



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU - CPGSS**  
**MESTRADO EM GENÉTICA**

**SARA GISELLE DE CÁSSIA ALEXANDRE GONDIM**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**  
**PARA *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)**

GOIÂNIA – GOIÁS – BRASIL

- ABRIL DE 2010 -

**SARA GISELLE DE CÁSSIA ALEXANDRE GONDIM**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES  
PARA *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA  
DE MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA  
UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS, COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mariana Pires de Campos Telles

- ORIENTADORA -

M.Sc. Lucileide Vilela Resende

- CO-ORIENTADORA -

GOIÂNIA – GOIÁS – BRASIL

- ABRIL DE 2010 -

**Aos meus pais, Antônio Carlos Gondim e Euripa Alexandre Gondim, pelo amor, incentivo, compreensão, paciência e por estarem presentes em todos os momentos de minha vida, mostrando que é possível realizar vários sonhos.**

**Ao meu irmão, Halley Wesley Alexandre Gondim, pelos grandiosos conselhos, ajuda, incentivo, apoio e paciência a mim dedicado.**

**Ao meu namorado Rodrigo Roncato Pereira, pelo amor, incentivo, carinho, compreensão e paciência que a mim é dado incondicionalmente e pelo apoio de todas as horas, compartilhando momentos difíceis e alegres, contribuindo nesta trajetória.**

**D E D I C O.**

**Á DEUS, fonte de coragem, inspiração e vida, por ter me concedido sabedoria, saúde e força para buscar meus objetivos.**

**O F E R E Ç O.**

## A G R A D E C I M E N T O S

Acredito que a parte mais difícil seja agradecer a todos aqueles que tiveram papel importante durante a realização deste estudo. Agradeço:

Ao Departamento de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e a todos os docentes do curso de mestrado, pela dedicação e conhecimentos transmitidos;

Em especial à minha querida orientadora Professora Dra. Mariana Pires de Campos Telles, pelas orientações, confiança, conselhos, que com sabedoria, competência e paciência tornou mais rica essa minha caminhada;

À empresa Systema Naturae Consultoria Ambiental Ltda. pelo apoio financeiro concedido através do programa comunitário de bolsa de estudo do PROEX; em especial ao Dr. Nelson Jorge da Silva Junior, Ph.D., por acreditar em meu trabalho, estando sempre pronto e disposto a ajudar;

À Capes - coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior projeto nº 1418/2007- Ações novas fronteiras programa de cooperação acadêmica – Procad/NF;

À minha amiga e co-orientadora Lucileide pelas sugestões, orientações e principalmente pela paciência, sempre compartilhando o seu saber;

Aos responsáveis pelo Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade Federal de Goiás/ICB1, por cederem suas instalações e equipamentos para a realização deste trabalho;

Ao Laboratório de Biotecnologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Arroz e Feijão do estado de Goiás, por proporcionar parte do desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus amigos e colegas de laboratório que sempre se colocaram à disposição para realização deste estudo e pelas horas de descontração e trabalho; em destaque à Monik, Jacqueline, Felipe, Advaldo, Natácia, Dayane, Eliane, Thaís, Camila, Franciele, Kesler, e em especial à minha amiga Fernanda que sempre me deu força, ajuda, suporte e por sempre confiar em mim. Valeu de mais Fê;

Com muito carinho, aos professores Thannya, Talge, Rosane e Renato, por toda paciência durante nosso longo e constante convívio e por compartilharem seus conhecimentos para a melhor realização deste trabalho;

Ao meu pai Antônio e ao meu namorado Rodrigo pelo desempenho e diversão nas pescarias inesquecíveis;

À minha querida mãe Euripa por cuidar sempre carinhosamente de mim;

Ao meu irmão, Halley, por me ajudar a fazer os géis de acrilamida;

À minha querida sogra, Ângela, por sempre me apoiar e me dar muita força para seguir em frente;

À minha prima Lucimeire e minha linda afilhadinha Lívia por incansavelmente me ajudarem na pesca das traíras;

Aos proprietários do Sítio Mucunã, por estarem sempre prontos a ajudar;

E a todos aqueles que de uma forma direta ou indireta colaboraram na realização desse trabalho, fazendo parte da minha vida, tornando minha caminhada mais tranquila;

Minha eterna gratidão.

## **EPÍGRAFE**

**“Confia no Senhor de todo o teu coração e não te estribes no teu próprio entendimento.  
Reconhece-o em todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas veredas.”**

**Provérbios 3:5-6**

**“Não tenho medo das tempestades, pois estou aprendendo a manobrar meu barco.”**

**Louisa May Alcott**

## LISTA DE FIGURAS

F i g u r a s		P á g i n a
Figura 1.	(A) Caninos no maxilar superior e inferior, (Fonte: <a href="http://www.pesca.tur.br/page/3">www.pesca.tur.br/page/3</a> , 2008); (B) Nadadeira ventral e anal com 10 a 12 raios, (Fonte: Timm, 2008).	19
Figura 2.	<i>Hoplias malabaricus</i> (Fonte: <a href="http://peska.com.br/novopeska/">http://peska.com.br/novopeska/</a> , 2010).	20
Figura 3.	Deposição de ovos da espécie <i>Hoplias malabaricus</i> (Fonte: Prado et al., 2006).	21
Figura 4.	Idiograma parcial dos cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> . Destaque para o sistema de cromossomos sexuais, para o maior tamanho do cromossomo 1 dos cariótipos F e G e para a presença de um cromossomo acrocêntrico nos cariótipos E e G (seta) (Fonte: Bertollo et al., 2000; Pereira, 2005).	24
Figura 5.	Classificação dos microssatélites (A) perfeitos, (B) imperfeitos, (C) compostos (Fonte: Weber, 1990).	28
Figura 6.	Estratégia de sequenciamento Whole-genome shotgun (WGS), (Fonte: Waterston et al. 2001).	31
Figura 7.	Produção de leitura de sequenciamento de inserções terminais (Fonte: Griffiths et al. 2006).	32
Figura 8.	Leituras de sequencias pareadas para unir duas sequencias de contigs em um arcabouço ordenado e orientado (Fonte: Griffiths et al., 2006).	33
Figura 9.	Montagem de sequenciamento shotgun de genoma inteiro (Fonte: Griffiths et al., 2006).	34
Figura 10.	Localização da bacia hidrográfica do rio Caiapó, Goiás (Fonte: Google Earth, 2010; AGMA, 2004).	36
Figura 11.	Sítio Mucunã no Município de Hidrolândia, Goiás (Fonte: Google Earth, 2010).	37
Figura 12.	Lago Municipal (Lago do Sol) do município de Anicuns, Goiás (Fonte: Google Earth, 2010).	37
Figura 13.	Lago Serra da Mesa. Localizado no estado Goiás (Fonte: Google Earth, 2010).	38
Figura 14.	Número de sequencias aceitas (boa qualidade) e rejeitadas utilizando o software BIOFOCO.	44
Figura 15.	Porcentagem de tipos de motivos repetitivos nas 78 regiões microssatélites identificadas no genoma da espécie <i>Hoplias malabaricus</i> .	45
Figura 16.	Proporções das 25 regiões microssatélites escolhidas para a	47

espécie *Hoplias malabaricus*, de acordo com o tamanho do motivo.

- Figura 17. Perfil eletroforético, em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, de seis locos microssatélites polimórficos (Hmal-60, Hmal-34, Hmal-23, Hmal-46, Hmal-33 e Hmal-9) desenvolvidos para espécie *Hoplias malabaricus*. 48
- Figura 18. Escadas alélicas para a confirmação da altura dos alelos dos 14 locos microssatélites desenvolvidos para a espécie *Hoplias malabaricus*, onde 1.Hmal-71, 2.Hmal-69, 3.Hmal-9, 4.Hmal-23, 5.Hmal-15, 6.Hmal-39, 7.Hmal-26, 8.Hmal-46, 9.Hmal-33, 10.Hmal-60, 11.Hmal-59, 12.Hmal-72, 13.Hmal-11, 14.Hmal-34, analisados em gel de poliacrilameida 6%, corado com nitrato de prata. As colunas das extremidades de cada foto são os marcadores de massa molecular (10 pares de bases, da Invitrogen®). 49
- Figura 19. Frequências alélicas dos 14 locos microssatélites, estimadas a partir dos 48 indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus*. 51



## LISTA DE TABELAS

Tabelas		Página
Tabela 1.	Diversidade no tipo de unidade repetitiva de marcadores moleculares microssatélites (Tautz, 1989; Weber et al., 1990).	27
Tabela 2.	Área de coleta, local, código (Cód.), coordenadas geográficas (longitude e latitude) e altitude (m).	38
Tabela 3.	Protocolo das Reações em Cadeia da Polimerase demonstrando os reagentes utilizados e suas concentrações de uso e volumes, para um sistema de 15µl.	41
Tabela 4.	Programa de termociclagem para regiões microssatélites.	41
Tabela 5.	Sequências aceitas e rejeitadas por placa analisadas pelo software BIOFOCO.	45
Tabela 6.	Relação dos 14 locos microssatélites que apresentaram padrão eletroforético satisfatório para 48 indivíduos da espécie <i>Hoplias malabaricus</i> , contendo a temperatura de anelamento dos locos ( $T_a$ ); o número de alelos observados ( $N_a$ ) e a amplitude de variação do tamanho dos alelos em pares de base (AVA).	50
Tabela 7.	Frequências alélicas dos 14 locos microssatélites.	51
Tabela 8.	Relação dos 14 locos microssatélites que apresentaram padrão eletroforético satisfatório para 48 indivíduos da espécie <i>Hoplias malabaricus</i> , onde, ( $H_e$ ) e ( $H_o$ ) representam a heterozigosidade esperada e observada, respectivamente, ( $f$ ) é o índice de fixação e ( $p$ value) é o índice de significância para o teste de aderência às proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg.	53
Tabela 9.	Iniciadores desenvolvidos para a ordem Characiforme.	54
Tabela 10.	Número de indivíduos ( $n$ ), Número de alelos observados ( $N_a$ ), Probabilidade de exclusão de paternidade (PE), Probabilidade de identidade (PI).	55

## LISTA DE APÊNDICE

Apêndice		Página
Apêndice I.	78 regiões microssatélites com diferentes motivos de repetição.	70
Apêndice II.	78 sequências obtidas através da estratégia de sequenciamento aleatório a partir de bibliotecas shotgun.	73

## LISTA DE ANEXOS

A n e x o s		P á g i n a
Anexo I.	Protocolo de Extração SDS (Sodium dodecyi sulphete) fenol/clorofórmio.	85
Anexo II.	Construção da biblioteca Genômica.	86
Anexo III.	Procedimento de miniprep em placa por Lise Alcalina.	89
Anexo IV.	Reações de seqüenciamento.	91
Anexo V.	Protocolo de Coloração com Nitrato de Prata (Creste, et al., 2001).	92
Anexo VI.	Padronização das condições de amplificação, com ajuste nas condições para amplificação para loco Hmal 15.	93

## RESUMO

A espécie *Hoplias malabaricus*, pertencente à família Erythrinidae, representa uma das espécies de peixes characiformes com maior distribuição na região Neotropical. O grupo vem sendo considerado por diversos autores como um conjunto de espécies que necessita de uma revisão quanto à classificação. Para tanto, dentre outros, são necessários estudos genéticos, aumentando a quantidade de informações disponível para a espécie. Os marcadores microssatélites, por serem codominantes, multialélicos, abundantes e bem distribuídos ao longo do genoma, são eficientes para avaliar a variabilidade genética em populações naturais e para a realização de estudos de genética com aplicação em manejo e conservação. Este estudo utiliza uma estratégia de desenvolvimento de iniciadores para regiões microssatélites que se baseia no sequenciamento aleatório de fragmentos provenientes de uma biblioteca genômica “shotgun” para a detecção de regiões microssatélites, em *H. malabaricus* (traíra). Das 864 sequências obtidas, foram encontradas 78 regiões microssatélites que possibilitaram a construção de pares de iniciadores. Estas regiões são compostas por vários tipos de motivos de repetição, incluindo dinucleotídios, trinucleotídios, tetranucleotídios, pentanucleotídios. Os alelos apresentaram amplitude de variação de tamanho entre 136 a 236 pares de bases. Isto mostra que a estratégia de sequenciamento aleatório a partir de bibliotecas “shotgun” é interessante para a obtenção de regiões repetitivas com diferentes motivos. Dos 78 pares de iniciadores encontrados, 25 foram sintetizados para padronização e caracterização. Destes 25, apenas 14 apresentaram padrão de amplificação satisfatório, e dentre estes, seis (Hmal 9, Hmal 23, Hmal 33, Hmal 34, Hmal 46 e Hmal 60) apresentaram polimorfismos. Considerando os 14 locos avaliados, a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) apresentou uma média igual a 0,054 e a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) apresentou um valor médio igual a 0,246. Dentre os locos que apresentaram polimorfismos, apenas Hmal-9 apresentou desvios significativos para o teste de aderência às proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A estratégia de desenvolvimento de iniciadores a partir de biblioteca shotgun foi eficiente para a detecção de diferentes tipos de regiões microssatélites no genoma da espécie *Hoplias malabaricus*. Existe um baixo polimorfismos nos 14 locos microssatélites avaliados em 48 indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus*.

