização das regiões organizadora de nucléolos (RONs) e a hibridação *in situ* com sondas de DNAr 18S e 5S para localização dos genes ribossômicos 45S e 5S, respectivamente; o bandamento C para o estudo da heterocromatina constitutiva.

2 – Inferir sobre o grau de variabilidade genética da amostra considerada de *Arapaima gigas* do Médio Araguaia, com o uso da técnica de PCR-RAPD.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Material coletado

Utilizou-se vinte e cinco exemplares de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) (Figura 1) no presente estudo. As coletas foram realizadas em dois anos consecutivos, 1999 e 2000, nos meses setembro e novembro, respectivamente.

O pirarucu ocorre originalmente nas bacias amazônica e Tocantins-Araguaia. Assim, optou-se pela realização do presente estudo na região do Médio Araguaia, onde há necessidade de estudos genéticos deste peixe. Os locais de coleta foram lagoas marginais do rio Araguaia, no município de Araguaiana, Estado do Mato Grosso. A região de coleta está compreendida entre os paralelos 15° 30'S/15° 45'S e 52°W/51° 45'W, articulação compatível com a escala 1:50.000 (IBGE) (Embrapa Monitoramento por Satélite).

As duas amostragens consistiram de peixes mortos durante o processo de transporte de uma lagoa que estava secando para uma lagoa permanente, realizado pelo proprietário da fazenda onde foi realizado o estudo, o que facilitou o acesso aos locais de ocorrência do pirarucu e a obtenção dos exemplares estudados. Assim, não houve risco de repetição da coleta de DNA de um mesmo animal nos dois anos. Nos meses de coleta foram obtidos somente exemplares juvenis, com comprimento total médio de 80 cm.

A figura 2 mostra vistas parciais das duas lagoas onde foram coletados os peixes e o tanque utilizado para o transporte dos animais.



Figura 1: Pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier), coletado no Médio Araguaia, município de Araguaiana/MT.



Figura 2: a) Lagoa onde foi realizada a coleta de 1999; b) Lagoa onde foi realizada a coleta de 2000 e que recebe os peixes provenientes da primeira lagoa; c) Tanque utilizado para o transporte de peixes.

3.2 – Preparação dos cromossomos mitóticos

As preparações dos cromossomos mitóticos foram feitas no campo e no laboratório do Instituto de Ciências e Letras do Médio Araguaia da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), no município Pontal do Araguaia – MT. Todos os outros procedimentos utilizados no presente estudo foram realizados no Laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em São Carlos – SP.

3.2.1 - Cultura de células do sangue

A fim de se obter cromossomos mitóticos para os estudos citogenéticos, foi realizada cultura de células do sangue, adaptada a partir da técnica descrita por Fenocchio e Bertollo (1988) que consiste em colocar sangue periférico (obtido de um vaso dorsal do corpo do peixe) em meio de cultura, contendo L-glutamina, com soro fetal bovino, antibióticos e fitohemaglutinina.

Após incubação por 72 a 120 horas, a uma temperatura de 27°C, adicionou-se colchicina à cultura, deixando-a agir por cerca de 45 minutos (a ação da colchicina por mais de 45 minutos resulta numa perda da qualidade dos cromossomos por condensação excessiva dos mesmos, sem, entretanto, aumento da quantidade de metáfases por material preparado).

Em seguida o material foi hipotonizado (KCl 0,075M) e fixado (álcool metílico:ácido acético, 3:1), como o descrito para preparações diretas por Bertollo *et al.* (1978).

3.2.2 - Preparações de culturas de curta duração a partir de suspensão celular

Devido à dificuldade em se obter material satisfatório para as técnicas de citogenética, optamos por utilizar a técnica descrita por Fenocchio *et al.* (1991) que consiste em cultivar as células de pequenas porções de tecido sólido. Utilizamos todos os tecidos que apresentam atividade mitótica, em maior ou

menor grau. Assim, foram coletadas amostra do rim, intestino, baço, brânquia e base das escamas. Essas amostras foram colocadas em recipientes contendo 5 mL de meio de cultura TC 199, suplementado com 20% de soro humano ou de feto bovino e antibióticos. Nesse meio, o tecido foi dissociado com auxílio de seringa de vidro, até obtenção de um macerado homogêneo, que permaneceu em estufa a 30°C durante 4 a 12 horas. A colchicina foi adicionada ao preparado 40 minutos antes do final da incubação.

Após a incubação, foram realizados os procedimentos de hipotonização (KCl 0,075M) e fixação (álcool metílico:ácido acético, 3:1), como o descrito para preparações diretas por Bertollo *et al.* (1978).

A preparação que forneceu melhor resultado foi a de células do baço, com duração de 6 horas, embora com poucas metáfases.

3.3 – Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs)

3.3.1 - Impregnação com Nitrato de Prata (AgRON)

Para a detecção das regiões organizadoras de nucléolos, foi empregada a técnica descrita por Howell e Black (1980), que consiste em pingar sobre uma lâmina preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 6 gotas de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1 mL para cada 100 mL de solução). Sobre a gelatina foi adicionada 5 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50%, misturar bem e cobrir com lamínula.

A preparação foi mantida em banho-maria a 60°C por 2 a 3 minutos conforme a coloração da lâmina e dos cromossomos ao microscópio. Em seguida, foi lavada em água destilada e coloração com Giemsa a 5% em tampão fosfato pH 6,8 por 1 minuto.

As metáfases que apresentaram marcação com nitrato de prata foram registradas em tabela com as frequências dos números de cromossomos marcados. Assim, definiu-se o número de RONs ativas na intérfase na população estudada.

3.3.2 - Híbridação *in situ* com sondas de DNAr 18S e 5S

Para confirmação do número e localização das regiões organizadoras de nucléolos foi utilizada a híbridaç o *in situ* com sondas de DNA 18S e 5S, adaptada a partir da técnica descrita por Pinkel *et al.* (1986).

A sonda de DNAr 18S foi cedida pelo Dr. Cláudio Oliveira (Unesp - Botucatu/SP), obtida a partir do genoma de tilápia (cerca de 1700 pb) amplificado com *primers* universais 18S RNAI e 18S RNAIII. O fragmento foi clonado no vetor pGEM-T e utilizado para transformar bactérias da linhagem JM 109 (Promega).

A sonda de DNAr 5S foi obtida de *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr, 1999)

Marcação da sonda (Kit Bionick Labeling System Gibco)

1 - Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 mL no gelo: 5 μ L de dNTP Mix 10x; x μ L de DNA (quantidade em μ L que varia com a concentração da sonda estocada e que deve equivaler a 1 μ g de massa de DNA); 5 μ L de Enzima mix 10x (DNase + DNAPolimerase I);  gua qsp 45 μ L.

Se desejar, a reação padrão (1 μ g) pode ser aumentada linearmente.

2 - Misturar, centrifugar brevemente (cerca de 5 segundos) e incubar a 16  C durante 2 horas;

3 - Adicionar 1/10 do volume de tampão de parada para finalizar a reação;

4 - Precipitar o DNA com acetato de sódio 3M (1/10 do volume total) mais etanol 100% (2 volumes) e precipitar a -20  C por um tempo mínimo de 3 horas (melhor overnight);

5 - Centrifugar 10 minutos, descartar o sobrenadante e lavar o pellet com etanol 70%. Secar e diluir em água (para uso imediato) ou TE (para ser armazenada por um período maior).

Tratamento com RNase

-
- 1 - Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 minutos à temperatura ambiente, mantidas em shaker;
 - 2 - Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 minutos cada;
 - 3 - Incubar as lâminas em 90 μ L de RNase 10mg/mL em 2xSSC (0,4% RNase/2xSSC) a 37 °C por 1 hora em câmara úmida com água milli-Q;
 - 4 - Lavar 3 x por 5 minutos em 2xSSC;
 - 5 - Lavar durante 5 minutos em PBS 1x.

Tratamento com pepsina

- 1 - Incubar as lâminas por 10 minutos em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37 °C;
- 2 - Lavar em PBS 1x durante 5 minutos em shaker a temperatura ambiente;
- 3 - Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- 4 - Lavar em PBS 1x por 5 minutos (shaker);
- 5 - Desidratar as lâminas em série alcoólica (70,85, 100 %) por 5 minutos cada.

Pré-hibridação

- 1 - Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos;
- 2 - Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 minutos cada. Obs. O álcool 70% deverá estar a -20°C.

Hibridação

- 1 - Preparar a câmara úmida com formamida 60% em 2xSSC pH 7,0;
- 2 - Solução de Hibridação: 50% de Formamida; Sulfato de Dextrano 50% (concentração final de 10%); 20xSSC; DNA de placenta 10mg/ml (1 μ l/ lâmina); Sonda + água para completar o volume total de 50 μ L por lâmina.

3 – Lavar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 minutos para desnaturação do DNA de placenta e passá-la imediatamente ao gelo;

4 - Montar cada lâmina com 50 µL de solução de hibridação e deixar “overnight” a 37°C;

Lavagens

1 - Lavar 4 vezes em formamida 30%/2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 5 minutos cada, em Shaker;

2 - Lavar as lâminas 3 vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada, em Shaker;

3 - Lavar durante 5 minutos em Tween 20-20xSSC, à temperatura ambiente em Shaker.

Detecção

1 - Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4xSSC;

2 - Colocar 90 µL de NFDM sobre a lâmina e incubar durante 15 minutos em câmara úmida (com água);

3 - Lavar duas vezes com Tween 20, 5 minutos cada. Após a primeira lavagem remover a lamínula;

4 - Incubar as lâminas com 90 µL de FITC (1 µL FITC/1000 µL NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

5 - Lavar 3 vezes em Tween 20, 5 minutos cada, à temperatura ambiente em Shaker;

6 - Incubar com 90 µl de anti-avidina (7 µl anti-avidina/700 µl de NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

7 - Lavar 3 vezes em Tween 20, 5 minutos cada na temperatura ambiente, em Shaker;

Repetir os passos 6 e 7 três vezes, terminando com FITC.

8 - Lavar em álcool 70, 85 e 100%, 5 minutos cada.

Montagem da lâmina

Montar a lâmina com 1 µL de iodeto de propídio (50 µg/ mL) e 25 µL de antifading. Guardar no escuro.

3.4 – Detecção de heterocromatina constitutiva (bandamento C)

A técnica utilizada foi baseada na descrita por Sumner (1972), com algumas modificações. Num primeiro procedimento, lâminas recém preparadas foram tratadas com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2N por 2 minutos, em banho-maria a 42°C. Após esse tratamento, o material foi lavado com água destilada e secado ao ar por cerca de 5 minutos. A lâmina foi tratada durante 55 segundos em solução de hidróxido de bário [Ba(OH)₂·8H₂O] 5%, recém preparada e filtrada a 42°C e lavada, logo após, rapidamente em HCl 0,2N, para interromper a ação da solução de hidróxido de bário e retirar seu excesso. A lâmina foi lavada em água destilada e secada ao ar. Foi realizada a incubação deste material em solução de 2xSSC a 60°C, por 15 minutos, para reintegração da estrutura da cromatina. Lavar em água destilada e deixar secar ao ar. A coloração foi feita em solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 30 minutos, seguida de lavagem com água destilada.

A partir desta técnica foi obtido um pequeno número de metáfases com cromossomos bandeados. Assim, seguimos um segundo procedimento (Born, 2000), que consiste em tratar a lâmina (“envelhecida” por três dias numa estufa a 37°C) com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2N por 2 minutos a 25°C e, em seguida, lavá-la com água destilada e deixá-la secar ao ar. Incubar a lâmina durante 15 minutos em 2xSSC a 25°C. Após este procedimento, a preparação foi incubada em solução de hidróxido de bário (Ba(OH)₂·8H₂O) 5%, recém preparada e filtrada a 60°C. Mergulhar a lâmina rapidamente em HCl 1N, para interromper a ação da solução de bário e retirar seu excesso, e depois banhá-la em água destilada e secá-la ao ar. Mantê-la em solução de 2xSSC a 60°C, por 30 minutos, lavar em água destilada e deixar secar ao ar. Os cromossomos bandeados foram corados em solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 30 minutos.

3.5 – Extração de DNA

O DNA total foi extraído de nadadeira e fígado seguindo o protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Em seguida foi quantificado por comparação com padrões de DNA de concentrações conhecidas. Após a quantificação, foram separadas alíquotas de DNA diluído a uma concentração final de 50 ng/μL para uso na PCR (Polymerase Chain Reaction). Um conjunto de 17 *primers* decâmeros da Gibco BRL foi testado no presente trabalho.

3.5.1 - Extração de DNA de fígado e nadadeira

A extração de DNA consistiu em fragmentar o tecido (fígado e nadadeira) em N₂ líquido. O macerado foi, então, suspenso em 4 mL de tampão de digestão (100 mM NaCl; 10 mM Tris HCl pH 8; 25 mM EDTA pH 8; 0,5% SDS) para 100 mg de tecido. Após este procedimento, a amostra foi colocada em agitação a 50°C por 2 horas.

O DNA foi, então, extraído com um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) em suave agitação por 5 minutos, seguido de centrifugação por 35 minutos a 2.800 rpm. A camada superior foi, então, transferida para um novo tubo e adicionou-se ½ volume (em relação a esta) de 7,5M de acetato de amônia ou NaCl 1M e 2 volumes ou 100% etanol ou isopropanol. O tubo foi agitado gentilmente para precipitar o DNA durante 10 minutos e centrifugou-se por 2 minutos a 2800 rpm. Em seguida, o pellet foi lavado em etanol 70% por 20 minutos e centrifugar por 2 minutos a 3.000 rpm.

O DNA extraído foi ressuspenso em TE, pH 8,0 por algumas horas até a solubilização.

3.6 – Reação em cadeia da polimerase para identificação de polimorfismos de DNA amplificado com *primers* arbitrários (PCR-RAPD)

As seqüências e características dos produtos de amplificação dos 17 *primers* decâmeros (Gibco BRL) estão na tabela III.

3.6.1 – *Ensaio RAPD*

A solução de amplificação consistiu em 1 µL de DNA de concentração 50 ng/µL, 50 ng de um dos “*primers*”, 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM de KCl, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs (12,5 µM cada, dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 1U de *Taq* DNApolimerase (Pharmacia Biotech) e água deionizada q. s. p. o volume final de 25 µL.

O programa de amplificação consistiu de 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C (4 minutos) e 92°C (1 minuto), temperatura de hibridação de 37°C (1 minuto e 30 segundos) e temperatura de extensão de 72°C (3 minutos) em termociclador Perkin Elmer modelo 2400. Para visualização dos padrões gerados, foram aplicados 15 µL de cada amostra + tampão de corrida em gel de agarose 1,5%, sob voltagem constante de 75V por 4 horas.

Após a eletroforese, o gel contendo os produtos de amplificação foi corado com brometo de etídeo e em seguida colocado em um transiluminador, fotodocumentado e analisado através do Kodak EDAS (Electrophoresis Documentation and Analysis System) 290.

3.6.2 - *Análise dos resultados*

Os dados foram analisados por meio do software NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 1.7 (Rohlf, 1993). Os padrões obtidos nos géis foram introduzidos no programa de análise na forma de variáveis binárias, ou seja, de presença (1) e ausência (0). Desta forma foram

construídas matrizes de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard (Jaccard, 1901). Três matrizes foram originadas separadamente para cada *primer*, representando a amostragem do primeiro ano, do segundo ano e do total.

Através do programa NTSYS, foram realizadas análises de agrupamento hierárquico (modo SAHN clustering) pela aplicação do método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average) (Sneath e Sokal, 1973), gerando-se dendogramas representando as relações entre os exemplares das duas amostragens separadamente e em conjunto.

Utilizou-se o programa computacional POPGEN 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) a fim de calcular as frequências gênicas para cada loco analisado e o teste de homogeneidade das frequências (χ^2). Ainda por este programa, foi testada a significância da similaridade para cada *primer* entre as duas amostras analisadas, usando o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

4 – RESULTADOS

4.1 - *Caracterização citogenética*

Na tabela I estão registradas as freqüências dos números diplóides encontrados na amostra analisada citogeneticamente (2 machos, 7 fêmeas e 5 indivíduos com sexo não determinado). O número diplóide modal foi 56 cromossomos.

O cariótipo é constituído por 14 pares de cromossomos metacêntrico/submetacêntrico e 14 pares subtelocêntrico/acrocêntrico (Figura 3). Esta apresentação se deve ao fato de não se conseguir preparações com qualidade que permitisse a separação entre metacêntricos e submetacêntricos. Não há uma variação brusca de tamanho entre os pares de cromossomos colocados lado a lado no cariótipo. Mas, observou-se que os quatro primeiros cromossomos têm tamanhos muito próximos e são cerca de cinco vezes maiores que os últimos cromossomos do cariótipo.

Uma conspícua constrição secundária foi observada na posição subterminal do braço curto do par cromossômico número 3.

Tabela I – Números cromossômicos observados em *Arapaima gigas* do Médio Araguaia/MT. A tabela mostra o número de metáfases por indivíduo por números cromossômicos encontrados. 2n (número diplóide). M (machos). F (fêmeas).

Nº do peixe	Sexo	Números cromossômicos					Total de metáfases observadas por indivíduo
		2n=53	2n=54	2n=55	2n=56	2n=57	
13905		4	9	3	12	1	29
13910		0	0	0	1	0	1
13955	F	0	0	0	2	0	2
13958		0	1	0	3	0	4
13959	F	0	2	2	8	1	13
13960		0	3	1	10	1	15
13961		0	0	0	1	0	1
13962	F	0	0	0	1	0	1
13963	F	0	0	0	1	0	1
13966	M	0	0	0	2	0	2
13967	M	0	1	0	1	0	2
13968	F	0	2	2	8	0	12
13971	F	0	1	0	1	0	2
13972	F	0	1	1	5	0	7
Total	14 ind.	4	20	9	56	3	92
Total %		4,35%	21,74%	9,78%	60,87%	3,26%	100%

A análise das regiões organizadoras de nucléolos por meio de impregnação por prata mostrou a ocorrência de um único par de cromossomos portador desta região ativa em 100% das lâminas marcadas, no qual um dos cromossomos é portador de uma constrição secundária visível na maioria das metáfases coradas com Giemsa (Figura 3). A RON simples foi confirmada pela hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S, onde foi observada a ocorrência de polimorfismo de tamanho deste sítio (Figura 4).

Apesar de cinco tentativas de hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr 5S, com diferentes concentrações, não houve marcação desta região em nenhum dos cromossomos. Embora tenham sido observados núcleos marcados.

As técnicas utilizadas para detecção da heterocromatina constitutiva evidenciaram a distribuição desta em blocos centroméricos, pouco corados, em todos os cromossomos (Figura 4).

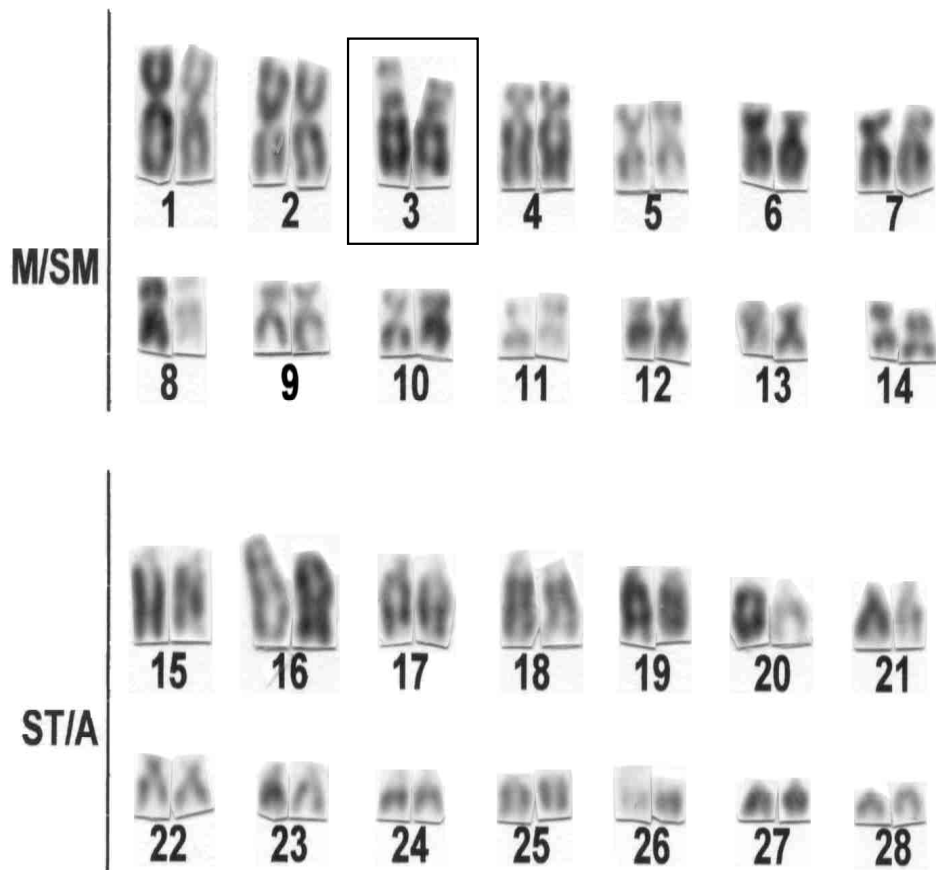


Figura 3: Cariótipo de *Arapaima gigas* do rio Araguaia, composto por 28 cromossomos meta/submetacêntricos e 28 subtelo/acrocêntricos. Em destaque, os cromossomos portadores de constrição secundária.