Palavras-chave: *Hoplias malabaricus*, marcadores microssatélites, iniciadores, biblioteca shotgun, polimorfismos

## ABSTRACT

*Hoplias malabaricus* is a characiforme fish (family Erythrinidae) with a wide distribution in the Neotropical region. The species has been considered by several authors as a group of species in urgent need of a taxonomic revision. Under this context, genetic studies are needed in order to increase the amount of information available for this species. Microsatellite markers are codominant, multiallelic, abundant and well distributed throughout the genome, and therefore are efficient to evaluate the genetic variability in natural populations. Also for conservation and management studies. This study uses a strategy of development of primers for microsatellite regions based on the sequencing of random fragments from a genomic library "shotgun" for the detection of microsatellite regions in *H. malabaricus*. From 864 sequences obtained, I found 78 microsatellite regions that allowed the construction of pairs of primers. These regions are composed of different types of repeat motifs, including dinucleotide, trinucleotides, tetranucleotides and pentanucleotides. Alleles varied in size from 136 to 236 base pairs. This shows that the strategy of random sequence from libraries "shotgun" is interesting to obtain repetitive regions with different motives. From 78 pairs of primers found, 25 were synthesized for standardization and characterization. Of these 25, 14 had satisfactory standard of amplification, and among these, six (Hmal-9, Hmal-23, Hmal-33, Hmal-34, Hmal-46 and Hmal-60) showed polymorphisms. Considering the 14 loci evaluated, the observed heterozygosity ( $H_o$ ) had a mean of 0.054 and expected heterozygosity ( $H_e$ ) had a mean value equal to 0.246. Among the loci that showed polymorphisms, only the reported Hmal-9 showed significant deviations for the test of adherence to the proportions expected for the Hardy-Weinberg. The strategy of development of starters from library shotgun was efficient for the detection of different types of regions microsatellites in the genome of the species *Hoplias malabaricus* exists low polymorphisms in the 14 locos microsatellites evaluated in 48 individuals.

Keywords: *Hoplias malabaricus*, microsatellite markers, initiators, library shotgun, polymorphism

## SUMÁRIO

	P á g i n a
<b>Lista de Figuras</b>	vii
<b>Lista de Tabelas</b>	ix
<b>Lista de Apêndice</b>	x
<b>Lista de Anexos</b>	xi
<b>Resumo</b>	xii
<b>Abstract</b>	xiii
<b>Sumário</b>	xiv
<b>1. Introdução</b>	15
<b>2. Objetivos</b>	17
<b>3. Revisão Bibliográfica</b>	18
3.1. Características ecológicas, evolutivas e biologia da espécie <i>Hoplias malabaricus</i>	18
3.2. Desenvolvimento de marcadores microsatélites	24
<b>4. Material e Métodos</b>	36
4.1. Áreas de coleta das amostras	36
4.2. Coleta do material biológico e extração do DNA	38
4.3. Construção da biblioteca Genômica e sequenciamento	39
4.4. Caracterização da variabilidade genética presente nos locos padronizados	42
<b>5. Resultado e Discussão</b>	44
5.1. Busca de regiões microsatélites em sequências genômicas de <i>Hoplias malabaricus</i>	44
5.2. Caracterização dos locos microsatélites desenvolvidos para <i>Hoplias malabaricus</i>	46
<b>6. Conclusão</b>	56
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	57
<b>8. Apêndice</b>	70
<b>9. Anexos</b>	85

## 1. INTRODUÇÃO

A Região Neotropical é considerada como a mais rica em número de espécies de peixes de água doce do mundo (Schaffer, 1998), no entanto o conhecimento de sua ictiofauna é bastante limitado (Menezes, 1972; Böhlke et al., 1979; Bussing, 1985; Kaufman, 1992; Reis, 1997; Albert, 1998; Laurence, 1998; Malabarba, 1998).

Devido ao fato de as informações existentes em relação à diversidade da ictiofauna da região Neotropical ser muito fragmentada, há relativamente poucos estudos sobre a sistemática de grandes grupos taxonômicos (Buckup et al., 1983; Oyakawa, 2003), portanto a falta de conhecimento afeta diretamente a compreensão da história filogenética das espécies e de suas adaptações ecológicas e fisiológicas ao ambiente, o que impede a interpretação correta dos dados experimentais quando aplicados a espécies de ampla distribuição (Laurence, 1998).

A família Erythrinidae compreende um pequeno grupo de Characiformes, e é composta pelos gêneros *Erythrinus*, *Hoplerythrinus* e *Hoplias* (Oyakawa, 2003), que estão distribuídos pela região neotropical e apresentam um grande número de espécies endêmicas às Américas do Sul e Central, principalmente em ambientes lênticos (Oyakawa, 2003).

No gênero *Hoplias*, encontramos a espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), popularmente conhecida como traíra, um peixe neotropical (Nelson, 1994). A traíra é um predador que apresenta o corpo cilíndrico com uma leve depressão lateral, nadadeira dorsal angular, cabeça bastante longa, boca ampla e mandíbulas proeminentes, com dentes fortes e cônicos, com presença de caninos. Os olhos são circulares e estão dispostos na metade proximal da cabeça. A porção dorsal da cabeça mostra-se mais escura do que a ventral, assim como o restante do corpo, que varia desde marrom escuro a bege claro (Morellí, 1998). É um animal de hábitos bentônicos, sendo encontrado em rios e lagoas, principalmente em ambientes de águas rasas e próximo à vegetação submersa ou marginal (Sabino & Zuanon, 1998).

Diferenças genéticas têm sido documentadas para o gênero *Hoplias* desde os primeiros trabalhos de Bertollo et al. (1978; 2000). A espécie *Hoplias malabaricus* apresenta uma grande homogeneidade morfológica e grande diversidade cariotípica com o número de cromossomos variando de  $2n=39$  a  $2n=42$  (Oyakawa, 2003). Desta forma pode-se dizer que há grandes divergências dentro da espécie. Para uma melhor identificação da diversidade genética e um melhor conhecimento da espécie *Hoplias malabaricus*, desde o final da década de 70 estão sendo feitos estudos utilizando ferramentas moleculares.

Nos últimos anos todas as teorias propostas e desenvolvidas nas áreas de biologia molecular e genética, permitiram o desenvolvimento de técnicas laboratoriais e biotecnológicas bastante eficientes, que se integraram a toda teoria ecológica e evolutiva permitindo o emprego das técnicas moleculares na reconstrução filogenética, inferências evolutivas e obtenção de informações que subsidiam a elaboração de programas de manejo e conservação de áreas e das espécies (Mullis & Faloona, 1987; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores moleculares têm se mostrado uma poderosa ferramenta para o estudo de populações naturais, auxiliando no descobrimento de muitos parâmetros genéticos importantes para a conservação ou para a utilização dos recursos genéticos das diversas espécies (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Telles et al., 2003). Neste contexto, os marcadores moleculares são utilizados como ferramentas capazes de fornecer subsídios para estudos que visem avaliar a extensão e a distribuição da variação entre as espécies como também para investigar questões taxonômicas e evolutivas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Dentre os diversos marcadores moleculares existentes, os microssatélites, também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeats*), destacam-se nos estudos de identificação individual, investigação de vínculo familiar, mapeamento genético em seres vivos e estudos genético-populacionais (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os marcadores microssatélites são codominantes, multialélicos e amplamente distribuídos no genoma de eucariotos. Apesar de serem marcadores específicos, o que eleva seu custo inicial e limita seu uso, os microssatélites têm sido transferidos e utilizados para detectar polimorfismo em locos homólogos de outras espécies afins. Devido sua abundância, codominância e alto nível de diversidade, esta técnica permite caracterizar corretamente um indivíduo em uma população, bem como monitorar a transmissão de genes através de gerações, possibilitando acelerar a estimação de parâmetros genéticos que são de considerável interesse em estudos de diversidade, padrões de estrutura genética e conservação de populações (Chase et al., 1996; Souza, 2001; Zucchi, 2002).

As diversas aplicações destes marcadores dependem, portanto, do desenvolvimento de iniciadores espécie-específicos para estas regiões genômicas a serem amplificadas via PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Isolar e caracterizar regiões microssatélites do genoma da espécie *Hoplias malabaricus* a fim de disponibilizar marcadores eficientes para estudos em genética de populações, conservação e manejo dessa espécie.

### **2.2. Objetivo Específicos**

- Isolar DNA de um indivíduo da espécie *Hoplias malabaricus* e construir bibliotecas *shotgun* para o seqüenciamento de fragmentos aleatórios do DNA genômico;
- Realizar a busca de regiões microssatélites nos fragmentos aleatórios seqüenciados;
- Desenhar pares de iniciadores que flanqueiam as regiões microssatélites nucleares do genoma de *Hoplias malabaricus*;
- Padronizar as condições de amplificação dos pares de iniciadores desenvolvidos para cada uma das regiões microssatélites;
- Caracterizar o polimorfismo dos marcadores que apresentarem os melhores padrões de amplificação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

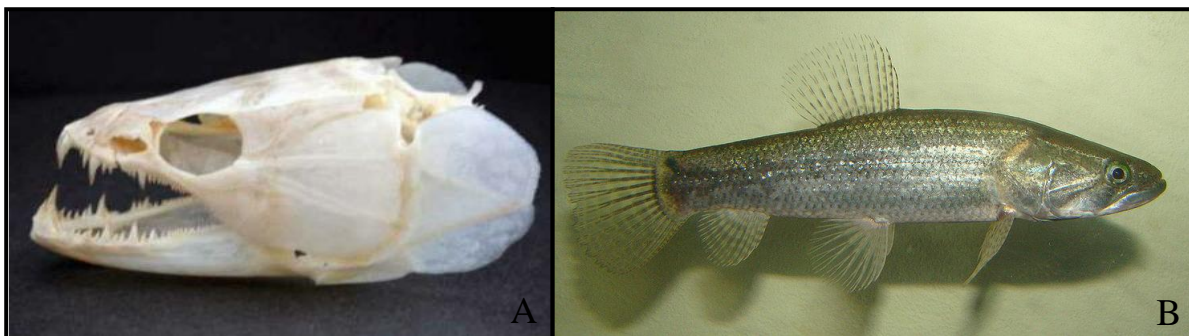
#### 3.1. Características ecológicas, evolutivas e biologia da espécie *Hoplias malabaricus*

A Região Neotropical contém a mais rica diversidade de peixe de água doce do mundo. Em 1978, foi estimado que o número total de espécies de água doce neotropicais chegaria a 5000 (Böhlke et al., 1978). Em 1998, Schaefer disponibilizou a estimativa de 8000 espécies, o que representa um oitavo de toda a biodiversidade estimada de vertebrados vivos (Vari & Malabarba, 1998). Além disso, Buckup et al. (2007) relataram que 2587 espécies de água doce ocorrem apenas no Brasil, tendo em vista apenas duas das diversas ordens já descritas ou conhecidas, Characiformes e Siluriformes.

Segundo Vari & Malabarba (1998), um percentual de 30% a 40% de toda a diversidade existente na ictiofauna Neotropical não foi, até o momento, reconhecida. Portanto, é principalmente nesse contexto de identificação da diversidade que estão sendo aplicados os estudos de marcadores genéticos e moleculares nas espécies de peixes neotropicais, buscando, inclusive, a exploração de características de interesse econômico, bem como a preservação de unidades evolutivamente significativas para a manutenção dessa biodiversidade (Ryder, 1986).

O gênero *Hoplias* se distingue dos outros dois gêneros da família Erythrinidae por algumas particularidades apresentadas pelas espécies que compreendem este gênero, como a presença de dentes caninos no maxilar (Figura 1 A) e na porção anterior do dentário, e por possuírem a nadadeira ventral com oito raios e a anal com 10 a 12 raios (Figura 1 B) (Britski et al., 1988).

Segundo Oyakawa (2003) e Froese et al. (2007), o gênero *Hoplias* é constituído por nove espécies, sendo elas: *Hoplias lacerdae* (Ribeiro, 1908), *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), *Hoplias parana* (Valenciennes, 1847); *Hoplias Aimara* (Valenciennes, 1847); *Hoplias brasiliensis* (Agassiz et. al., 1829); *Hoplias macrophthalmus* (Pellegrin, 1907); *Hoplias microcephalus* (Agassiz et. al., 1829); *Hoplias microlepis* (Günther, 1864); e *Hoplias teres* (Valenciennes, 1847). Destas, cinco espécies são encontradas no Brasil: *Hoplias lacerdae*, *Hoplias malabaricus*, *Hoplias brasiliensis*, *Hoplias macrophthalmus*, e *Hoplias microcephalus* (Oyakawa, 2003; Froese et al., 2007).