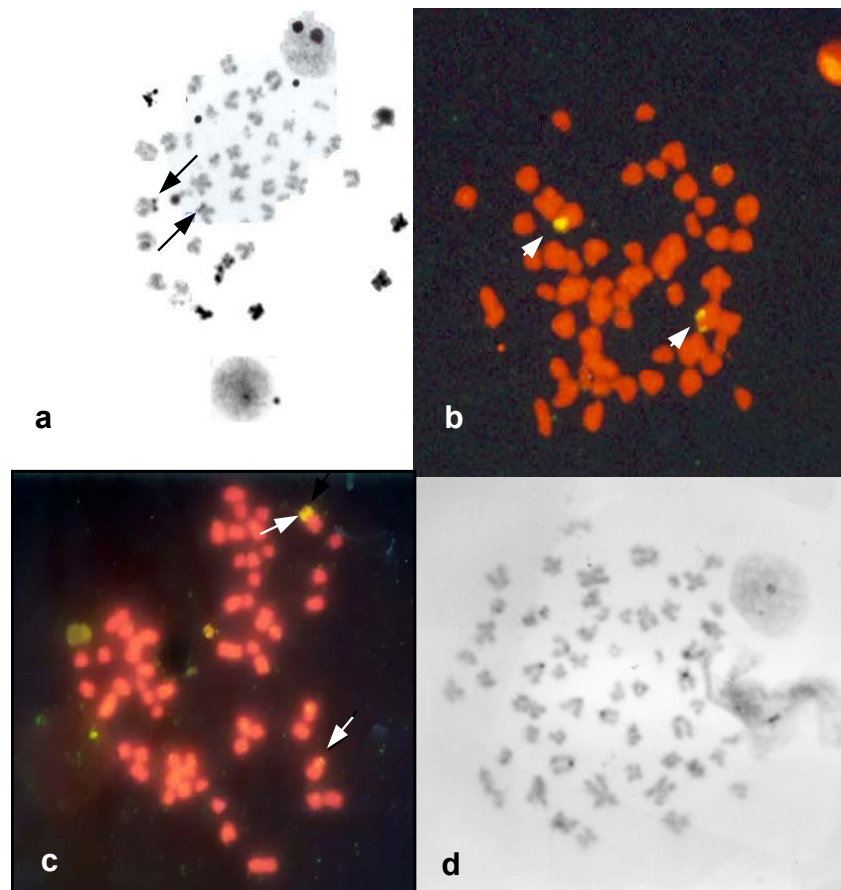


Figura 4: a) Metáfase mostrando os cromossomos portadores de RON através da impregnação por nitrato de prata; b, c) FISH com sonda de DNAr 18S mostrando somente um par de cromossomos portador de RON e diferença de tamanho das RONs; d) Metáfase mostrando blocos centroméricos de heterocromatina constitutiva.

4.2 – Análise de RAPD

Dezessete *primers* foram testados e destes, sete foram selecionados para as análises estatísticas porque geraram produtos de amplificação polimórficos e com repetibilidade (Tabela III). Nas análises pelos programas POPGEN 1.31 e NTSYS foram utilizados 18 indivíduos da amostragem de 1999 e 7 da amostragem de 2000. Nenhuma banda diagnóstica foi detectada entre os dois anos considerados separadamente, indicando não haver diferenças imediatamente visíveis entre as amostra de 1999 e 2000.

Nos géis (Figuras 5 a 10) observa-se também o padrão de bandas de dois indivíduos da espécie *Osteglossum bicirrhosum* (aruanã) utilizados para comparação, que, obviamente, não foram considerados nas análises estatísticas.

Tabela II: Seqüências dos *primers* testados e características dos produtos de amplificação.

<i>Primer</i>	Seqüência (5'→3')	Repetibilidade	Polimórfico
A	GTG AGG CGT C	N	-
B	CAT TCG AGC C	N	-
C	CCC GCT ACA C	S	S
D	CAC AGG CGG A	S	S
E	AAC GCG TCG G	N	-
1	GCG CCT GGA G	N	S
2	AAC GGG CAG G	S	S
3	GGC TGC GGT A	S	S
4	GCG GAG GTC C	S	S
5	GGA CGC CCT G	S	S
6	GCG TCG AGG G	S	S
A9	GGG TAA CGC C	N	-
A10	GTG ATC GCA G	N	-
A20	GTT GCG ATC C	N	-
B11	GTA GAC CCG T	N	-
B14	TCC GCT CTG G	N	-
B20	GGA CCC TTA C	N	-

S=Sim; N=Não.

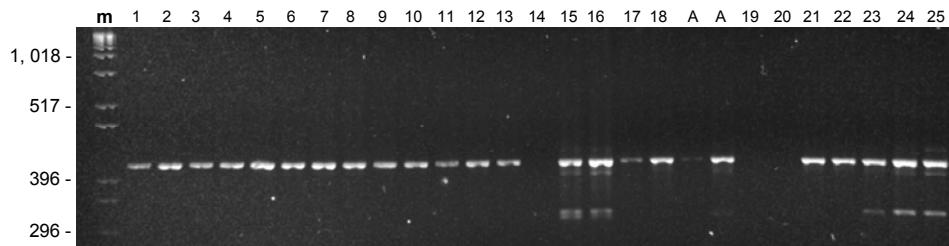


Figura 5: Padrão RAPD-PCR em *Arapaima gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer C. m=marcador 1 Kb. A=aruanã.

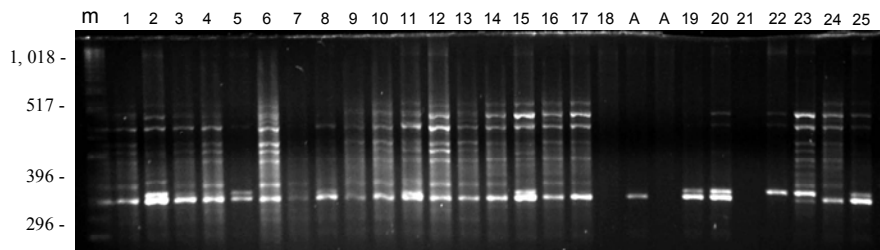


Figura 6: Padrão RAPD-PCR em *Arapaima gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer 2. m=marcador 1 Kb. A=aruanã.

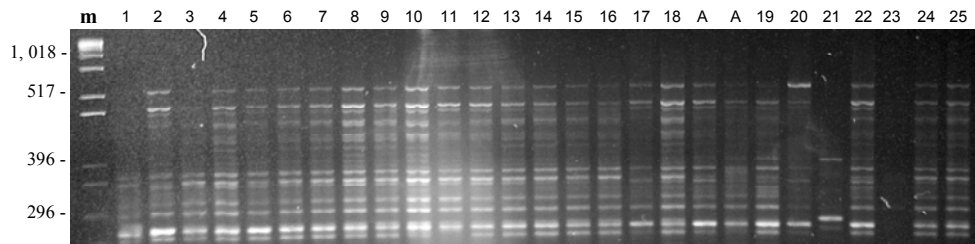


Figura 7: Padrão RAPD-PCR em *Arapaima gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer 3. m=marcador 1 Kb. A=aruanã.

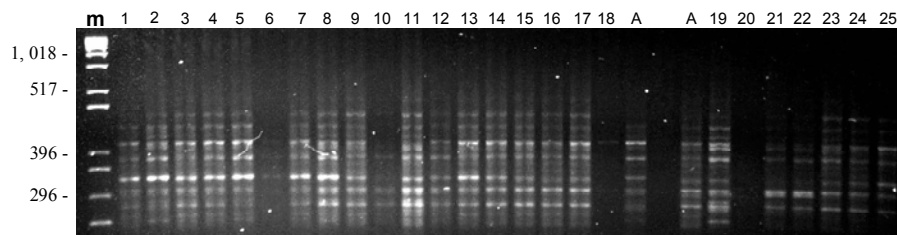


Figura 8: Padrão RAPD-PCR em *Arapaima gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer 4. m=marcador 1 Kb. A=aruanã.

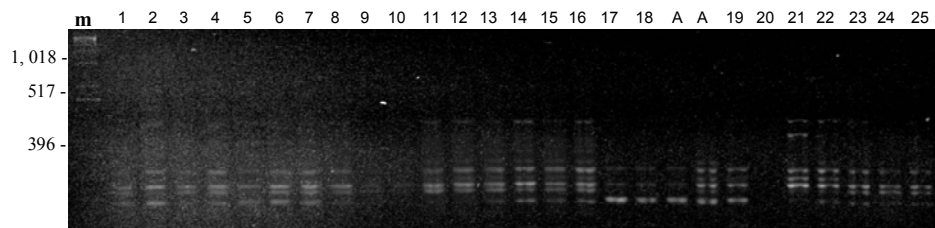


Figura 9: Padrão RAPD-PCR em *Arapaïma gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer 5. m=marcador 1 Kb. A=aruanã.

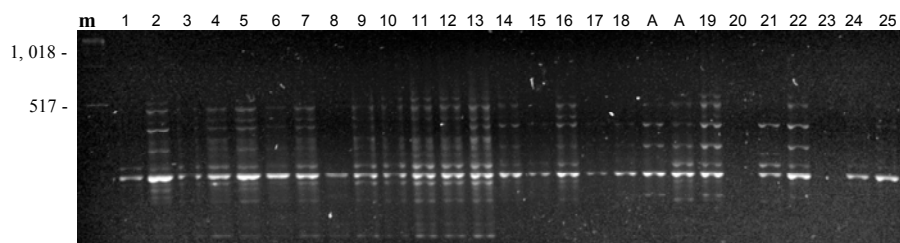


Figura 10: Padrão RAPD-PCR em *Arapaïma gigas* nos anos 1999 (1-18)/2000 (19-25) em conjunto – primer 6. m=marcador 1 Kb. A=aruanã.

As análises pelo POPGEN 1.31 revelaram que a amostra utilizada no trabalho (1999 + 2000) consiste de uma única população, visto que a diferença entre os valores de similaridade é insignificante (teste Kruskal-Wallis; KW= 1,0472, P=0,3062, Tabela IV e V).

Tabela III: Comparação estatística entre os coeficientes de similaridade de Jaccard obtidos para cada *primer* e por ano de coleta (1999 e 2000) (teste Kruskal-Wallis: KW= 1,0472, P=0.3062).

<i>Primer</i>	Média±Desvio Padrão	
	1999	2000
c	0,68±0,31	0,71±0,46
d	0,56±0,41	0,43±0,46
2	0,55±0,23	0,27±0,35
3	0,80±0,12	0,70±0,32
4	0,89±0,15	0,39±0,36
5	0,61±0,22	0,66±0,24
6	0,45±0,27	0,59±0,19
total	0,65±0,15	0,54±0,17

Tabela IV: Medidas de identidade genética e distância genética de Nei (Nei, 1972) entre os anos de coleta. Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal).

População	1	2
1	****	0,8455
2	0,1678	****

Considerando o resultado da aplicação do programa POPGEN 1.31 e, portanto, utilizando um total de 25 indivíduos como uma única amostragem (1999+2000), as análises estatísticas utilizando o programa NTSYS através de agrupamento hierárquico (modo SAHN clustering) pela aplicação do método UPGMA geraram um dendograma representando as relações entre os exemplares das duas amostragens em conjunto (Figura 11), que revelou diferenças significativas entre os indivíduos da amostragem total, demonstrando ocorrência de variabilidade intrapopulacional.

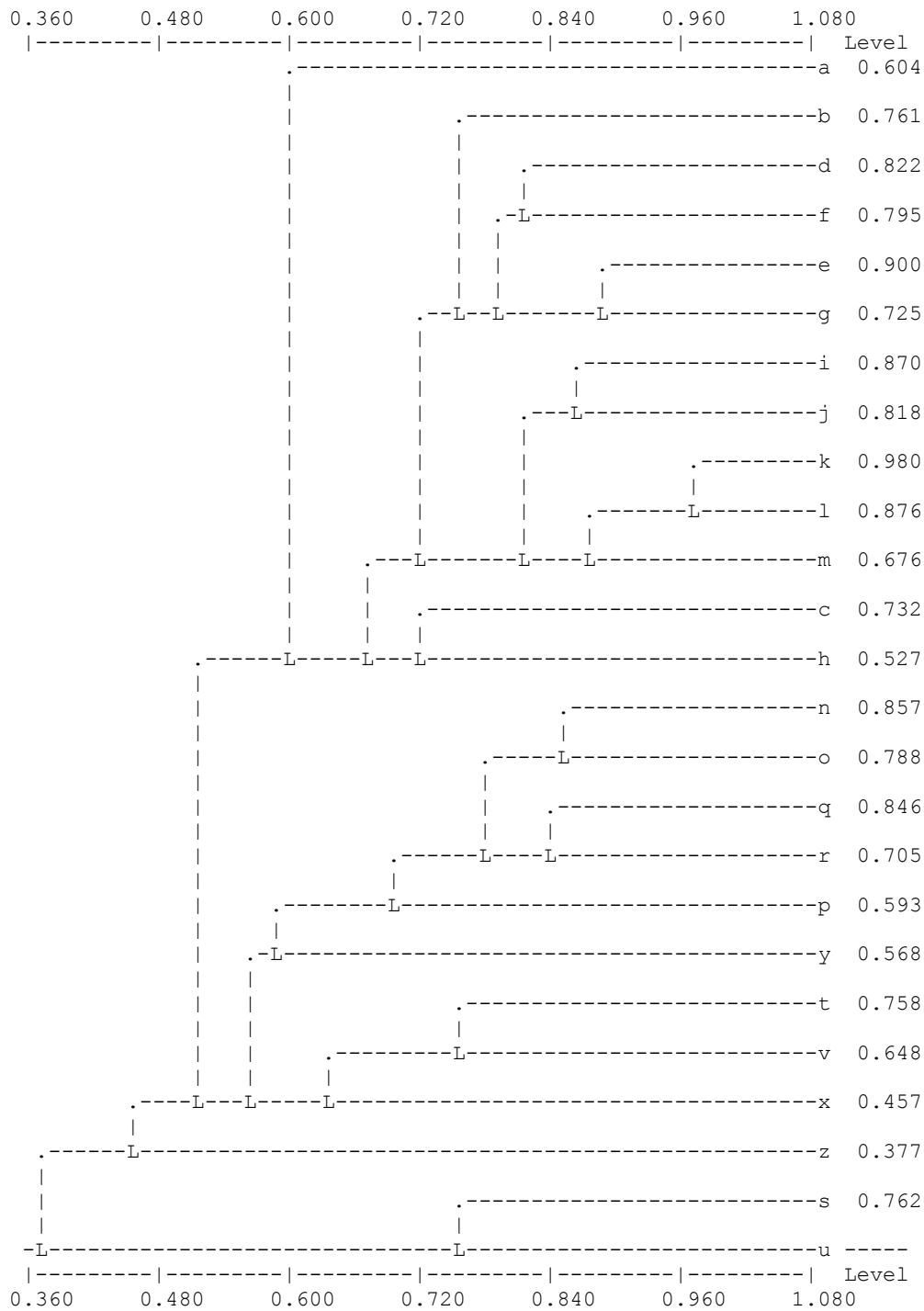


Figura 11: Dendrograma baseado no Coeficiente de Jaccard pelo método UPGMA para a amostragem total (1999+2000) de *Arapaima gigas* da região do médio Araguaia (todos os primers). As letras de “a” a “r” correspondem à amostra coletada em 1999. As letras de “s” a “y” correspondem à amostra coletada em 2000.

Na amostra do ano 1999, foram analisados 65 locos, dos quais 50 locos são polimórficos, correspondendo a 76,92%. Na amostra de 2000, o número de locos foi 65, sendo 39 polimórficos, equivalente a uma percentagem de 60%. Quando considerados 1999+2000, do total de 65 locos analisados, foram registrados 63 locos polimórficos, perfazendo 96,92%. Os valores revelam alto grau de variabilidade intrapopulacional. A significância da frequência gênica em 1999+2000 está na tabela VI.

Tabela V: Teste de homogeneidade (χ^2) para as frequências gênicas das amostras 1999+2000. * significa as frequências alélicas significativamente diferentes entre os indivíduos das amostragem.

Alelo	χ^2	P
C1	0,201306	0,653668
C2	7,608577	0,005809*
C3	1,178568	0,277648
C4	1,178568	0,277648
D1	3,614180	0,057289
D2	3,614180	0,057289
D3	0,903386	0,341875
D4	5,020182	0,025054*
D5	5,020182	0,025054*
D6	5,020182	0,025054*
D7	5,020182	0,025054*
D8	3,873237	0,049062*
D9	2,759433	0,096682
P2-1	2,598161	0,106988
P2-2	2,437283	0,118481
P2-3	3,634285	0,056601
P2-4	5,020182	0,025054*
P2-5	2,598161	0,106988
P2-6	4,252668	0,039189*
P2-7	0,417530	0,518172
P2-8	5,020182	0,025054*
P2-9	0,748116	0,387073
P2-10	14,428566	0,000146*
P3-1	0,510993	0,474709
P3-2	0,510993	0,474709
P3-3	1,503719	0,220100
P3-4	3,862729	0,049370*
P3-5	0,715357	0,397671
P3-6	0,417530	0,518172
P3-7	1,363560	0,242921

P3-8	7,608577	0,005809*
P3-9	7,608577	0,005809*
P3-10	0,003257	0,954491
P3-11	11,314858	0,000769*
P3-12	0,000000	1,000000
P3-13	7,608577	0,005809*
P3-14	7,608577	0,005809*
P4-1	5,292676	0,021415*
P4-2	0,857787	0,354359
P4-3	1,363560	0,242921
P4-4	0,510993	0,474709
P4-5	11,314858	0,000769*
P4-6	17,259968	0,000033*
P4-7	11,314858	0,000769*
P4-8	2,070351	0,150187
P4-9	0,270940	0,602702
P5-1	0,028608	0,865688
P5-2	1,363560	0,242921
P5-3	0,201306	0,653668
P5-4	0,259169	0,610692
P5-5	4,047437	0,044238*
P5-6	0,305848	0,580239
P5-7	0,000000	1,000000
P5-8	3,634285	0,056601
P5-9	5,945472	0,014755*
P6-1	0,126449	0,722143
P6-2	0,020892	0,885074
P6-3	1,755929	0,185133
P6-4	5,945472	0,014755*
P6-5	1,178568	0,277648
P6-6	4,561636	0,032696*
P6-7	0,270940	0,602702
P6-8	2,131611	0,144289
P6-9	3,0701175	0,079741
P6-10	4,252668	0,039189*

5 – DISCUSSÃO

5.1 - *Caracterização citogenética*

Nayyar (1965) registrou um número diplóide igual a 48 cromossomos e a fórmula cariotípica 12M+36A para duas espécies da família Notopteridae, *N. notopterus* e *N. chitala*. Entretanto, Akinori e Yoshio (1998) encontraram número diplóide de 42 cromossomos acrocêntricos na espécie *Notopterus chitala*. Ojima *et al.* (1976) registraram um $2n=56$ para *Osteoglossum bicirrhosum*, sendo a fórmula cariotípica 1SM+1ST+54A. O pirarucu, *Arapaima gigas*, coletado no Médio Araguaia, no presente estudo, apresentou número diplóide igual a 56 cromossomos, sendo 28M/SM+28ST/A. Esses poucos estudos citogenéticos realizados em Osteoglossiformes revelaram a ocorrência de diversidade cromossômica e já mostram ausência de conservadorismo durante a diferenciação deste grupo.

A distribuição geográfica dos Osteoglossiformes abrange a Índia, África, região Indo-Australiana, América do Sul e América do Norte (Greenwood *et al.*, 1966 e Uyeno, 1973). Esta distribuição pode ter contribuído para a variedade de cariótipos e números diplóides encontrados neste grupo, considerando que as diferenças registradas podem ter ocorrido em função da necessidade das espécies de se adaptarem aos diferentes ambientes onde ocorrem.

Autores como Ohno *et al.* (1968) propõem que o número diplóide de 48 cromossomos acrocêntricos seja a característica mais primitiva para os teleósteos. Entretanto, Denton (1973) afirmou que parece haver uma tendência para a redução do número de cromossomos em paralelo à especialização. Em adição a essa idéia, Brum e Galetti Jr (1997) explicaram que os Clupeiformes podem ser o único clado basal entre os grupos mais primitivos de teleósteos com $2n=48$ cromossomos. Segundo esses autores, essa característica seria mais plausivelmente uma sinapomorfia dos Clupeocephala originada a partir de um cariótipo com $2n=60$, vista nos Gynghlimodi e Halecomorpha.