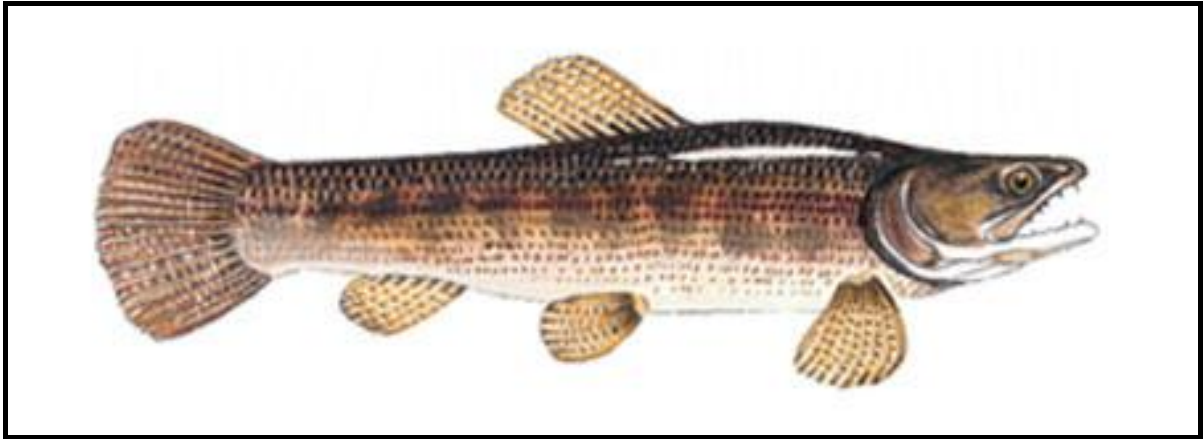
**Figura 1.** (A) Caninos no maxilar superior e inferior, (Fonte: [www.pesca.tur.br/page/3](http://www.pesca.tur.br/page/3), 2008); (B) Nadadeira ventral e anal com 10 a 12 raios, (Fonte: Timm, 2008).

De acordo com Morellí (1998), a espécie *Hoplias malabaricus* (popularmente conhecida como traíra) é caracterizada por apresentar o corpo cilíndrico com uma leve depressão lateral, nadadeira dorsal angular, cabeça bastante longa, boca ampla e mandíbulas proeminentes, com dentes fortes e cônicos, e com a presença de caninos.

Com base na região gular, a espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), apresenta a linha dentária convergindo, na forma de “V” invertido, na região anterior (Britski, 1972; Bertollo et al., 1978). Outro caráter diferencial entre as espécies é a presença ou ausência de denticulos na língua, e *Hoplias malabaricus* apresenta uma língua provida de placas ósseas com dentes diminutos (Britski et al., 1988).

Na metade proximal da cabeça, estão dispostos os olhos circulares e na porção dorsal da cabeça, observa-se uma coloração mais escura do que a ventral, assim como o restante do corpo, que varia desde marrom escuro até um bege claro. Além disso, a espécie apresenta manchas marrons, dispostas perpendicularmente com uma leve inclinação em direção à cauda, conforme a Figura 2. Devido a esta coloração, a traíra se camufla na vegetação para capturar suas presas (Oyakawa, 1998).

Durante a fase adulta, a espécie apresenta hábitos sedentários, típicos de espécies não migratórias. *Hoplias malabaricus* ocupa o topo da cadeia alimentar nos pequenos cursos d’água, e são predadores de outras espécies de peixes de menor porte, inclusive de indivíduos jovens de sua própria espécie, crustáceos e moluscos, mas também é facilmente utilizado como fonte alimentar por aves piscívoras e por mamíferos, incluindo o homem (Oyakawa, 1998).



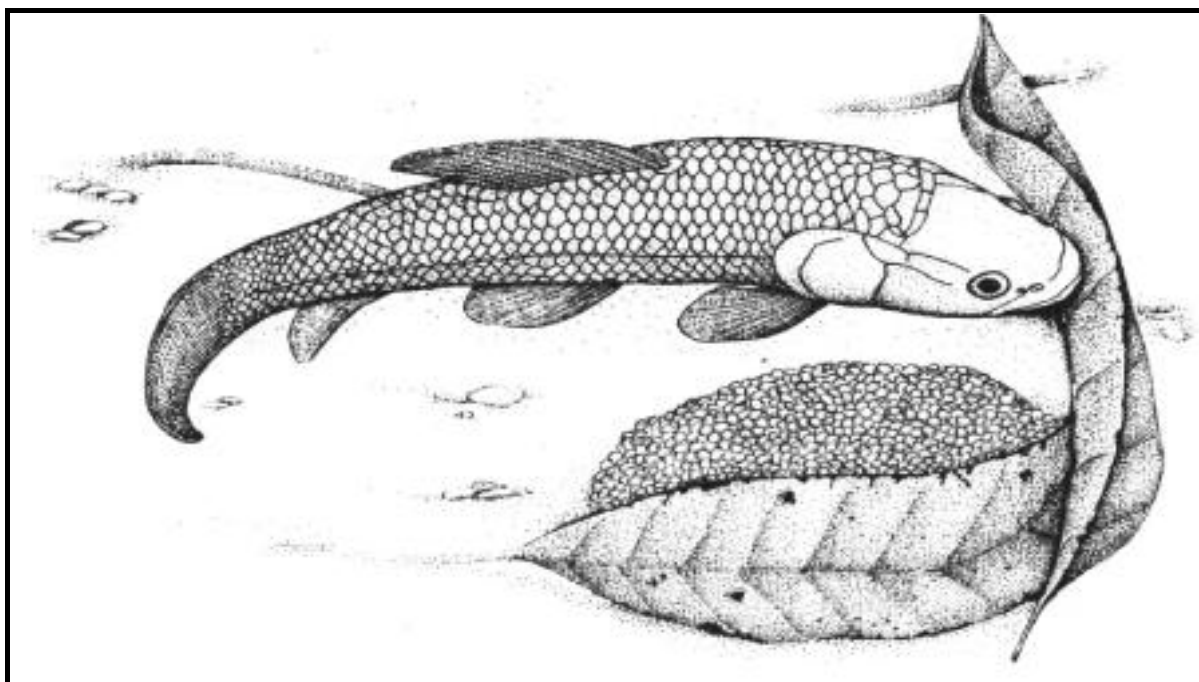
**Figura 2.** *Hoplias malabaricus* (Fonte: <http://peska.com.br/novopeska/>, 2010).

No Brasil, *Hoplias malabaricus* é conhecida por algumas nomenclaturas populares, como por exemplo, traíra, trairões, tarairas, trairuçus e morobás (Pacheco, 2004). Além disso, a espécie é normalmente confundida com *Hoplias lacerdae*, principalmente quando nas formas jovens (Oyakawa, 1998). Entretanto a espécie *Hoplias malabaricus* apresenta hábitos noturnos e, durante o dia, aninha-se em locais com vegetação abundante (Sabino & Zuanon, 1998). Podem atingir cerca de 60 cm de comprimento e pesar em torno de 3 kg (Morelli, 1998).

Quanto à reprodução, a espécie *Hoplias malabaricus* apresenta-se desova parcelada, realizando muitas pequenas desovas durante a temporada reprodutiva. Para tal, o macho e a fêmea, juntos, procuram ou constroem pequenas depressões de aproximadamente 20 cm de profundidade, onde a fêmea deposita seus ovos adesivos (Lamas, 1993), enquanto o macho os fertiliza e fica cuidando por alguns dias, até que eclodam e se evadam espalhadamente para a vegetação (Oyakawa, 1998), conforme observada na Figura 3.

A espécie *Hoplias malabaricus*, representa uma das espécies com maior distribuição dentre os peixes characiformes da região Neotropical. É amplamente distribuída pelas Américas, sendo comum em rios, arroios, lagoas e represas (Ringuelet et. al., 1967; Kock et. al., 2000), diferentemente das demais espécies de *Hoplias*, que estão restritas a algumas pequenas áreas específicas (Oyakawa, 2003).

A traíra pode ser encontrada por todo o Continente Americano, desde o sul da província de Buenos Aires, no rio Salado, até o Panamá (Berra, 1982). Além disso, a espécie foi introduzida nos Estados Unidos, no Estado da Flórida (Hensley & Moody, 1975; Hensley, 1976; Courtenay et al., 1979, 1984, 1986,).



**Figura 3.** Deposição de ovos da espécie *Hoplias malabaricus* (Fonte: Prado et al., 2006).

A presença de *Hoplias malabaricus* tem sido registrada em quase todos os sistemas de águas lânticas e lólicas em muitos países, como: Argentina (Cordiviola de Yuan & Pignalberide Hassan, 1985); (Domanico, et al., 1993); Bolívia, Equador, Peru, Uruguai (Godoy, 1975); Brasil (Bloch, 1794); (Agassiz et al., 1829); (Cuvier & Vallenciennes, 1847); (Castro & Casatti, 1997); Costa Rica (Oyakawa, 1998, 2003); Colômbia (Miles, 1947; (Dahl, 1971); (Galvis et al., 1997); Guiana, Paraguai (Godoy, 1975; Géry, 1977); Panamá (Miller, 1966); Suriname (Bloch, 1794; Gill, 1858, 1903; Kenny, 1995, Oyakawa, 1998, 2003); e Venezuela (Géry, 1977; Galvis et al., 1997).

Esta espécie é considerada como um importante hospedeiro definitivo, intermediário e paratênico de helmintos, principalmente para as larvas de nematóides. Além disso, as larvas de Anisakídeos quando parasitam humanos, adquirem um potencial zoonótico (Wharton et al., 1999; Martins et al., 2006). Elas podem ser encontradas no mesentério dos peixes e podem, ainda, migrar para os músculos após a morte de seu hospedeiro. Devido ao seu alto grau de patogenicidade, essas larvas podem causar implicações importantes nos humanos que se alimentarem dos peixes infectados, tais como vômitos, diarréias e náuseas (Bouree et al., 1995; Barros et al., 2007).

Especialmente no Brasil, as principais receitas e práticas medicinais são atribuídas aos indivíduos do reino vegetal, enquanto que os animais consistem numa fonte secundária de tratamentos médicos. Como uma evidência de que diversos peixes são utilizados na medicina

caseira entre os povos ribeirinhos da Amazônia, destaca-se a espécie *Hoplias malabaricus* dentre os mais citados. A gordura destes peixes é utilizada para o tratamento de doenças otológicas e oftalmológicas (Begossi & Braga, 1992).

Algumas espécies de peixes vêm sendo utilizadas como bioindicadores através de análises das respostas biológicas e bioquímicas, desses animais, em decorrência da exposição aos contaminantes presentes nos ambientes aquáticos (Powers, 1989), visto que eles apresentam um papel importante no transporte de energia entre os níveis tróficos da cadeia alimentar (Van Der oost et al., 2003).

Além de avaliar os níveis de poluição do ecossistema aquático, os peixes, podem servir como espécies sentinelas para estimar os riscos toxicológicos para a espécie humana. Os poluentes e principalmente as substâncias tóxicas presentes na água, interagem com a biota em nível celular, e por este motivo, as respostas celulares dos peixes podem constituir ferramentas sensíveis e satisfatórias para a detecção precoce da exposição a agentes químicos. Estas respostas são geralmente utilizadas nas áreas biomédicas e toxicológicas (Hightower & Renfro, 1988).

A espécie *Hoplias malabaricus* que está localizada no topo da cadeia alimentar por ser considerada um animal predador, torna-se interessante como uma espécie bioacumuladora de poluentes, mostrando a importância de estudos com a espécie. Além disso, a traíra apresenta uma ampla distribuição geográfica, por todo o território brasileiro, podendo ser pescada durante o ano inteiro. Apresenta, ainda, tolerância a hipóxia que está atribuída a uma combinação de características tais como o baixo metabolismo e controle muito eficiente da função cardiorespiratória. Durante situações extremas, a espécie pode ser encontrada enterrada na lama (Paiva, 1974) e são caracterizadas por apresentarem alta resistência durante longos períodos de privação de alimentos (Rios et al., 2002). Todas estas características importantes demonstram a boa resistência da espécie a situações adversas.