A ocorrência de número diplóide igual a 56 cromossomos em *Arapaima gigas*, no presente estudo, e em *Osteoglossum bicirrhosum* (Ojima *et al.*, 1976) também contradiz a idéia de ancestralidade do $2n=48$, uma vez que sob o ponto

de vista filogenético, o grupo Osteoglossomorpha tem sido considerado o tronco basal, onde Clupeomorpha e Euteleostei corresponderiam ao tronco mais apical dentro da classificação geral dos peixes (Greenwood *et al.*, 1966; Patterson e Rosen, 1977; Lê *et al.*, 1993; Nelson, 1994).

Os resultados deste trabalho mostram que o cariótipo de *Arapaima gigas* apresenta variações significativas de tamanhos cromossomais, sendo que não há variações bruscas entre os pares de cromossomos colocados lado a lado no cariótipo e o decréscimo de tamanho do par um ao par 28 se dá de forma gradativa. Foi encontrado nos cariótipos de outras espécies de Osteoglossiformes (*N. notopterus*, *N. chitala* e *Osteoglossum bicirrhosum*) que os cromossomos apresentam variações pouco significativas de tamanhos (Nayyar, 1965; Ojima *et al.*, 1976; Akinori e Yoshio, 1998). Porém, as comparações são dificultadas pela pouca quantidade de estudos publicados acerca da citogenética das espécies de Osteoglossiformes. Em adição, uma característica do cariótipo de *Arapaima gigas* em relação às outras espécies do seu grupo é uma grande frequência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, em contraste com a grande quantidade de acrocêntricos nas espécies do gênero *Notopterus* e na espécie *Osteoglossum bicirrhosum*.

Em *Arapaima gigas*, a heterocromatina constitutiva está localizada em blocos fracamente corados somente na região centromérica de todos os cromossomos, caracterizando os cromossomos desta espécie como relativamente pobres em regiões heterocromáticas. Este padrão já foi relatado em Osteoglossiformes. Akinori e Yoshio (1998) observaram a ocorrência de blocos heterocromáticos na região centromérica de todos os cromossomos do cariótipo da espécie *Notopterus chitala*. Os autores registraram, ainda, a presença de banda C intersticial em três pares, incluindo o par portador da RON, diferindo, assim, do que foi descrito para *Arapaima gigas* em nosso estudo.

Esses resultados sugerem a ocorrência de variações dentro dos Osteoglossiformes quanto à distribuição da heterocromatina constitutiva. Todavia, o caminho evolutivo desta característica obviamente também ainda não pode ser delineado.

A importância da ocorrência de um determinado padrão de heterocromatina constitutiva no cariótipo é ligada às suas características

estruturais. A heterocromatina é constituída por DNA fortemente condensado e associado a proteínas estruturais e dividida em heterocromatina facultativa e constitutiva. A heterocromatina constitutiva é caracterizada por DNA satélite, altamente repetitivo, de replicação tardia (Hsu *et al.*, 1975) e aparece geralmente associada às RONS, aos centrômeros e aos telômeros, ou então intercaladas em outras regiões cromossômicas. Existem indicações do papel estrutural da heterocromatina constitutiva, possivelmente, na proteção de áreas vitais do genoma e no pareamento dos homólogos durante a meiose, provendo meios para diversidade evolucionária e especiação (Verma, 1988).

A espécie *Arapaima gigas* da população do Médio Araguaia apresentou RON simples, seguindo um padrão freqüente em vários grupos de peixes. Também em Osteoglossiformes, Akinori e Yoshio (1998) registraram RON simples em *Notopterus chitala*. Entretanto, em virtude da escassez de estudos das RONS neste grupo, o caminho evolutivo desta característica ainda precisa ser esclarecido. Nossos resultados, portanto, representam uma contribuição relevante para estudos futuros acerca deste aspecto neste grupo de peixes.

Acredita-se que a técnica AgRON permite apenas a detecção de sítios ativos na interfase precedente (Schmid *et al.*, 1987). Em *Arapaima gigas* há ocorrência elevada de marcação por prata em somente um dos homólogos do par portador de RON. Esses resultados podem ser devidos a problemas de resolução do método usado, uma vez que as metáfases submetidas à técnica FISH apresentaram uma expressiva diferença de tamanho entre os sítios de DNAr 18S, revelando um polimorfismo estrutural. Assim, o tamanho do sítio de RON de um dos homólogos seria tão pequeno que dificultaria a visualização da marcação pelo nitrato de prata.

Polimorfismos de tamanho de RONS podem ser resultado de duplicações cromossômicas regionais produzidas tanto por "slippage" da DNA polimerase quanto por "crossing-over" desigual (Warburton e Henderson, 1979; Jhanwar *et al.*, 1981; Lucchini *et al.*, 1993). Em adição, a tendência para a associação durante a organização nucleolar poderia facilitar translocações desiguais entre as regiões organizadoras de nucléolos (Goodpasture e Bloom, 1975; Ruiz, 1982; Schmid *et al.*, 1987). Todos esses processos podem ser facilitados pela redundância gênica das regiões de DNAr (Viñas *et al.*, 1996).

As regiões organizadoras de nucléolos são os sítios cromossômicos onde se localizam os genes para RNA ribossomal (rRNA), classificados em quatro tipos, de acordo com a suas constantes de sedimentação: 5,8S, 18S e 28S (derivados de um mesmo precursor de alto peso molecular denominado RNA 45S) e o 5S que geralmente não se localiza no cromossomo portador do 45S (Sumner, 1990; Wilson, 1982). Os genes para RNA ribossômico são compostos por múltiplas cópias dispostas em tandem, intercaladas por espaçadores não-transcritos, chamados IGS. A região cromossômica ocupada por estes genes pode ser utilizada como marcador, útil em comparações entre populações ou na detecção de polimorfismos intrapopulacionais devido à sua característica conservadora. Assim, muitos estudos têm sido realizados sobre este aspecto e sabe-se atualmente que polimorfismos de RONS são eventos muito comuns na maioria das espécies de vertebrados, incluindo mamíferos, répteis e anfíbios (Hsu *et al.*, 1975; Schmid, 1982).

Segundo Gold e Zoch (1990), o uso de RONS, ou qualquer outro caráter, como um meio para inferir relações filogenéticas depende em grande parte da estabilidade deste caráter e do grau no qual ele varia dentro de um taxon. As informações ditas acima refletem a não aplicabilidade do aspecto número de RONS para auxiliar na explicação de posicionamentos taxonômicos, exceção feita às inferências entre populações de uma mesma espécie. Em adição, Glover (1983) ressalta que os genes ribossômicos têm, de fato, sido extremamente conservados e mostram considerável homologia entre as espécies.

Galetti Jr. (1998) afirma que vários grupos de peixes apresentam padrões conservados de distribuição das RONS, ao passo que outros grupos apresentam variações na localização de tais regiões. Em peixes neotropicais, a RON aparece como um traço heterogêneo, ocorrendo num único par de cromossomos em alguns grupos ou em vários pares em outros (Bertollo, 1996).

5.2 – RAPD e estrutura populacional

A espécie *Arapaima gigas* que ocorre na bacia hidrográfica Tocantins-Araguaia está sujeita aos processos naturais particulares desta. Nesta região há uma variação cíclica de períodos de cheia e de seca. Na seca, as margens do

rio Araguaia são caracterizadas pela formação de lagoas, que podem ser perenes ou temporárias, onde ficam retidas aglomerações das diversas espécies de peixes que ocorrem na região. Esse regime sazonal determinou a realização do transporte de peixes das lagoas temporárias para lagoas perenes. Essa atividade é uma tentativa de manejo a fim de promover a conservação da ictiofauna, sobretudo do pirarucu, onde um certo número de indivíduos seriam salvos e passariam a ocupar um local protegido e com disponibilidade de alimentos.

Nesta região, considerando o pouco deslocamento característico da espécie *Arapaima gigas* e à possível utilização, por este peixe, das lagoas para proteção e alimentação, poderia-se encontrar diferentes populações de pirarucu utilizando sítios preferenciais para acasalamentos e desovas. Entretanto, comparando duas amostragens feitas com o intervalo de um ano, encontrou-se alta similaridade genética entre elas, que pode ser resultado da atividade de transporte da lagoa temporária para a perene, ou pode refletir uma similaridade pré-existente, sugerindo a ocorrência de uma população única na área estudada.

Segundo Menezes (1951) a reprodução do pirarucu na natureza ocorre no período de chuvas, quando o nível de água sobe. Assim, o regime de cheias da região de estudo pode ser um facilitador da ocorrência de uma única população de pirarucu e de cruzamentos aleatórios na população nos diferentes anos, sendo que este processo pode ser uma possível justificativa da variabilidade genética intra-populacional significativa encontrada na espécie *Arapaima gigas* no Médio Araguaia.

Os resultados do presente estudo sugerem que a transferência de peixes durante o período de seca, realizada por proprietários de fazendas e até mesmo pelo IBAMA, pode não representar perigo para a conservação da espécie *Arapaima gigas* na região do Médio Araguaia, se houver uma única população na área.

Outras possíveis implicações negativas do transporte de peixes de uma lagoa para outra no período de seca do Médio Araguaia podem estar nas características ecológicas, tais como o desequilíbrio na proporção de peixes carnívoros e forrageiros nas regiões de manejo. O aumento da aglomeração de predadores piscívoros, como o pirarucu, resultaria numa maior pressão de caça

em espécies forrageiras e de competição entre espécies carnívoras. Esses impactos ainda necessitam ser estudados no Médio Araguaia, com trabalhos de enfoque genético e ecológico acerca das diversas espécies de peixes da mesma região de ocorrência do pirarucu. Faltam, ainda, estudos sobre o impacto do transporte sobre o peixe, considerando o estresse e possíveis danos físicos resultantes do manuseio.

Estudos de genética molecular em *Arapaima gigas* são praticamente inexistentes, sendo um único registro os resultados publicados por Farias *et al* (2003), que utilizaram 14 marcadores moleculares de microssatélites para determinar níveis de variabilidade genética das populações da bacia amazônica e registraram um alto nível de variabilidade intra-populacional, o que significa, segundo os autores, que a população estudada tem condições genéticas satisfatórias para se manter no ambiente.

Neste trabalhos foram utilizados marcadores RAPD e análises estatísticas baseadas na medida de distância genética formulada por Nei (1972, 1978) e de similaridade de Jaccard (1901), afim de verificar uma possível estruturação de populações de *Arapaima gigas*. As medidas de distância genética têm sido largamente utilizadas em estudos de genética evolutiva, para descrever estrutura de populações de uma espécie ou para determinar as relações evolutivas entre espécies (Barker, 1994). Como a maioria dos procedimentos estatísticos usa frequências alélicas preferencialmente às frequências genotípicas, Ferguson *et al.* (1995) explicaram que é necessário considerar que a amostra está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, de outro modo as frequências alélicas não seriam representações verdadeiras.