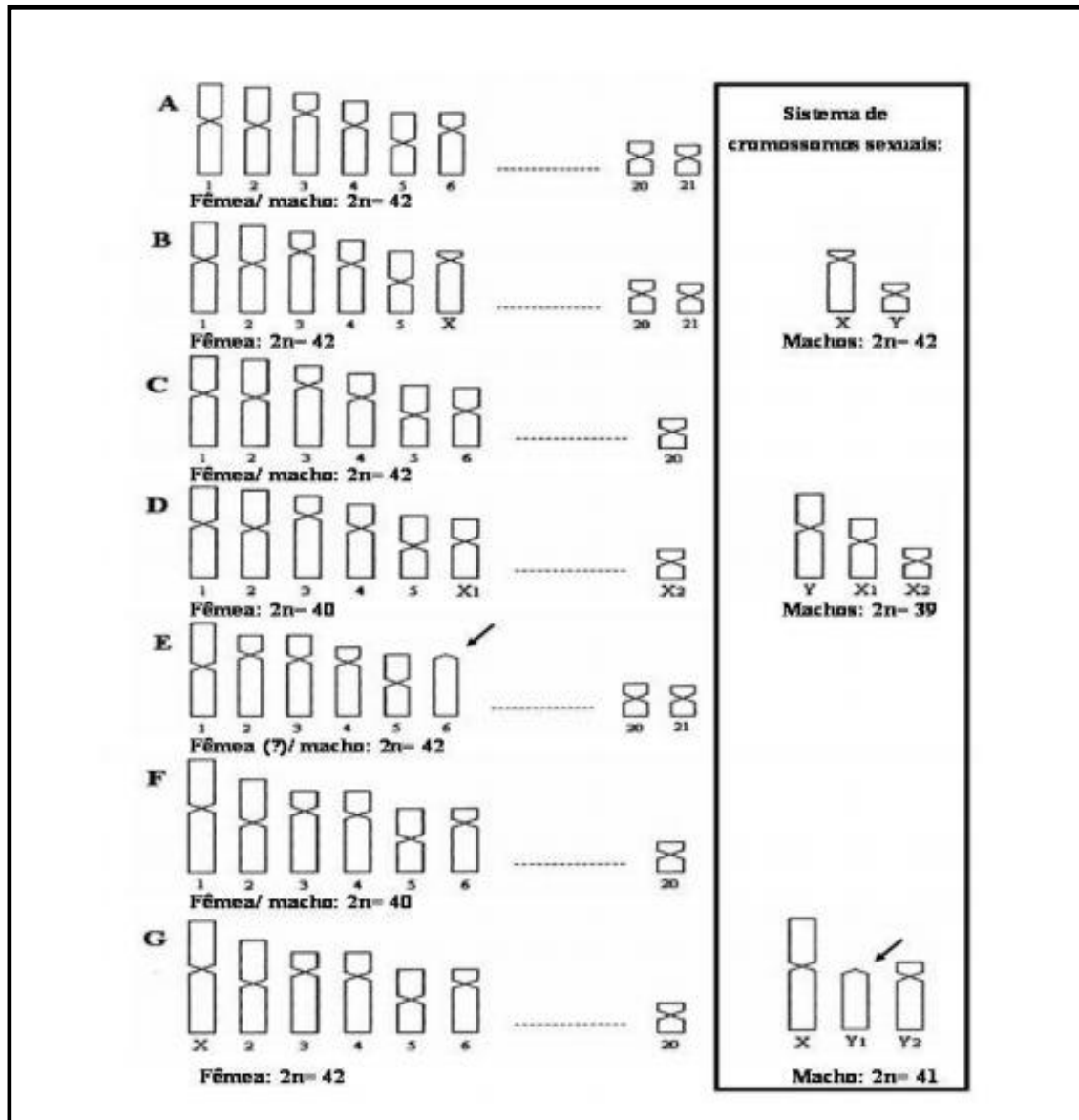
Diversos autores já realizaram trabalhos sobre a espécie *Hoplias malabaricus* no Brasil, destacando a presença da espécie em todas as regiões do país, em Estados como, Amazonas, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Pará, Paraná, Paraíba, Rio Grande do Sul, Rio Grande do Norte, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo (Bertollo et al., 2000; Born & Bertollo, 2000, 2006); Dergam et al., 1996, 1998, 2002; Gimenes, 2006; Lucio et al., 2002; Marques et al., 2001; Centofante, 2003; Pacheco, 2004; Pereira, 2005; Rosa, 2006 ; Martins et al., 2006; Vicari et al., 2003, 2005, 2006). *Hoplias malabaricus* vem sendo considerada por diversos autores como um conjunto de espécies que necessita de uma melhor revisão quanto à

classificação, ou seja, para um melhor entendimento da espécie, serão necessários estudos utilizando-se marcadores moleculares, com o objetivo de melhor caracterizá-la (Oyakama, 1990; Bertollo et al., 2000; Born & Bertollo, 2001).

Para a espécie *Hoplias malabaricus*, atualmente são identificados sete cariótipos diferentes (Bertollo et al., 2000; Born & Bertollo, 2001), como pode ser observado na figura 4, conforme descrito a seguir:

- 1) Cariótipo A:  $2n=42$ , com cromossomos metacêntricos (M) e submetacêntricos (SM) para ambos os sexos, sem cromossomos sexuais heteromórficos, com distribuição do nordeste ao sudeste do Brasil, Uruguai e Argentina (Bertollo et al., 2000);
- 2) Cariótipo B:  $2n=42$ , com cromossomos M e SM para os dois sexos, apresentando um sistema sexual simples do tipo XX/XY (Born & Bertollo, 2000), com distribuição no Vale do Rio Doce, no estado de Minas Gerais, Brasil;
- 3) Cariótipo C:  $2n=40$ , com cromossomos M e SM, sem dimorfismo sexual, com ocorrência do norte do Brasil ao nordeste da Argentina;
- 4) Cariótipo D:  $2n=40$ , com cromossomos M e SM para fêmeas e  $2n=39$  para machos, com a presença de um sistema cromossômico de determinação do sexo do tipo X1 X1X2 X2/X1X2Y (Bertollo et al., 1983, 1997), e com uma distribuição limitada à bacia hidrográfica do Paraná superior;
- 5) Cariótipo E:  $2n=42$ , com cromossomos M, SM e com a presença de um cromossomo acrocêntrico (par cromossômico 6);
- 6) Cariótipo F:  $2n=40$ , com cromossomos M e SM sem diferenciação sexual entre os cromossomos. Há, ainda, uma grande diferença de tamanho entre os dois primeiros pares cromossômicos e o restante (Bertollo et al., 1997). Esses cariótipos foram observados desde o Suriname até o sudeste do Brasil, com uma distribuição maior na parte oriental do continente;
- 7) Cariótipo G:  $2n=40$ , para as fêmeas e  $2n=41$ , para os machos. Essa diferença ocorre devido a um sistema sexual múltiplo do tipo XX/XY1Y2 (Bertollo et al., 1983). A presença destes cariótipos é restrita a alguns locais da Amazônia. Além desses sete cariótipos, também já foram observadas outras variações numéricas nos cromossomos de indivíduos de *Hoplias malabaricus*; como a presença de  $2n=39$  a  $2n=42$  para machos e fêmeas encontrados nas regiões do Alto Paraná (São Paulo), Rio São Francisco (Minas Gerais) e Aguapey (Argentina) (Bertollo et al., 1983; Dergam & Bertollo, 1990; Lopez et al., 1998 e

Rosa, 2006). O padrão de distribuição geográfica destes cariótipos é complexo, com situações de simpatria e de alopatria (Scavone et al., 1994).



**Figura 4.** Idiograma parcial dos cariótipos de *Hoplias malabaricus*. Destaque para o sistema de cromossomos sexuais, para o maior tamanho do cromossomo 1 dos cariótipos F e G e para a presença de um cromossomo acrocêntrico nos cariótipos E e G (seta) (Fonte: Bertollo et al., 2000; Pereira, 2005).

### 3.3. Desenvolvimento de marcadores microssatélites

Atualmente existem diversos tipos de marcadores moleculares disponíveis para serem utilizados em estudos de diferentes áreas de pesquisa. Eles podem ser definidos como características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas



geneticamente e a principal diferença existente entre os variados tipos de marcadores moleculares está na metodologia utilizada para revelar a variabilidade ao nível de DNA. Sendo assim, podem variar quanto à habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, quanto ao custo, à facilidade de uso, consistência e repetibilidade (Milach, 1998).

Segundo Hamrick & Godt (1990), a introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas no início dos anos 1960, além de iniciar a era dos marcadores moleculares, ampliou o número de marcadores genéticos que viriam a ser utilizados. O polimorfismo detectado pela técnica de eletroforese baseia-se na ocorrência prévia de mutações no DNA, as quais alteram a constituição e a carga eletronegativa líquida de algumas proteínas com função enzimática. Após a eletroforese de amostras dessas proteínas, os polimorfismos são detectados pela visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos.

Já na década de 1980, Mullis & Faloona (1987) desenvolveram a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), permitindo a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, o que provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular, facilitando enormemente os trabalhos de laboratório. O desenvolvimento desta técnica e as aplicações dela derivadas habilitaram o americano Kary Mullis ao recebimento do Prêmio Nobel. As aplicações da técnica são inúmeras, sendo utilizada, por exemplo, desde experimentos relacionados ao sequenciamento de DNA até aplicações comerciais na área de diagnose (Ferreira & Gratapaglia, 1996).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados conforme a metodologia utilizada para identificá-los. Entre os marcadores dominantes destacam-se aqueles do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e os VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), estes últimos baseados em polimorfismo de minissatélites. Entre os mais utilizados estão os marcadores codominantes, que podem ser baseados em polimorfismo de isoenzimas, ou polimorfismo no DNA, tais como o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e o SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites. (Ferreira & Gratapaglia, 1996). Qualquer que seja a técnica utilizada, as principais etapas necessárias para obtenção de resultados variam com o tipo de marcador molecular.

Atributos como consistência e tempo para obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são fatores importantes que devem ser considerados quando da escolha da técnica a ser utilizada em estudos genéticos. Enquanto que marcadores RFLP têm sido utilizados em estudos de mapeamento comparativo devido à

consistência dos resultados obtidos, estes tendem a ser mais caros. Por outro lado, os marcadores identificados por amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), especialmente os marcadores RAPD, são mais fáceis de serem manipulados e apresentam menor custo, embora gerem resultados menos consistentes. Outros marcadores como os SSR (microssatélites) e os AFLP revelam mais polimorfismo e têm sido a melhor opção para estudos genéticos de populações (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Milach, 1998).

Os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*), (Tautz, 1989) também chamados STRs (*Short Tandem Repeats*) (Edwards & Elgar, 1998) foram descritos por três grupos de pesquisadores, consistindo de fragmentos de DNA contendo pequenas repetições em tandem (lado a lado), com sequências contendo de 1 a 6 nucleotídeos flanqueados por sequências altamente conservadas (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989). Podem ser encontrados amplamente distribuídos pelo genoma dos eucariotos, embora também estejam presentes em procariotos. Os microssatélites localizam-se em maior proporção em regiões não codificantes do genoma, mas também ocorrem em regiões codificantes (Litt & Luty, 1989; Tautz et al., 1994; Tautz, 1989).

São marcadores que apresentam uma série de características desejáveis em estudos genéticos: são codominantes, ou seja, permitem a distinção entre homozigotos e heterozigotos, sendo, portanto, altamente informativos (Powell, 1996). São multialélicos, devido ao processo recorrente de expansão e contração no número de unidades repetitivas ao longo das gerações, possibilitando a discriminação de indivíduos geneticamente distintos; são amplificados via PCR, utilizando um par de iniciadores específico, complementar às regiões flanqueadoras, o que facilita sua obtenção, mesmo com poucas quantidades de DNA; uma vez desenvolvidos os iniciadores que amplificam tais regiões do genoma, estes podem ser compartilhados entre laboratórios para a realização de diversos estudos. Além disso, o resultado da amplificação via PCR revela o polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos na região microssatélite (Morgante & Olivieri, 1993; Ellegren, 2004; Grattapaglia & Kirst, 2007).

O alto polimorfismo observado nesse tipo de marcador é decorrente das altas taxas de mutações presentes nas regiões microssatélites (Oliveira et al., 2006). As taxas de mutação variam de loco para loco, sendo essa variação cerca de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  nucleotídeos por loco por geração (Schlötterer et al., 2000), resultando em uma ampla variação no número de unidades repetidas (Ellegren, 2004). Por este motivo, os marcadores baseados em microssatélites são considerados altamente informativos em estudos genéticos de populações (Goldstein &

Schlötterer, 2001; Oliveira et al., 2008). São também amplamente utilizados em construções de mapas genéticos, análise de paternidade e estudos forense (Zhao & Kochert, 1993; Ferdig & Su, 2000; Leoi, 2008; Melo et al., 2008).

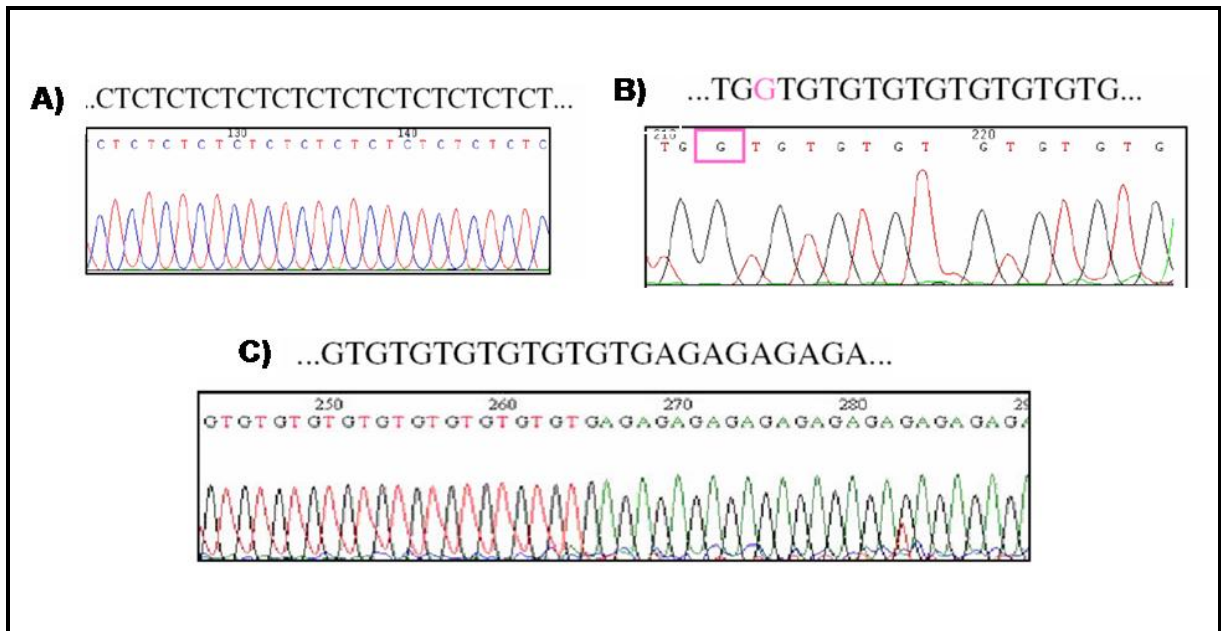
Os marcadores microssatélites são potencialmente polimórficos (Tautz, 1989; Weber et al., 1990) uma vez que apresentam grande diversidade no tipo de unidade de repetição (Tabela 1). Estes marcadores podem ser classificados como perfeitos, quando a sequência repetida não é interrompida por outra base que não pertença ao motivo; imperfeitos, quando existe entre os motivos pares de bases que não correspondam aos mesmos; ou podem ser compostos, quando contém duas sequências distintas repetidas adjacentes (Weber, 1990; Oliveira et al., 2006) (Figura 5).