A validação do uso de RAPD como marcador para estudos de estrutura populacional em peixes brasileiros pode ser fortalecida pelos resultados de Sanches (2002), que registrou a ocorrência de estruturação de populações de *Brycon microlepis*, com variação genética significativa numa sub-bacia do rio Miranda, região de Bonito/Serra da Bodoquena no estado do Mato Grosso do sul. Também Hatanaka e Galetti Jr. (2003) encontraram populações estruturadas em *Prochilodus marggravii*, coletado na região da barragem de Três Marias (MG) no rio São Francisco. Resultados semelhantes foram registrados por Wasko (2000) em *Brycon lundii*, também coletado na região de Três Marias.

No processo de estruturação de populações está implícita a aquisição de características adaptativas em resposta às variações ambientais (por fatores bióticos e abióticos) ou processos históricos. Duas ou mais populações de uma dada espécie podem estar separadas por barreiras geográficas ou genéticas. Os estudos em biologia evolutiva geralmente têm por meta a compreensão de padrões e processos históricos ou a caracterização de processos atuais relacionados ao surgimento, manutenção e transformação da diversidade genética, morfológica, filogenética, biogeográfica, ecológica ou comportamental (Eizirik, 1996). Hatanaka e Galetti Jr. (2003) consideraram padrões comportamentais de migração reprodutiva e alterações do ambiente pela construção de barragem, para explicar a estruturação de populações na espécie *Prochilodus marggravii*, na região de Três Marias no rio São Francisco.

A capacidade de se adaptar é considerada extremamente dependente da presença de variabilidade genética nas populações selvagens dos diversos grupos animais e vegetais. Gilpin e Soulé (1986) explicaram que a perda da variabilidade genética associada com endogamia e “direcionamento genético” aumenta a probabilidade de extinção de pequenas populações. Segundo Vrijenhoek *et al.* (1985), populações depauperadas geneticamente têm sua viabilidade reduzida. Entretanto, Vrijenhoek (1994) ressaltou que faltam evidências de que estes fatores tenham causado extinção na natureza. Para Hughes (1991), a perda da diversidade não seria uma causa para preocupação visto que a maioria dos polimorfismos genéticos são seletivamente neutros.

Segundo Reed e Bryant (2000), a manutenção da variabilidade genética adequada para que ocorram respostas evolutivas a longo prazo depende do balanço entre o “input” de variação causado por novas mutações e a perda da variação por meio de seleção. Isto ocorre concomitantemente às modificações das características ambientais e eventos particulares de uma dada população que podem influenciar a sua variabilidade genética.

A região onde foi coletada a amostra do presente estudo é fortemente impactada pela pesca, caça e uso da terra para agricultura e pecuária. A ocorrência de variabilidade genética na população de *Arapaima gigas* estudada é um bom indicativo de que apesar da intensa pressão de pesca nessa espécie e alterações no ambiente, este peixe tem características genéticas que possibilitam a sua permanência naquela região.

Assim, relacionando as características genéticas às características ambientais citadas, os resultados do presente estudo podem ser utilizados na elaboração de programas de manejo visando a conservação da espécie *Arapaima gigas* na região do Médio Araguaia.

Em estoques pesqueiros que sofrem intensa pressão de exploração, a redução do tamanho da população é um evento característico. As populações de pirarucu da bacia hidrográfica Tocantins-Araguaia estão sujeitas à pesca em grande escala, sendo necessário avaliar a capacidade de suporte desses estoques pesqueiros. A amostragem do presente estudo aproveitou a atividade de transferência de peixes de uma lagoa secando para uma lagoa perene e a detecção de variabilidade genética significativa nesta amostra valida a idéia de que há a capacidade de permanência daquela população no ambiente e o seu papel de excelente modelo para programas de manejo, sobretudo quando consideramos as características biológicas da espécie.

Farias *et al.* (2003) sugeriram a ocorrência de redução da população de *Arapaima gigas* da região amazônica com base em análises de marcadores microssatélites, nas quais registraram uma deficiência nos níveis de heterozigosidade e conseqüente desequilíbrio gênico. Entretanto, apesar desses resultados, os autores ressaltam que esta espécie possui um grande potencial para recuperação, o que também pode ser inferido para as populações de pirarucu do Médio Araguaia com base nos resultados do presente estudo.

Segundo Ferguson *et al.* (1995), em populações pequenas isoladas a variabilidade genética pode ser substancialmente reduzida po meio do direcionamento genético e consangüinidade resultando na perda de alelos e declínio na heterozigosidade e na diminuição do fitness (valor adaptativo) e eventual extinção. A redução do tamanho de uma população é a característica mais evidente e indicadora da reação da mesma às pressões do ambiente. Este evento a torna mais suscetível à extinção (Shaffer, 1981), promovendo a diminuição do número de acasalamentos e/ou facilitando a ocorrência de endogamia, alterando o grau de variabilidade genética até um nível prejudicial para sua capacidade de permanência no ambiente. Esse processo pode ter efeitos mais fortes em ambientes impactados, levando até mesmo à extinção de populações ou espécies.

Segundo Reed e Bryant (2000), flutuações no tamanho e redução de variabilidade genética são provavelmente comuns em muitas populações naturais

O pirarucu não realiza migrações rio acima no período de reprodução. Os deslocamentos desta espécie são curtos, baseados na procura por alimento e abrigo e podem variar sazonalmente ou com a fase de vida do peixe. Assim, no Médio Araguaia, onde o regime de cheias permite a formação de nichos para o pirarucu nas distintas fases jovem e adulta, observa-se a facilidade de encontro entre machos e fêmeas, com abundância de locais propícios ao desenvolvimento dos alevinos e juvenis, com proteção e sem restrições de alimentação. Essa característica de pouco deslocamento desta espécie foi registrada por Crossa (2001) que utilizou radiotelemetria durante um período de cerca de seis meses para monitorar o deslocamento de espécimes de *Arapaima gigas* em lagos de várzea da região Amazônica.

6 - CONCLUSÕES

No presente estudo, concluiu-se que:

1 - A espécie *Arapaima gigas* do Médio Araguaia apresenta $2n=56$ cromossomos, reforçando a idéia de que o número diplóide basal dos teleósteos é superior a $2n=48$. Em adição, não foi registrada a presença de sistema cromossômico de diferenciação sexual. Com relação à região organizadora de nucléolos, a espécie apresenta RON simples, com polimorfismo estrutural de tamanho. A heterocromatina constitutiva foi localizada em blocos centroméricos na maioria dos cromossomos do cariótipo.

2 – De acordo com os resultados da metodologia RAPD-PCR, as amostras estudadas apresentam entre si uma grande homogeneidade genética, que pode indicar a ocorrência de uma única população na área estudada ou pode ser reflexo da atividade de transporte dos peixes de uma lagoa temporária (local da primeira amostra) para uma lagoa perene (local da segunda amostra). O uso de marcadores RAPD revelou, ainda, alto grau de variabilidade genética dentro da amostra utilizada, que pode indicar que o transporte de peixes não está afetando negativamente a conservação da espécie. Entretanto, não se pode afirmar que esta atividade esteja promovendo a conservação do pirarucu na região de estudo.

3 – Os resultados do presente estudo representam contribuições importantes para o conhecimento das características genéticas de *Arapaima gigas*, além de fornecerem importantes subsídios para programas de manejo que visem a conservação ou a exploração sustentável da espécie no Médio Araguaia/MT.

7 - REFERÊNCIAS

- AKINORI, T.; YOSHIO, O. C-banded karyotype and nucleolus organizer regions of a notopterid fish, *Notopterus chitala* (Notopteridae, Osteoglossiformes). **Chromosome-science**, v. 2, n. 1, p. 35-38, 1998.
- ALLENDORF, F. W. Genetics: defining the units of conservation. **Am Fish Soc Symp**, v. 17, p. 247-248, 1995.
- ANGERS, B.; BERNATCHEZ, L.; ANGERS, A.; DESGROSEILLERS, L. Specific microsatellite loci for brook charr reveal strong population subdivision on a microgeographic scale. **J. Fish Biol.**, v. 47, p. 177-185, 1995.
- ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora. 2001.
- BANKS, M. A.; BLOUIN, M. S.; BALDWIN, B. A.; RASHBROOK, V. K.; FITZGERALD, H. A.; BLANKENSHIP, S. M.; HEDGECOCK, D. Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Heredity**, v. 90, n. 2, p. 281-288, 1999.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, v. 73, p. 117-123, 1994.
- BARKER, J. S. F. Animal breeding and conservation genetics. In: LOESCHCKE, V.; TAMIUK, J.; JAIN, S. K. **Conservation genetics**. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1994.
- BARTHEM, R. B.; PETRERE Jr., M.; ISAAC, V.; RIBEIRO, M. C. L. de B.; McGRATH, D. G.; VIEIRA, I. J. A.; BARCO, M. V. A pesca na Amazônia: problemas e perspectivas para o seu manejo. In: VALLADARES-PADUA, C.; BODMER, R. E.; CULLEN JR., LAURY. **Manejo e Conservação de Vida Silvestre no Brasil**. Brasília, D. F.: CNPq/Belém, PA: Sociedade Civil Mamirauá, 1997.
- BAYLEY, P. B. Fish yield from the Amazon in Brazil: comparisons with Africa riREV yields and management possibilities. Transactions of**

American Fish Society, v. 110, p. 51-359, 1981.

- BEACHAM, T. D.; MILLER, K. M.; WITHLER, R. E. Minisatellite DNA variation and stock identification of coho salmon. **J. Fish Biol.**, v. 49, n. 3, p. 411-429, 1996.
- BERTOLLO, L. A. C. The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. Na uncommon situation in the genus *Hoplias*. **Cytologia**, v. 61, p. 75-81, 1996.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA FILHO, O. Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 1, n. 2, p. 103-120, 1978.
- BORGES, D. R. **Rio Araguaia, corpo e alma**. São Paulo: IBRASA Editora da Universidade de São Paulo, 1987.
- BORN, G. G. **Estudo da diversidade cariotípica no grupo *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Cariótipo 2n=42**. 2000. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- BRUM, M. J. I.; GALETTI JR., P. M. Teleostei ground plan karyotype. **J. Comp. Biol.**, v. 2, n. 2., p. 91-102, 1997.
- CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO-FILHO, S. de A. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Genet. Mol. Biol.**, v. 23, n. 1, p. 127-130, 2000.
- CALLEJAS, C.; OCHANDO, M. D. Identification of spanish barbel species using the RAPD technique. **J. Fish Biol.**, v. 53, p. 208-215, 1998.
- CAVIN, L.; FOREY, P. L. Osteology and systematic affinities of *Palaenotopterus greenwoodi* Forey 1997 (Teleostei: Osteoglossomorpha). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 1333, n. 1, p. 25-52, 2001.
- CHENOWETH, S. F.; HUGHES, J. M. Genetic population structure of the catadromous Perciform: *Macquaria novemaculeata* (Percichthyidae). **Journal of Fish Biology**, v. 50, n. 4, p. 721-733, 1997.

-
- CLIFFORD, S. L.; MCGINNITY, P.; FERGUSON, A. Genetic changes in na Atlantic salmon population resulting from escaped juvenile farm salmon. **Journal of Fish Biology**, v. 52, n. 1, p. 118-127, 1998.
- COMINCINI, S.; SIRONI, M.; BANDI, C.; GIUNTA, C.; RUBINI, M.; FONTANA, F. RAPD analysis of systematic relationships among the Cervidae. **Heredity**, v. 76, p. 215-221, 1996.
- CROSSA, M. M. Radiotelemetria do pirarucu (*Arapaima gigas*) em lagos de várzea do município de Santarém – Pará. In: **XIV ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA**, São Leopoldo, 2001.
- DENTON, T. E. **Fish chromosome methodology**. Illinois: C. C. Thomas Publ., 1973.
- DERGAM, J. A.; PAIVA, S. R.; SCHAEFFER, C. E.; GODINHO, A. L.; VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 379-387, 2002.
- DINESH, R. R.; LIM, T. M.; CHUA, K. L.; CHAN, W. K.; PHANG, P. E. RAPD analysis: Na efficient method of DNA fingerprinting in fishes. **Zoological Science**, v. 10, p. 849-954, 1993.
- EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 4, p. 23-29, 1996.
- ELMEROT, C.; ARNASON, U.; GOJOBORI, T.; JANKE, A. The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. **Gene**, v. 295, p. 163-172, 2002.
- EMDE, G. V. D.; PRECHTL, J. C. Anatomical connections of auditory and lateral line areas of the dorsal telencephalon (Dm) in the osteoglossomorph teleost, *Gnathonemus petersii*. **Brain Research**, v. 818, n. 2, p. 355-367, 1999.
- ESTOUP, A.; PRESA, P.; KRIEG, F.; VAIMAN, D.; GUYOMARD, R. (CT)_n and (GT)_n microstellite: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown

-
- trout). **Heredity**, v. 71, p. 488-496, 1993.
- FAO. **Seminar/study tour in the USSR on genetic selection and hybridization of cultivated fishes**. FAO/UNDP (TA) (2926), 1971.
- FARIAS, I.; HRBEK, T.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I; PORTO, J.; MEYER, A. Avaliação da variabilidade genética das populações de *Arapaima gigas* (pirarucu) da Bacia Amazônica através de marcadores moleculares de microssatélites. In: **XV ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA**. São Paulo, 2003.
- FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; SANTOS, E. B. P. dos; VALENTIM, F. C. S. Cytogenetic studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Sciaenidae) from the Central Amazon. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 351-356, 1999.
- FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. **Revista Brasileira de Genética**, v. 11, n. 4, p. 847-852, 1988.
- FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C.; CESAR, A. C.; DIAS, A. L.; BERTOLLO, L. A. C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, v. 44, p. 161-166, 1991.
- FERGUSON, A.; TAGGART, J. B.; PRODÖHL, P. A.; McMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R. A. Population and conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 47, n. A, p. 103-126, 1995.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995.
- FIELDS, J. H. A.; DRIEDZIC, W. R.; FRENCH, C. J.; HOCHACHKA, P. W. Kinetic properties of glutamate dehydrogenase from gills of *Arapaima gigas* and *Osteoglossum bicirrhosum*. **Canadian Journal of Zoology Revue Canadienne de Zoologie**, v. 56, n. 4, p. 809-813, 1978.
- FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu "*Arapaima gigas*" (CUVIER), em cativo (Actinopterygii, Osteoglossidae).

Revista Brasileira de Biologia, v. 8, n. 4, p. 445-459, 1948.

FOWLER, H. W. **Os peixes de água doce do Brasil**. Vol. I. São Paulo: Departamento de Zoologia da Secretaria da Agricultura, 1948.

GALDAMESPORTUS, M. I.; NOBLE, R. W.; FARMER, M.; POWERS, D. A.; RIGGS, A.; BRUNORI, M.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H. Studies of the functional properties of the hemoglobins of *Osteoglossum bicirrhosum* e *Arapaima gigas*. **Comparative Biochemistry and Physiology a Physiology**, v. 62, n. 1, p. 145-154, 1979.

GALETTI JR., P. M. Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. **Ital. J. Zool.**, v. 65, p. 53-56, 1998.

GALETTI JR., P. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA FILHO, O. Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. **Caryologia**, v. 47, p. 289-298, 1994.

GALVIN, P.; MCKINNELL, S.; TAGGART, J. B.; FERGUNSON, A.; O'FARRELL, M.; CROSS, T. F. Genetic stock identification of Atlantic salmon using single locus minisatellite DNA profiles. **J. Fish Biol.**, v. 47, p. 186-199, 1995.

GILPIN, M. E.; SOULÉ, M. E. Minimum viable populations: processes of species extinction. In: SOULÉ, M. E. **Conservation biology: the science of scarcity and diversity**. Sunderland: Sinauer Associates, MA., 1986.

GLOVER, D. M. Genes for ribosomal RNA. In: MACLEAN, N.; GREGORY, S. P.; FLAVELL, R. A. **Eukaryotic genes (their structure, activity and regulation)**. Butterworths & Co Publishers Ltda., 1983.

GOLD, J. R.; ZOCH, P. K. Intraspecific variation in chromosomal nucleolus organizer regions in *Notropis chrysocephalus* (Pisces: Cyprinidae). **The Southwestern Naturalist**, v. 35, n. 2, p. 211-215, 1990.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v. 53, p. 37-50, 1975.

GOULDING, M. Amazonian fisheries. In: MORAN, E. F. **The dilemma of**

amazonian development. Bolder: Westview Press, 1983.

GRAVILETS, S.; HASTINGS, A. Founder effect speciation: a theoretical assesment. **Amer Nat**, v. 147, p. 466-491, 1996.

GREENWOOD, P. H.; LIEM, K. F. Aspiratory respiration in *Arapaima gigas* (Teleostei, Osteoglossomorpha): a reappraisal. **Journal of Zoology**, v. 203, n. 3, p. 411-425, 1984.

GREENWOOD, P. H.; ROSEN, D. E.; WEITZMAN, S. H.; MYERS, G. S. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 131, n. 4, 1966.

GUDGER, E. W. The giant fresh-water fishes of South America. **Sci. Monthly**, v. 57, p. 500-513, 1943.

HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 413-425, 1998.

HARRIS, P. M.; MAYDEN, R. L. Phylogenetics relationships of major clades of Catostomidae (Teleostei: Cypriniformes) as inferred from mitochondrial SSU and LSU rDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, n. 2, p. 225-237, 2001.

HATANAKA, T.; GALETTI JR, P. M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwaterfish species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 19-25, 2003.

HAYMER, D. S. Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: what are they, and can they tell us anything we don't really know? **Ann Entomol Soc Am**, v. 87, p. 717-722, 1994.

HOCHACHKA, P. W.; SCHNEIDER, D. E.; STOREY, K. B. Hydrogen shuttles in gills of water versus air breathing osteoglossids. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Moecular Biology**, v. 63, n. 1, p. 57-61, 1979.

HONCZARYK, A.; MAEDA, L. S. Crescimento do pirarucu, *Arapaima gigas*, utilizando dieta a base de ensilado biológico do pescado. In: **ANAIS DO**

AQUICULTURA BRASIL, 1998.

- 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, p. 1014-1015, 1980.
- HSU, T. C.; SPIRITO, S. E.; PARDUE, M. L. Distribution of 18s + 28s ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma**, v. 53, p. 25-36, 1975.
- HUGHES, A. L. MHC polymorphism and the design of captive breeding programs. **Cons. Biol.**, v. 5, p. 249-251, 1991.
- INNOCENCIO, N. R. Hidrografia. In: FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), REGIÃO CENTRO-OESTE. **Geografia do Brasil 1**. Rio de Janeiro: IBGE, 1989.
- INOUE, J. G.; MIYA, M.; TSUKAMOTO, K.; NISHIDA, M. A. Mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, n. 2, p. 275-285, 2001.
- ISAACKS, R. E.; KIM, H. D.; BARTLETT, G. R.; HARKNESS, D. R. Inositol pentaphosphate in erythrocytes of a freshwater fish, pirarucu (*Arapaima gigas*). **Life Sciences**, v. 20, n. 6, p. 987-990, 1977.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bull Soc Valdoise Sci Nat**, v. 37, p. 547-579, 1901.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.
- JHANWAR, S. C.; PRENSKY, W.; CHAGANTI, R. S. K. Localization and metabolic activity of ribosomal genes in Chinese hamster meiotic and mitotic chromosomes. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 30, p. 39-46, 1981.
- KOH, T. L.; KHOO, G.; FAN, L. Q.; PHANG, V. P. E. Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of *Discus* (*Symphysodon* spp.) as revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. **Aquaculture**, v. 173, p. 485-497, 1999.

-
- LÊ, H. L. V.; LECONINTRE, G.; PERASSO, R. A. 28S rRNA-based phylogeny of the gnathostomes: first steps in the analysis of conflict and congruence with morphologically based cladograms. **Mol. Phylog. Evol.**, v. 2, n. 1, p. 31-51, 1993.
- LUCCHINI, S.; NARDI, I. DE; BARSACCHI, G.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. **Genome**, v. 36, p. 762-773, 1993.
- LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Mol. Ecol.**, v. 3, p. 91-99, 1994.
- MARTINS, C.; GALETTI JR, P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res.**, v. 7, p. 363-367, 1999.
- MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 33-38, 2003.
- MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. dos S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2001.
- MATTOS, K. M. da C.; FERRETTI FILHO, N. J.; MATTOS, A. M. Uma abordagem conceitual sobre a valoração econômica de recursos naturais. In **Anais do III Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal**. Corumbá/MS, 2000.
- MENEZES, R. S. de. **Notas biológicas e econômicas sobre o pirarucu**. Série estudos técnicos – nº 3. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1951.
- MEUNIER, F. J. Structure and mineralization of the scales in some Osteoglossidae (Osteichthyes, Teleost). **Annales Des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale**, v. 6, n. 2, p. 111-124, 1984.
- MICHAEL, D.; PHILLIPS, R. B. Phylogenetic analysis of Pacific salmon (Genus *Oncorhynchus*) based on mitochondrial DNA sequence data. **Molecular**

Phylogenetics and Evolution, v. 4, n. 4, p. 366-371, 1995.

MOLINA, W. F.; GALETTI JR., P. M. Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5s rRNA genes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 373-377, 2002.