**Tabela 1.** Diversidade no tipo de unidade repetitiva de marcadores moleculares microssatélites (Tautz, 1989; Weber et al., 1990).

<b>Unidade repetitiva (SSR)</b>	
<b>Mononucleotídica</b>	(G)n
<b>Dinucleotídica</b>	(GA)n
<b>Trinucleotídica</b>	(GAT)n
<b>Tetranucleotídica</b>	(GATA)n
<b>Pentanucleotídica</b>	(GATAC)n
<b>Hexanucleotídica</b>	(GATACA)n

A origem da alta variabilidade dos microssatélites está associada a três tipos de mecanismos. O primeiro está relacionado a elementos de transposição que são sequências repetitivas dispersas no genoma cuja função é fazer cópias de si e reinserí-las no genoma em posições aleatórias, como por exemplo, em uma região adjacente (Nadir et al., 1996). O segundo fator está relacionado com a ocorrência de crossing-over desigual no qual ocorre erro no emparelhamento entre cromossomos homólogos causados pela grande quantidade de repetições e as cromátides erradamente emparelhadas causarão alterações no número de repetições de microssatélites em cada cromossomo. Essa hipótese justifica as variações muito grandes no tamanho dos microssatélites (Smith, 1973). O último fator seria *slipped strand mispairing*, que significa um erro de pareamento causando um “escorregão” do DNA polimerase da fita molde durante a replicação, que acaba por deixar de incorporar grampos “repeats” ou adicionar novos “repeats”, formando uma nova fita de DNA com quantidade de repetições diferentes de fita molde. Esta é a hipótese mais aceita no meio científico, pelo fato

de explicar o surgimento de pequenas variações no número de repetições entre os diferentes alelos dentro do loco, característica comumente encontrada em regiões microssatélites (Streisinger et al., 1966; Oliveira et al., 2006).



**Figura 5.** Classificação dos microssatélites (A) perfeitos, (B) imperfeitos, (C) compostos (Fonte: Weber, 1990).

De acordo com Beckmann & Weber (1992), a distribuição e a frequência de regiões microssatélites variam entre diferentes classes de organismos. No genoma humano são comuns as sequências poliA e os dinucleotídeos AC/TG. Em *Drosophila melanogaster* os dinucleotídeos mais comuns são CA/GT e em plantas são AT/TA seguidos por AG/TC (Lagercrantz et al., 1993; Schug et al., 1998).

Contudo, classes contendo repetições de dinucleotídeos AT/TA não são ideais para análises populacionais, por serem altamente instáveis em condições de PCR devido à sua complementariedade. De acordo com alguns autores (Edwards et al., 1998; Elgar et al., 1999; Aguero et al., 2000) é mais comum encontrarmos microssatélites do tipo dinucleotídicos do que trinucleotídicos, e assim por diante.

Os locos microssatélites de cópia única, cuja informação alélica seja facilmente visualizada, são os mais utilizados em estudos genéticos de populações, permitindo uma análise mais segura (Bancroft, 2001). De acordo com a literatura, há uma correlação positiva entre o número de repetições presentes num loco microssatélite (tamanho final da sequência) com o número de alelos e heterozigidade (Byrne et al., 1996; Cho et al., 2000). Sendo

assim, alelos maiores, ou seja, com maior número de motivos, são mais interessantes em análises genéticas, possibilitando a geração de maior informação por loco, principalmente em estudos de paternidade e genética de populações.

Os marcadores microssatélites são considerados ideais para estudos de genética e evolução devido a algumas características importantes, como seu alto poder discriminatório, sua robustez, praticidade operacional, confiabilidade e por serem geneticamente mais informativos (Slatkin, 1995). Esses marcadores têm se mostrado extremamente eficientes na caracterização e entendimento da estrutura genética de populações, na determinação do fluxo gênico, da variabilidade genética e quantificação dos efeitos de fragmentação de habitats. Tais informações são fundamentais na definição de estratégias de conservação, pré-melhoramento e melhoramento genético (Parker et al., 1998; Goldstein & Schlotterer, 2001).

As regiões microssatélites são bastante abundantes dentro do genoma de diversos organismos, entretanto estas regiões, em nível de sequências, não são bem caracterizadas, pois a grande maioria dos locos microssatélites já estudados foram isolados de bibliotecas genômicas, através da utilização de sondas oligonucleotídicas. Isto dificulta a avaliação da variação de tamanho das regiões microssatélites em populações e impossibilita avaliar qual é a variabilidade e qual é a quantidade de tipos de sequências no genoma (Goldstein & Schlotterer, 1999).

Outro fator importante que deve ser citado é que microssatélites que contenham motivos formados por nucleotídeos que possam formar estruturas secundárias, como por exemplo, (AT)<sub>n</sub>/(TA)<sub>n</sub>, não são identificados através de bibliotecas enriquecidas. Além disso, dificilmente são construídas bibliotecas para tri-, tetra- e pentanucleotídeos sem que se saibam suas frequências, visto que as possibilidades de composição de motivos aumentam progressivamente de acordo com o aumento do tamanho do motivo (Goldstein & Schlotterer, 1999).

A obtenção das regiões microssatélites envolve uma série de passos, sendo que o primeiro deles consiste na identificação das sequências, que podem ser obtidas diretamente de bibliotecas genômicas, bibliotecas de cDNA, bibliotecas enriquecidas para sequências microssatélites, ou ainda a partir de sequências depositadas em bancos como o *GenBank* (Zane et al., 2002; Gao et al., 2003).

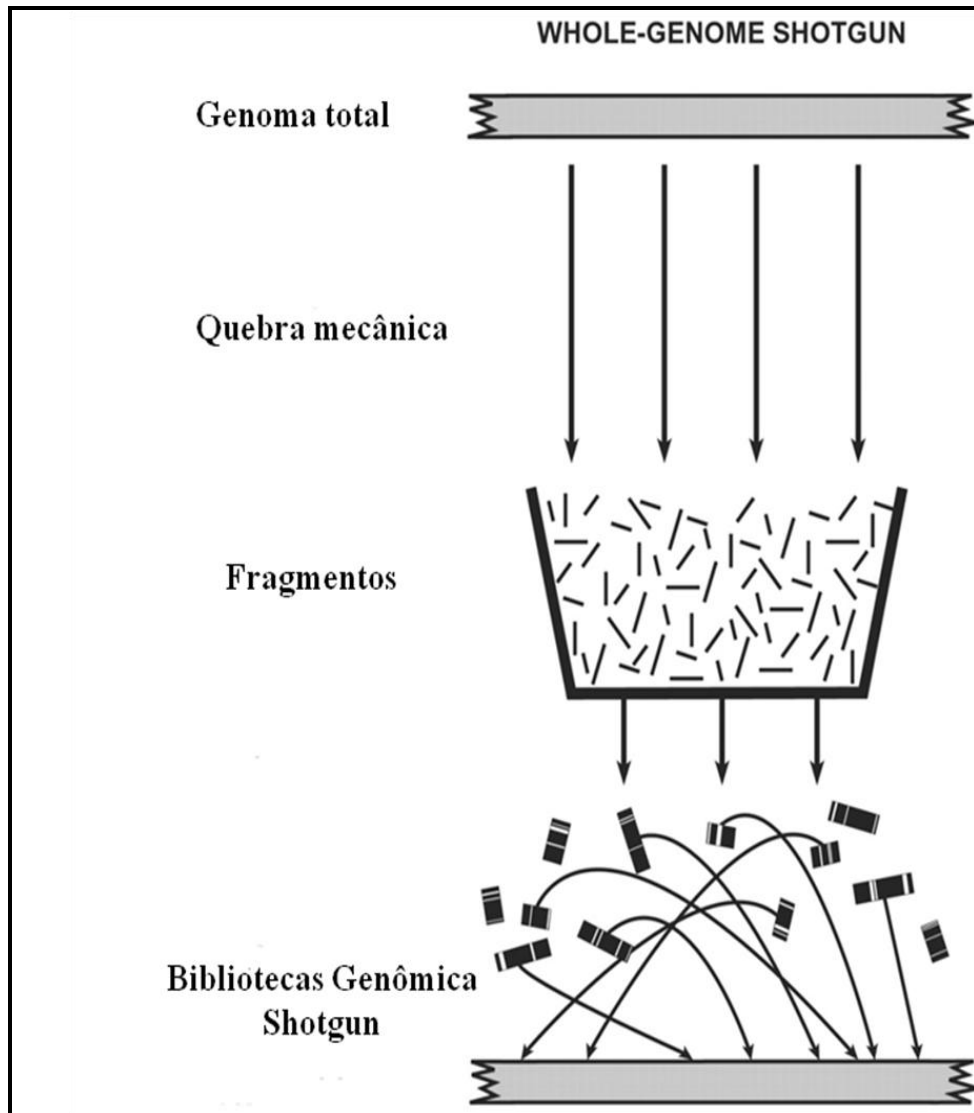
Com a conclusão do projeto genoma, a capacidade de sequenciamento aumentou muito em escala, em função da diminuição do seu custo total e do desenvolvimento de várias técnicas mais robustas (Hutchison, 2007; Shendure & Ji, 2008). O método de *Sample*

*Sequencing* (sequenciamento de DNA por amostragem), também chamada de *Random Sequencing* (sequenciamento aleatório de DNA), aliado a uma estratégia de clonagem *Shotgun DNA Sequencing* tem sido muito utilizado para estudos sobre a estrutura e composição do genoma de diversos organismos (Venter et al., 2002; Aparicio et al., 2002).

Todas as estratégias de sequenciamento de genomas são baseadas em clonagem. Primeiro, prepara-se uma biblioteca de clones, que em seguida, é sequenciado para a obtenção da sequência da inserção imediatamente adjacente ao vetor. Entretanto, existem duas estratégias de se montar uma sequência de consenso de um genoma: a primeira é chamada de sequenciamento hierárquico (sequenciamento de clone ordenado); nesse caso, uma das primeiras etapas é a construção de um mapa físico do genoma para que os fragmentos sequenciados possam ser facilmente montados (Waterston et al., 2001). Segundo Takahashi et al. (1996), amplas regiões do DNA genômico, como por exemplo um cromossomo, são cortados em grandes fragmentos e clonados em vetores específicos como BACs, PACs, e YACs .

A segunda estratégia, chamada de sequenciamento *Whole-genome shotgun* (WGS) consiste em sequenciar primeiro e mapear depois. As leituras de sequências são obtidas de clones selecionados aleatoriamente de uma biblioteca genômica total sem nenhuma informação sobre onde estes clones estão mapeados no genoma. Esta técnica é chamada de biblioteca *shotgun* e estas leituras de sequências são montadas em uma sequência de consenso cobrindo o genoma total, ajustando às sequências homólogas compartilhadas por leitura de clones superpostos (Waterston et al., 2001).

Para isso, o genoma total de um organismo é fragmentado em pequenos pedaços, através de quebra mecânica (por sonicação ou nebulização) e inúmeras bibliotecas são geradas desses fragmentos aleatórios (Figura 6). O tamanho dos fragmentos clonados geralmente varia entre 1000 a 4000 pares de bases, podendo chegar a até 10.000 pares de bases. Esta estratégia pode ser aplicada em genomas bacterianos de um modo direto, portanto qualquer determinada leitura de sequência de DNA de um genoma bacteriano virá de um único local por possuir apenas algumas megabases de DNA em tamanho (Waterston et al., 2001).