MORITA, T. Molecular phylogenetic relationships of the deep-sea fish genus *Coryphaenoides* (Gadiformes: Macrouridae) based on mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 13, n. 3, p. 447-454, 1999.

MOXON, E. R.; WILLS, C. DNA microsatellites: Agents of evolution? **Scientific American**, p. 72-77, 1999.

MOYSÉS, C. B.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. de. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 401-407, 2002.

NAGL, S.; TICHY, H.; MAYER, W. E.; SAMONTE, I. E.; McANDREW, B. J.; KLEIN, J. Classification and phylogenetic relationships of African tilapia fishes inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, n. 3, p. 361-374, 2001.

NAKAMURA, Y.; LAPPERT, M.; O'CONNELL, N.; WOLFF, R.; HOLM, M.; CULVER, M.; MARTIN, C.; FUJIMOTO, E.; HOFF, M.; KUMLIM, E.; WHITE, R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, v. 235, p. 1616-1622, 1987.

NAYYAR, R. P. Karyotype studies in the genus *Notopterus* (Lacepede). The occurrence and fate of univalent chromosomes in spermatocytes of *N. chitala*. **Genetica**, v. 36, p. 398-405, 1965.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NEI, M. Genetic distance between populations. **Am. Nat.**, v. 106, p. 283, 1972.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

-
- NIKOLSKY, G. V. **The ecology of fishes**. London: Academic Press INC. Ltd., 1976.
- O'CONNELL, M. O.; SKIBINSKI, D. O. F.; BEARDMORE, J. A. Genetic variation in stocked populations of Atlantic salmon. **Aquaculture**, v. 137, n. 1-4, p. 54-55, 1995.
- O'REILLY, P.; WRIGHT, J. M. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. **Journal of Fish Biology**, v. 47, n. A, p. 29-55, 1995.
- OBERMILLER, L. E.; PFEILER, E. Phylogenetic relationships of elopomorph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**., v. 26, n. 2, p. 202-214, 2003.
- OHNO, S.; WOLF, U.; ATKIN, N. B. Evolution from fish to mammals by gene duplication. **Hereditas**, v. 59, p. 169-187, 1968.
- OJIMA, Y.; UIENO, K.; HAYASHI, M. A reiew of the chromosome numbers in fishes. **La Kromosomo**, v. 2, p. 19-47, 1976.
- OLIVEIRA, C.; TOLEDO, L. F. A.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO FILHO, S. de A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 11, n. 3, p. 577-624, 1988.
- OSTBERG, C. O.; THORGAARD, G. H. Geographic distribution of chromosome and microsatellite DNA polymorphisms in *Oncorhynchus mykiss* native to Western Washington. **Copeia**, v. 2, p. 287-298, 1999.
- PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M. D.; BOOTON, G. C.; FUERST, P. A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 361-382, 1998.
- PATTERSON, C.; ROSEN, D. E. Review of ochthyodectiform and other Mesozoic teleost fishes and the theory and practice of classifying fossils. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.**, v. 158, p. 81-172, 1977.
- PEARCE, D. W.; TURNER, R. K. **Economics of natural resources and the environment**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1991.

-
- PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, n. 1, p. 172-189, 2002.
- PEREIRA, S. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. **Genetics and Molecular biology**, v. 23, n. 4, p. 745 –752, 2000.
- PETRERE JR, M. Pesca na Amazônia. In **Seminário Internacional Sobre Meios Ambiente, Pobreza e Desenvolvimento na Amazônia SIMDAMAZÔNIA**. Belém, 1992.
- PIFFER, A.; OLIVIERI, A. M.; MORGANTE, M. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). **Genome**, v. 40, p. 411-419, 1997.
- PINESE, J. F. **Morfologia funcional da alimentação do pirarucu (*Arapaima gigas*)**. 1996. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- PINESE, J. F.; PERET, A. C. Biomecânica da alimentação do pirarucu (*Arapaima gigas*). In: **XIV Encontro Brasileiro de Ictiologia**. São Leopoldo, 2001.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.
- POTEAUX, C.; BONHOMME, F.; BERREBI, P. Microsatellite polymorphism and genetic impact of restocking in Mediterranean brown trout (*Salmo trutta* L.). **Heredity**, v. 82, p. 645-653, 1999.
- PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO JR, H. F.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V. DE; CARRER, H.; CARRARO, D. M.; PRIOLI, L. M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.
- REED, D. H.; BRYANT, E. H. Experimental tests of minimum viable population

-
- size. **Animal Conservation**, v. 3, p. 7-14, 2000.
- RIBEIRO, M. C. L. B.; PETRERE JR., M. Fisheries ecology and management of the jaraqui (*Semaprochilodus taeniurus*, *S. insignis*) in the central amazonia. **Regulated Rivers and Management**, v. 5, p. 195-215, 1990.
- ROHLF, F. J. **NTSYS – PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Applied Biostatistics**. New York: Steauket, 1993.
- RUIZ, I. R. G. Organizadores nucleolares e evolução cariotípica em anfíbios diplóides. **Ciênc. Cult.**, v. 34, p. 270-273, 1982.
- RYMAN, N. Conservation genetics considerations in fishery management. **Journal of Fish Biology**, v. 39, n. A, p. 221- 224, 1991.
- SAIDEL, W. M.; BRAFORD, M. R. Jr. Fundal variations in the eyes of the Osteoglossomorph fishes. **Brain Behavior and Evolution**, v. 27, n. 2-4, p. 80-92, 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2a. Ed. New York: Cold-Spring Harbor Laboratory press, 1989.
- SANCHES, A. **Análise de RAPD em *Brycon microlepis* (Characidae): um estudo populacional e suas implicações na conservação da espécie**. 2002. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- SANFORD FLS, C. P. The novel tongue-bite apparatus in the knifefish family Notopteridae (Teleostei: Osteoglossomorpha): are kinematic pattern conserved within a clade? **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 132, n. 2, p. 259-275, 2001.
- SCHLÖTTERE, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. In: DESALLE, R.; SCHIERWATER, B. **Molecular approaches to ecology and evolution**. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1998.

-
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. **Chromosoma**, v. 87, p. 327-344, 1982.
- SCHMID, M.; VITELLI, L.; BATISTONI, R. Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma**, v. 95, p. 271-284, 1987.
- SHAFFER, M. L. Minimum population sizes for species conservation. **Bioscience**, v. 31, n. 2, p. 131-134, 1981.
- SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy** San Francisco: Freeman W. H. Ed., 1973.
- SOLFERINI, V. N.; SCHEEPMACKER, D. S. Polimorfismos de isozimas. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2001.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyman Ltd., 1990.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, v.15, n. 5, p. 199-203, 2000.
- TAKAGI, M.; TANIGUSHI, N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis* and **A. bicolor**. **Fisheries Science**, v. 61, n. 5, p. 884-885, 1995.
- TESSIER, N.; BERNATCHEZ, L.; PRESA, P.; ANGERSS, B. Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon. **J. Fish Biol.**, v. 47, p. 156-163, 1995.
- TOLEDO FILHO, S. de A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. de; FORESTI, F.; GALHARDO, E.; DONOLA, E. **Cadernos de Ictiogenética 1: conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios**. São Paulo: USP, 1992.

-
- TOLEDO, V.; FERRARI, I. Estudo citogenético de três espécies do gênero *Pimelodus* (Pimelodidae, Pisces). **Cientifica**, v. 4, n. 2, p. 101-106, 1976.
- TRINGALI, M. D.; BERT, T. M.; SEYOUM, S.; BERMINGHAM, E.; BARTOLACCI, D. Molecular phylogenetics and ecological diversification of the Transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 13, n. 1, p. 193-207, 1999.
- TSUNEKI, K. A histologic survey of diencephalic circumventricular organs in teleosts with special reference to osteoglossomorphs. **Japanese Journal of Ichthyology**, v. 33, n. 1, p. 27-38, 1986.
- UYENO, T. A comparative study of chromosomes in the teleostean fish order Osteoglossiformes. **Jpn. J. Ichthyol**, v. 29, p. 211-217, 1973.
- VAL, A. L.; AFFONSO, E. G.; SOUZA, R. H. D. S.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. D.; MOURA, M. A. F. D. Inositol pentaphosphate in the erythrocytes of amazonian fish, the pirarucu (*Arapaima gigas*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, n. 5, p. 852-855, 1992.
- VERMA, R. S. **Heterochromatin: molecular and structural aspects**. New York: Cambridge University Press, 1988.
- VINÃS, A.; GÓMEZ, C.; MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ, L. Localization of rDNA genes in european eel (*Anguilla anguilla*) by FISH. **Genome**, v. 39, p. 1220-1223, 1996.
- VRIJENHOEK, R. C. Genetic diversity and fitness in small populations. In: LOESCHCKE, V.; TOMIUK, J.; JAIN, S. K. **Conservations Genetics**. Switzerland: Birkhäuser Revlag Basel, 1994.
- VRIJENHOEK, R. C.; DOUGLAS, M. E.; MEFFE, G. K. Conservation genetics of endangered fish populations. **Arizona. Science**, v. 229, p. 400-402, 1985.
- WARBURTON, D.; HENDERSON, A.S. Sequential silver staining and hybridization *in situ* of nucleolus organizer regions in human cells. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 24, p. 168-175, 1979.
- WASKO, A. P. **Marcadores cromossômicos e moleculares no gênero *Brycon***

(Characidae): uma contribuição à biologia evolutiva e à conservação biológica destes peixes. 2000. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Programa de Pós-Graduação em genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

WEST, J. L.; BAILEY, J. R.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; SIDELL, B. D.; DRIEDZIC, W. R. Activity levels of enzymes of energy metabolism in heart and red muscle are higher in north-temperate-zone than in Amazonian teleosts. **Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie**, v. 77, n. 5, p. 690-696, 1999.

WILSON, G. N. The structure and organization of human ribosomal genes. In: BUSCH, V. X. H.; ROTHBLUM, L. **The Cell Nucleus**. New York: Academic Press, 1982.

WOLF, C.; BURGENER, M.; HÜBNER, P.; LÜTHY, J. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, v. 33, p. 144-150, 2000.

WOSNITZAMENDO, C. The growth of *Arapaima gigas* (Cuvier) after stocking in a peruvian lake. **Archiv Fur Fischereiwissenschaft**, v. 35, n. 1-2, p. 1-5, 1984.

YEH, F.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE VERSION 1.31. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis.** 1999.

ZAHA, A.; SCHRANK, A.; FERREIRA, H. B.; SCHRANK, I. S.; RODRIGUES, J. J. S.; REGNER, L. P.; PASSAGLIA, L. M. P.; ROSSETTI, M. L. R.; RAUPP, R. M.; SILVA, S. C. da; GAIESKY, V. L. V. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.