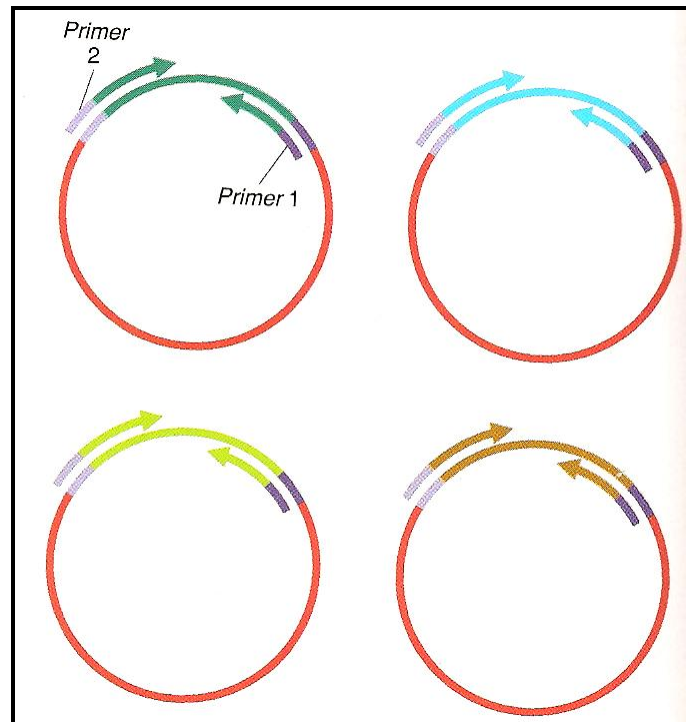


**Figura 6.** Estratégia de sequenciamento *Whole-genome shotgun* (WGS), (Fonte: Waterston et al., 2001).

Segundo Griffiths et al. (2006) o sequenciamento começa a partir de iniciador, baseados nas sequências de DNA do vetor adjacente, que são usados para guiar a reação de sequenciamento na inserção. Com isso, as curtas regiões em uma ou ambas as pontas das inserções genômicas podem ser sequenciadas, e após o sequenciamento, o resultado é uma grande coleção de sequências curtas e aleatórias onde algumas delas estão superpostas (Figura 7). As sequências de leituras superpostas são montadas em unidades chamadas sequências de *contigs* (sequências que são contiguas, ou seja, que se tocam, sendo que cada *contig* cobre uma grande região do genoma).

Os espaços ocasionais ocorrem sempre que uma região do genoma não é, por acaso, encontrada em uma biblioteca *shotgun*, e alguns fragmentos de DNA não são determinados em vetores de clonagem. Esses espaços são preenchidos por técnicas tais como *primer*

walking, ou seja, a utilização de uma sequência final clonada como um primer para sequenciar os fragmentos não clonados adjacentes (Griffiths et al., 2006).



**Figura 7.** Produção de leitura de sequenciamento de inserções terminais (Fonte: Griffiths et al., 2006).

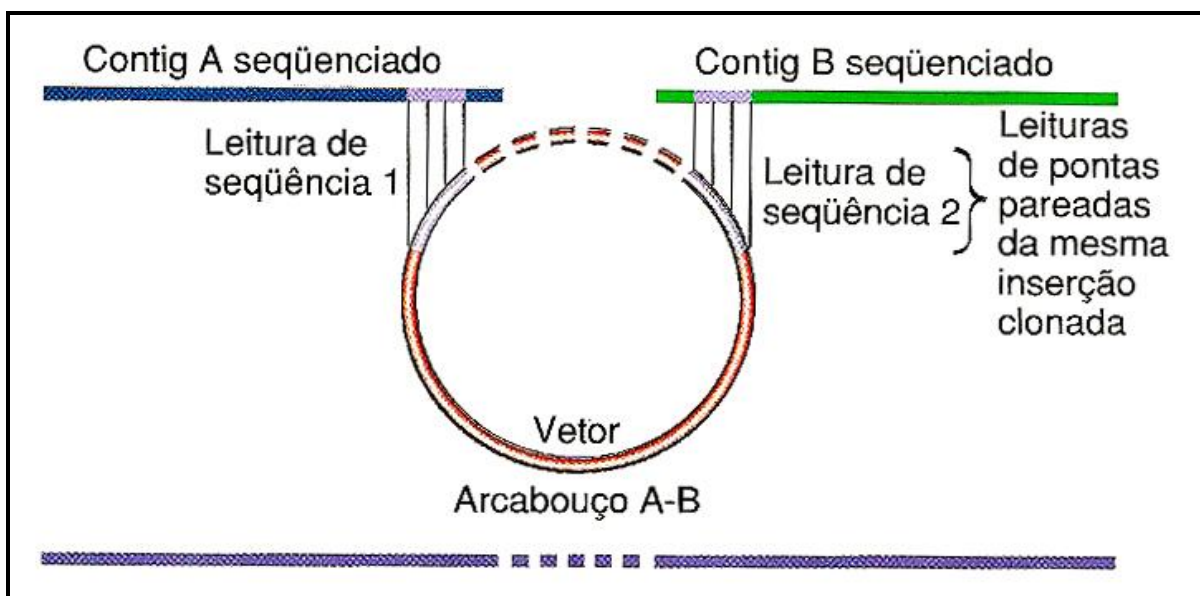
A utilização da estratégia *shotgun* em estudos genéticos vem aumentando a cada ano. Em 2003, 112 espécies procarióticas foram totalmente sequenciadas utilizando esta estratégia e também tem sido muito utilizada para genomas de eucariotos, incluindo para estudos do genoma humano (Griffiths et al., 2006).

O problema de sequenciar genomas complexos é a grande presença de DNA repetitivo. A estratégia *shotgun* é considerada como muito boa em produzir sequências com qualidade rascunho de genomas complexos, como exemplo o genoma da mosca *Drosophila melanogaster* que foi inicialmente sequenciado por esse método (Griffiths et al., 2006).

Ainda de acordo com Griffiths et al. (2006), as leituras de sequência de ambas as pontas de inserções de clones genômicos são obtidas e alinhadas às superposições de sequências homologas que são identificadas e os clones colocados em ordem, produzindo sequências *contigs* de consenso para trechos de copia única do genoma, ao contrário da situação das bactérias, onde há apenas DNA de copia única, e os contigs eventualmente estão em um segmento repetitivo de DNA, tal como um elemento genético móvel, fato que impede

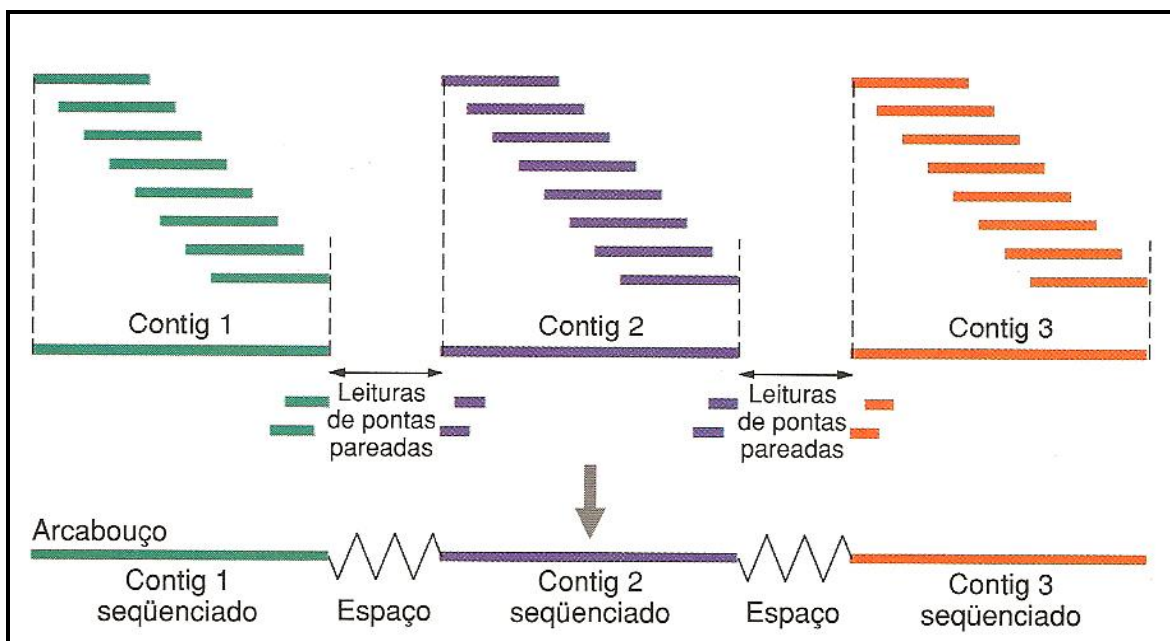


a montagem não ambígua dos contigs em um genoma total. A solução para este problema é conhecer quais pares de leituras de sequências vieram de pontas opostas das inserções genômicas no mesmo clone, que são chamadas de leituras de pontas pareadas. A idéia é encontrar leituras de pontas pareadas que cubram os espaços entre duas sequências contigs, ou seja, se a ponta de uma inserção fosse parte de um *contig* e a outra ponta fosse parte de um segundo *contig*, então esta inserção deveria cobrir o espaço entre dois *contigs*, e os dois contigs estariam claramente próximos um do outro (Figura 8).



**Figura 8.** Leituras de sequencias pareadas para unir duas sequencias de contigs em um arcabouço ordenado e orientado (Fonte: Griffiths et al., 2006).

O alinhamento das sequências de dois *contigs* usando leituras de pontas pareadas, automaticamente determina a orientação relativa dos dois *contigs* e deste modo, os contigs de cópia única podem ser unidos, embora com espaços onde residem os elementos repetitivos. Essas coleções espaçadas de *contigs* de sequências unidas são chamadas de arcabouços ou *supercontigs* (Griffiths et al., 2006) (Figura 9).



**Figura 9.** Montagem de sequenciamento *shotgun* de genoma inteiro (Fonte: Griffiths et al., 2006).

Tanto pela estratégia *shotgun* do genoma inteiro, quanto pelo sequenciamento ordenado de clones, ainda restarão alguns espaços e esses espaços se devem às sequências do genoma que são incapazes de crescer dentro do hospedeiro de clonagem bacteriana. Devem ser usadas técnicas especiais para preencher estes espaços nas montagens das sequências. Se os espaços são curtos, os fragmentos de PCR podem ser gerados a partir de primers baseados nas pontas das montagens, e estes fragmentos de PCR podem ser diretamente sequenciados sem uma etapa de clonagem (Griffiths et al., 2006).

O método *primer walking* sucessivo, às vezes cobre o espaço, mas se os espaços são maiores, podem ser feitas tentativas para clonar utilizando hospedeiros diferentes, como por exemplo, leveduras. Se a clonagem falha em um hospedeiro diferente, então os espaços na sequências deverão continuar (Griffiths et al., 2006).

A estratégia de sequenciamento *shotgun* já foi utilizada no Brasil para o sequenciamento do genoma de cana-de-açúcar, onde foram sequenciados um total de 340.000 ESTs (*Expressed Sequencing Tags* ou Sequências Expressas Marcadas). O Brasil tem se destacado no sequenciamento de genomas de diversos organismos através de muitos projetos em redes, envolvidos nos laboratórios de biologia molecular em mais de 48 instituições de ensino e pesquisa, com a mobilização de cerca de 240 cientistas de quase todas as regiões do país (Waterston et al., 2001).

O desenvolvimento de marcadores de regiões microssatélites, através das metodologias tradicionais de construção de bibliotecas enriquecidas, é mais trabalhoso e demanda mais tempo e recursos financeiros do que utilizando a abordagem de bibliotecas randômicas. Entretanto, uma vez desenvolvidos os iniciadores para uma determinada espécie, a técnica se torna simples e de baixo custo, além da vantagem de demandar pequena quantidade de DNA e poder ser analisada de forma semi-automatizada, gerando grandes quantidades de dados genéticos em espaço de tempo relativamente curto (Grattapaglia, 2007). Além disso, os iniciadores de microssatélites são transferíveis entre indivíduos da mesma espécie, entre gêneros e muitas vezes entre gêneros distintos, diminuindo custos e mão de obra (Zane et al., 2002; Grattapaglia, 2007). As sequências de DNA contendo microssatélites podem ser obtidas diretamente de bibliotecas genômicas, bibliotecas para sequências microssatélites ou sequências depositadas em bancos de dados. A transferibilidade ou amplificação heteróloga dos iniciadores de regiões microssatélites entre espécies relacionadas é possível devido à homologia de sequências genômicas e está relacionada ao grau de conservação das sequências flanqueadoras da região microssatélite e à distância taxonômica entre as espécies de interesse

A presença de regiões microssatélites em ESTs tem possibilitado o desenvolvimento de marcadores SSR de um modo simples, relativamente rápido e direto, através da busca eletrônica em bancos de dados de ESTs. O aproveitamento desta importante fonte de marcadores, entretanto, é limitado para espécies que possuem bancos de dados disponíveis para análise *GenBank* (Zane et al., 2002; Grattapaglia, 2007). Por este motivo, torna-se importante o desenvolvimento de iniciadores para regiões microssatélites em um número maior de espécies. Assim, muitos estudos genético-populacionais, de melhoramento, manejo e conservação das espécies poderão ser desenvolvidos.

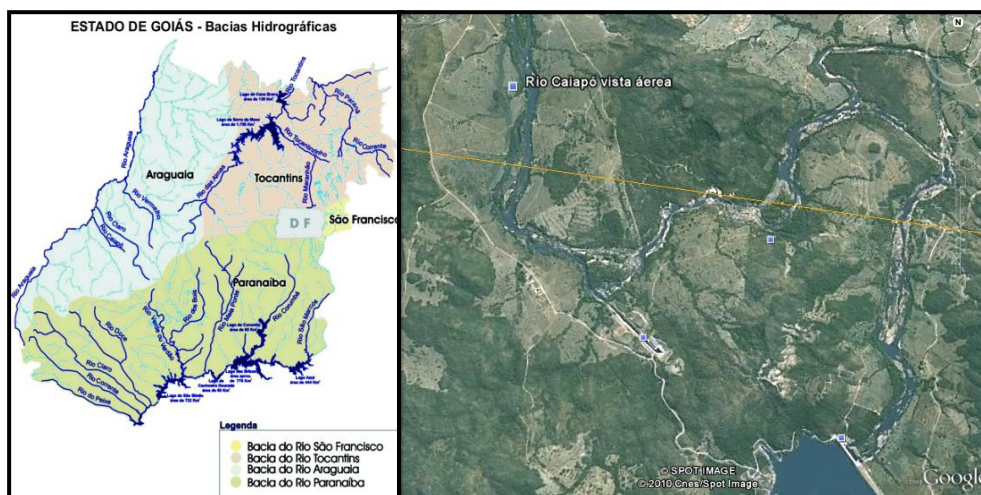
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Biotecnologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Arroz e Feijão e de Genética & Biodiversidade da Universidade Federal de Goiás.

### 4.1. Áreas de coleta das amostras

As amostras da espécie *Hoplias malabaricus* foram coletadas em quatro áreas: A primeira área foi na bacia do rio Caiapó, que possui cerca de 12.000 km<sup>2</sup>, incluindo 11 municípios goianos: Amarinópolis, Aragarças, Arenópolis, Bom Jardim de Goiás, Caiapônia, Diorama, Iporá, Ivolândia, Montes Claros, Palestina de Goiás e Piranhas. O rio Caiapó é afluente do rio Araguaia pela margem direita e a sua bacia hidrográfica situa-se no oeste goiano do estado de Goiás (Arruda, 2006) (Figura 10).

Além de garantir ambientes de desova, forrageamento e proteção à grande parte das espécies de peixes da bacia do alto rio Araguaia, a região apresenta-se como um conjunto de possibilidades de manutenção de diversidade (Arruda, 2006).



**Figura 10.** Localização da bacia hidrográfica do rio Caiapó, Goiás (Fonte: Google Earth, 2010; AGMA, 2004).

A segunda área de coleta se localiza no Sítio Mucunã, município de Hidrolândia, Estado de Goiás (Figura 11). A sua hidrografia é formada pelo rio Meia Ponte que banha o município em pequena extensão, os ribeirões das Lages, Santo Antônio e o córrego da Serra (Barbosa, 2002).



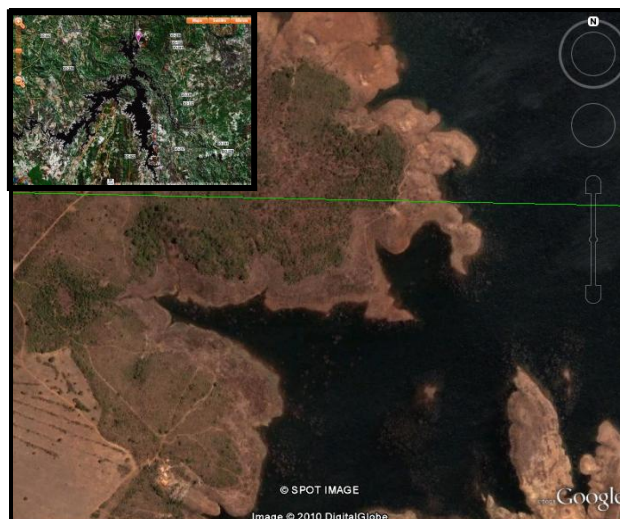
**Figura 11.** Sítio Mucunã no Município de Hidrolândia, Goiás (Fonte: Google Earth, 2010).

A terceira área de coleta foi o Lago Municipal (Lago do Sol) do município de Anicuns, Goiás (Figura 12). O município teve origem na exploração de ouro em meados do século XVIII. Sua estrutura hidrográfica é composta por dois rios, o Cachoeirinha de São José e o Rio dos Bois (Dooles, 1978).



**Figura 12.** Lago Municipal (Lago do Sol) do município de Anicuns, Goiás (Fonte: Google Earth, 2010).

A quarta área de coleta foi o Lago Serra da Mesa, que é considerado como o quinto maior lago do Brasil e está localizado no Noroeste do Estado de Goiás, onde foi construída a usina hidrelétrica de Serra da Mesa. O lago está em uma área inundada, com 1784 km<sup>2</sup>, na elevação de 460m (em relação ao nível do mar) e é o primeiro lago em volume de água 54,4 bilhões de metros cúbicos. Além disso, o Lago Serra da Mesa apresenta uma das mais ricas diversidades de peixes do estado de Goiás (Figura 13) (Ferreira & Pellegrini, 2005).



**Figura 13.** Lago Serra da Mesa. Localizado no estado Goiás (Fonte: Google Earth, 2010).

Todos os locais de coleta dos indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus* foram georeferenciados com o uso de um GPS (*Global Position System*), conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2.** Área de coleta, local, código (Cód.), coordenadas geográficas (longitude e latitude) e altitude (m).

Área de Coleta	Cód.	Longitude	Latitude	Altitude (m)
<b>Rio Caiapó - GO</b>	RCG	-43,96300	-11,83400	534
<b>Sítio Mucunã - GO</b>	SMG	-48,34838	-13,67493	387
<b>Lago Municipal de Anicuns - GO</b>	LMAG	-42, 53726	-11,37542	467
<b>Lago Serra da Mesa - GO</b>	LSMG	-41,48723	-10,34987	489

#### 4.2. Coleta do material biológico e extração do DNA

A coleta dos indivíduos, no Rio Caiapó, da espécie *Hoplias malabaricus* foi realizada pela empresa *Naturae Consultoria Ambiental*, devidamente autorizado pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do meio Ambiente e dos Recursos renováveis). Foram coletados 18 indivíduos de *Hoplias malabaricus* oriundos do Rio Caiapó, 21 indivíduos do Sítio Mucunã, 8 do Lago Municipal de Anicuns e 5 indivíduos do Lago Serra da Mesa.

Para o isolamento e posterior desenvolvimento dos iniciadores, o DNA total de um único indivíduo foi extraído de amostras do tecido muscular utilizando o protocolo de extração SDS (*Sodium dodecyl sulphate*) - fenol/clorofórmio (modificado de Bruford et al.

1992), de acordo com as etapas descritas no Anexo I. O mesmo protocolo foi utilizado para a extração do DNA de todos os indivíduos utilizados para a caracterização dos locos padronizados.

Após a extração, o DNA total foi quantificado com o auxílio de um marcador de peso molecular conhecido, em gel de agarose 1% e tampão para eletroforese TBE (Tris Borato - EDTA) na concentração de 1x. Para a visualização das bandas o gel foi corado com brometo de etídeo (10mg/mL) e fotografado por fotodocumentador.

### **4.3. Construção da biblioteca Genômica e sequenciamento**

A biblioteca genômica foi construída utilizando a metodologia *shotgun* utilizando o protocolo descrito no Anexo II. As principais etapas desta metodologia consistem na fragmentação do DNA por sonicação, com o objetivo de produzir fragmentos de diversos tamanhos, sem qualquer tipo de viés gerado por aumento de temperatura (Bankier et al., 1987). Para a checagem do tamanho desses fragmentos de DNA, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1%, com o auxílio do marcador de peso molecular 1Kb. Em seguida, as extremidades desses fragmentos de DNA foram tratadas por uma reação pk, para posterior ligação ao vetor de clonagem *pMOSBlue*, segundo protocolo do *pMOSBlue Blunt Ended Cloning Kit*, fornecido pela Amersham Biosciences (Sambrook et al., 1989). Para catalisar a ligação dos fragmentos de DNA ao vetor de clonagem foi utilizado a enzima T4 DNA ligase. Para a realização da clonagem, a reação de ligação foi inserida em células competentes, disponibilizadas no próprio Kit. Finalmente as células transformadas foram aliquotadas em placas de Petri contendo meio LB sólido e os antibióticos Ampicilina e Tetraciclina.

Para a seleção das células transformantes, realizou-se o repique das colônias positivas (de cor branca), com auxílio de uma haste de madeira autoclavada. As colônias positivas foram, então, transferidas para placas *deepwell* contendo 110µl de meio Circle Grow, permitindo o crescimento das colônias de bactérias. Em seguida, realizou-se a preparação de reações de miniprep em placas por lise alcalina, seguindo o protocolo sugerido por Sambrook et al. (1989) (Anexo III).

As reações de sequenciamento foram preparadas a partir da precipitação com isopropanol, seguido de purificação com etanol e secagem em termociclador. Estas reações foram armazenadas a -20°C, protegidas da luz. Imediatamente antes do procedimento de sequenciamento foi adicionado formamida Hi-Di às amostras que, em seguida, foram desnaturadas em termociclador por 5 minutos à 95°C e colocadas por 2 minutos no gelo. As

reações de sequenciamento foram montadas utilizando o Kit DYEnamic ET Termintor (GE Healthcare) (Anexo IV) e os fragmentos de DNA foram submetidos ao sequenciador automático ABI 3100.

A última etapa envolveu o processo de busca de regiões microssatélites na parte do genoma que foi sequenciada. Para tanto, essas sequências foram depositadas na plataforma BIOFOCO, (Rede de Pesquisa e Desenvolvimento em Bioinformática do Centro-Oeste), onde foram avaliadas quanto à qualidade, sendo consideradas como válidas aquelas com um número mínimo de 250 pares de base com phred > 20 (Castelo, 2002). O desenho dos iniciadores foi efetuado utilizando o software PRIMER 3, onde se inicia a procura dos iniciadores microssatélites de acordo alguns parâmetros pré-estabelecidos, tais como: tamanho dos oligonucleotídeos variando entre 18 a 26 nucleotídeos, temperatura de anelamento entre 55°C e 72°C, diferença de temperatura de anelamento entre os dois iniciadores do par ( $\leq 1^\circ\text{C}$ ), o conteúdo % GC (entre 40 e 60%). Foram evitados iniciadores com diferença de temperatura de anelamento de 4°C, iniciadores com diferença de conteúdo de G e C superior a 5%, a complementaridade de sequências ou que formem dímeros na extremidade 3'OH e procurou-se, ainda, evitar os iniciadores que formem estruturas secundárias ou que se complementem (Rozen & Skaletsky, 2000).

Do total de regiões microssatélites encontradas, foram escolhidos para a realização da padronização 25 iniciadores utilizando alguns critérios, tais como o tamanho do motivo e o número de repetições. Depois de sintetizados, os iniciadores foram submetidos a diversos testes de amplificação utilizando três indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus* para verificar a eficiência da amplificação locos microssatélites isolados. Assim, os iniciadores obtidos foram testados por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador, conforme protocolo descrito na Tabela 3. Para cada um dos iniciadores foi necessária a etapa de ajuste da temperatura de anelamento e, quando necessário, foram feitos ajustes na concentração dos reagentes, a fim de melhorar a amplificação dessas regiões de interesse e possibilitar a obtenção de genótipos oriundos de locos que apresentassem uma segregação com padrão esperado (Tabela 4).



**Tabela 3.** Protocolo das Reações em Cadeia da Polimerase demonstrando os reagentes utilizados e suas concentrações de uso e volumes, para um sistema de 15µl.

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume (µl)</b>
DNA	25ng/µl	5,0
Iniciador (F+R)	1,8mM	4,4
Tampão da enzima	10X	1,5
dNTP's	2,5mM	1,3
BSA	10mg/ml	1,3
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0,5
H <sub>2</sub> O MilliQ - autoclavada	-	0,8
Taq-Polimerase	5U	0,2
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>15</b>

Em seguida, a mistura desses reagentes da PCR (mix) foi acondicionada aos tubos contendo o DNA de cada indivíduo e levada ao termociclador, programado conforme descrito na Tabela 4.

**Tabela 4.** Programa de termociclagem para regiões microssatélites.

<b>Passo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>
<b>1</b>	5'	94°C
<b>2</b>	1'	94°C
<b>3</b>	1'	TA <sup>1</sup>
<b>4</b>	1'	72°C
<b>5</b>	30 ciclos (2 - 4)	-
<b>6</b>	7'	72°C

<sup>1</sup> - TA (Temperatura de anelamento do iniciador)

Os produtos de PCR gerados foram submetidos a uma eletroforese vertical utilizando gel desnaturante de poliacrilamida na concentração de 6% e TBE 1X, com duração de cerca de 2 horas a 90 W. Em seguida, a coloração do gel foi realizada com nitrato de prata conforme o protocolo de Creste et al. (2001) (Anexo V). Após a revelação e secagem das placas contendo os géis, elas foram colocadas sobre luz branca para a obtenção dos genótipos.

A genotipagem foi feita sobre a luz branca pela comparação do tamanho dos alelos de cada indivíduo com os fragmentos de tamanho conhecido do marcador de massa molecular 10 pares de bases da Invitrogen<sup>®</sup>. Após a etapa de padronização, os locos considerados bons foram caracterizados utilizando os 48 indivíduos.

A confirmação da existência e do tamanho de todos os alelos foi feita por meio da elaboração de uma escada alélica, obtida com base na realização de uma nova eletroforese, em gel de poliacrilamida, dos produtos amplificados arranjados na sequência crescente de tamanho dos alelos.

#### 4.4. Caracterização da variabilidade genética presente nos locos padronizados

A partir da codificação dos iniciadores desenvolvidos e padronizados nos 48 indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus*, foi construída uma matriz de dados com os genótipos, que foi utilizada para realizar uma análise descritiva a partir da estimativa das medidas de variabilidade apresentadas a seguir: proporção de locos polimórficos, número de alelos observados ( $N_a$ ), número médio de alelos, amplitude de variação do tamanho dos alelos em pares de base (AVA) índice de fixação ( $f$ ), conforme sugerido por (Alfenas et al. 1991). O número efetivo de alelos foi calculado por:

$$\left( 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)$$

onde  $I$  é o número de locos ;  $p_i$  é a frequência do  $i$ -ésimo alelo na população.

Para estimar a diversidade genética foi calculada a heterozigosidade média observada ( $H_o$ ), obtida pela média aritmética das proporções do número total de heterozigotos em relação ao número total de indivíduos entre os locos analisados. A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) ou diversidade de (Nei, 1973) foi calculada por:

$$H_e = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r \left[ 2n \frac{\left( 1 - \sum_{j=1}^k p_{ij}^2 \right)}{(2n-1)} \right]$$

onde  $n$  é o número de indivíduos,  $r$  é o número de locos,  $k$  é o número de alelos no loco  $i$  e  $p_{ij}$  é a frequência do  $j$ -ésimo alelo do  $i$ -ésimo loco. Com base nas estimativas das heterozigosidades esperadas e observadas ( $H_e$  e  $H_o$ ), calculou-se o índice de fixação ou

coeficiente de endogamia ( $f$ ) para cada população, como medida da deficiência ou excesso de heterozigotos, (Weir, 1996).

A frequência estimada de alelos nulos foi calculada segundo (Brookfield, 1996), assumindo panmixia e que toda deficiência de heterozigotos relativa às proporções de Hardy-Weinberg foi devida aos alelos nulos e não à subdivisão de população.

A Probabilidade de Exclusão de Paternidade (PE), que se refere a probabilidade de se excluir uma falsa paternidade foi calculada conforme sugerido por (Evet & Weir 1998). Sendo  $(p_u)$  as frequências alélicas do loco ( $u$ ) na população,  $Q$  a probabilidade de que pelo menos um loco do sistema permita a exclusão de um dos prováveis pais. Esta probabilidade, por loco( $Q_L$ ), pode ser estimada por:

$$Q_L = \sum_u P_u(1 - P_u)^2 - \frac{1}{2} \sum_u \sum_{v \neq u} P_u^2 P_v^2 (4 - 3P_u - 3P_v)$$

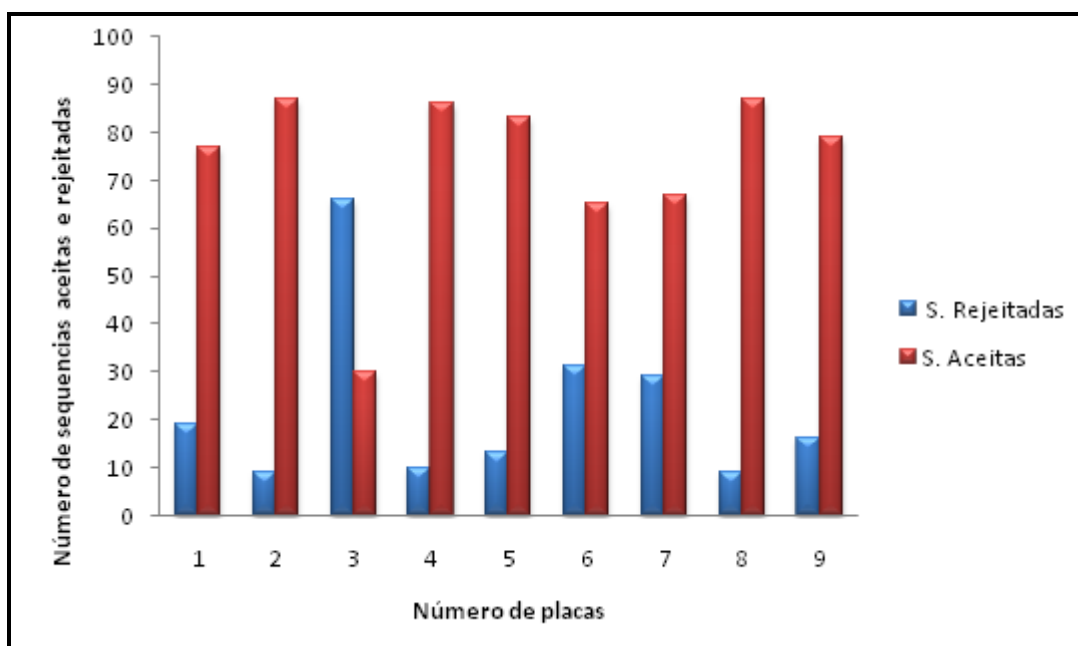
A Probabilidade de Identidade, que é a probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente em uma população terem genótipo idêntico, foi calculada segundo (Paetkau et al. 1998).

As análises foram realizadas utilizando os softwares GDA (Genetic Data Analysis) (Lewis & Zaykin, 2001), IDENTITY 1.0 (Wagner & Agner & Sefc, 1999) e Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) version 1.3 Mark P. (Miller, 1997).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Busca de regiões microssatélites em sequências genômicas de *Hoplias malabaricus*

A qualidade das sequências, utilizando o software BIOFOCO, apresentou uma média igual a 73,5 sequências aceitas por placa e, conseqüentemente, o número médio de sequências rejeitadas foi igual a 22,4 por placa (Figura 14).



**Figura 14.** Número de sequências aceitas (boa qualidade) e rejeitadas utilizando o software BIOFOCO.

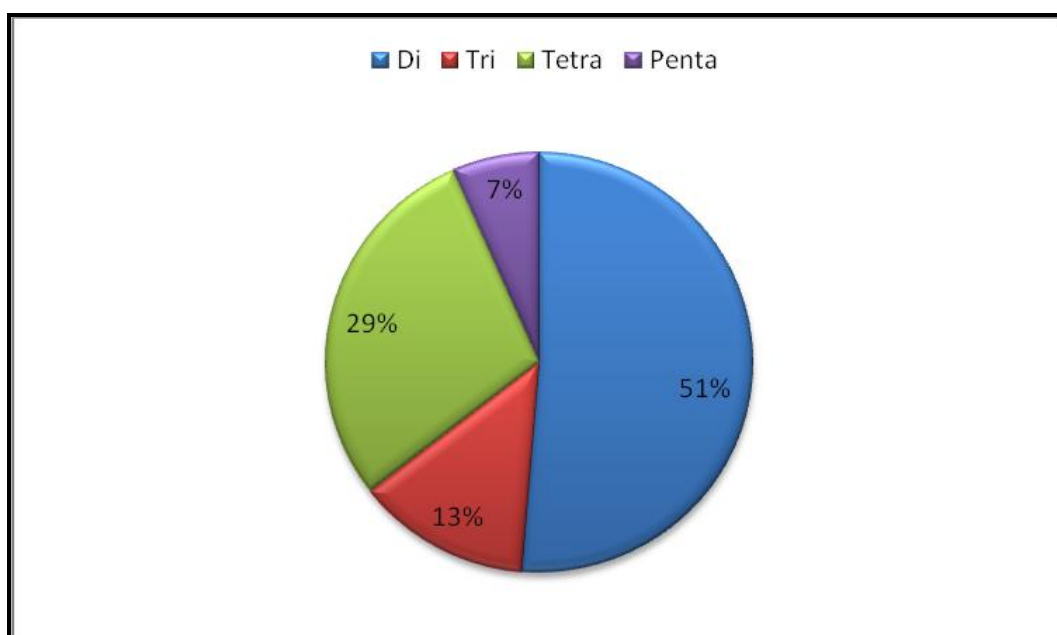
Do total de amostras contendo sequências válidas, foram geradas 662 sequências com padrão de qualidade adequado para a procura de regiões microssatélites, conforme descrito na Tabela 5.

Nas 662 sequências válidas foi possível encontrar 78 que continham regiões microssatélites com diferentes motivos de repetição (Apêndices I). Do total de sequências que apresentaram regiões microssatélites foram encontradas 39 regiões contendo dinucleotídios, 10 contendo trinucleotídios, 22 contendo tetranucleotídios e 5 contendo pentanucleotídios. (Figura 15).

**Tabela 5.** Sequencias aceitas e rejeitadas por placa analisadas pelo software BIOFOCO.

Placas	S.A <sup>1</sup>	S.R <sup>2</sup>
1	77	19
2	87	9
3	30	66
4	86	10
5	83	13
6	65	31
7	67	29
8	87	9
9	79	16
<b>Total</b>	<b>662</b>	<b>202</b>

S.A<sup>1</sup>- Sequencias aceitas S.R<sup>2</sup>- Sequencias rejeitadas.



**Figura 15.** Porcentagem de tipos de motivos repetitivos nas 78 regiões microssatélites identificadas no genoma da espécie *Hoplias malabaricus*.

Os tipos de motivos que apareceram no genoma de *Hoplias malabaricus* foram: 1) dinucleotídeos: GA, CA, TG, TC, AG, CT, TA, GT, AC, AT; 2) trinucleotídeos: CAC, AAC, TAA, AAT, GGA, TTG, ATT; 3) tetranucleotídeos: CATT, CACT, TCAC, GTGA, TTCA, TTTG, TCAT, AAAG, TGTT, TAAT, CTGG, AATG, TCAT, TTTA, CTAT, AAAC,

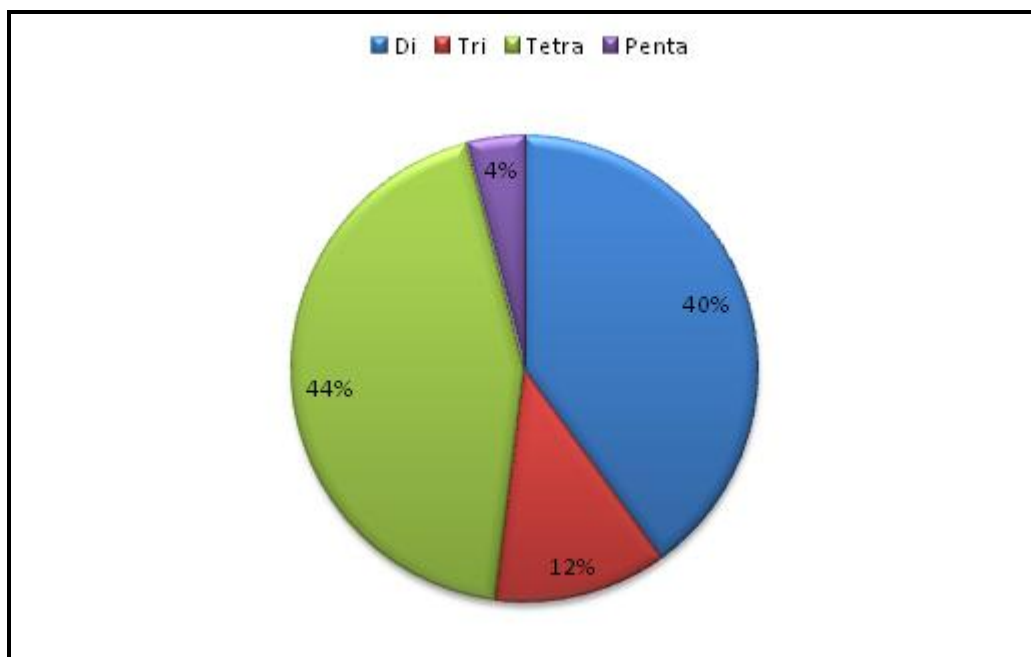
GCAG, ACTC; 4) pentanucleotídio: TTTAT, AAAAT, TTTTG, ATTTG, TTTTA; 5). O resultado encontrado confirma que a estratégia de sequenciamento aleatório a partir de bibliotecas shotgun é de fato uma estratégia adequada para a busca de diferentes tipos de regiões microssatélites, além de possibilitar uma economia de tempo e mão-de-obra (Waterston et al., 2001).

## **5.2. Caracterização dos locos microssatélites desenvolvidos para *Hoplias malabaricus***

Dos 78 iniciadores desenhados (Apêndice II), 25 foram escolhidos para a síntese e padronização da amplificação. Estes 25 iniciadores contêm 10 regiões microssatélites compostas de dinucleotídios, 3 de trinucleotídios, 11 de tetranucleotídios e um de pentanucleotídios (Figura 16).

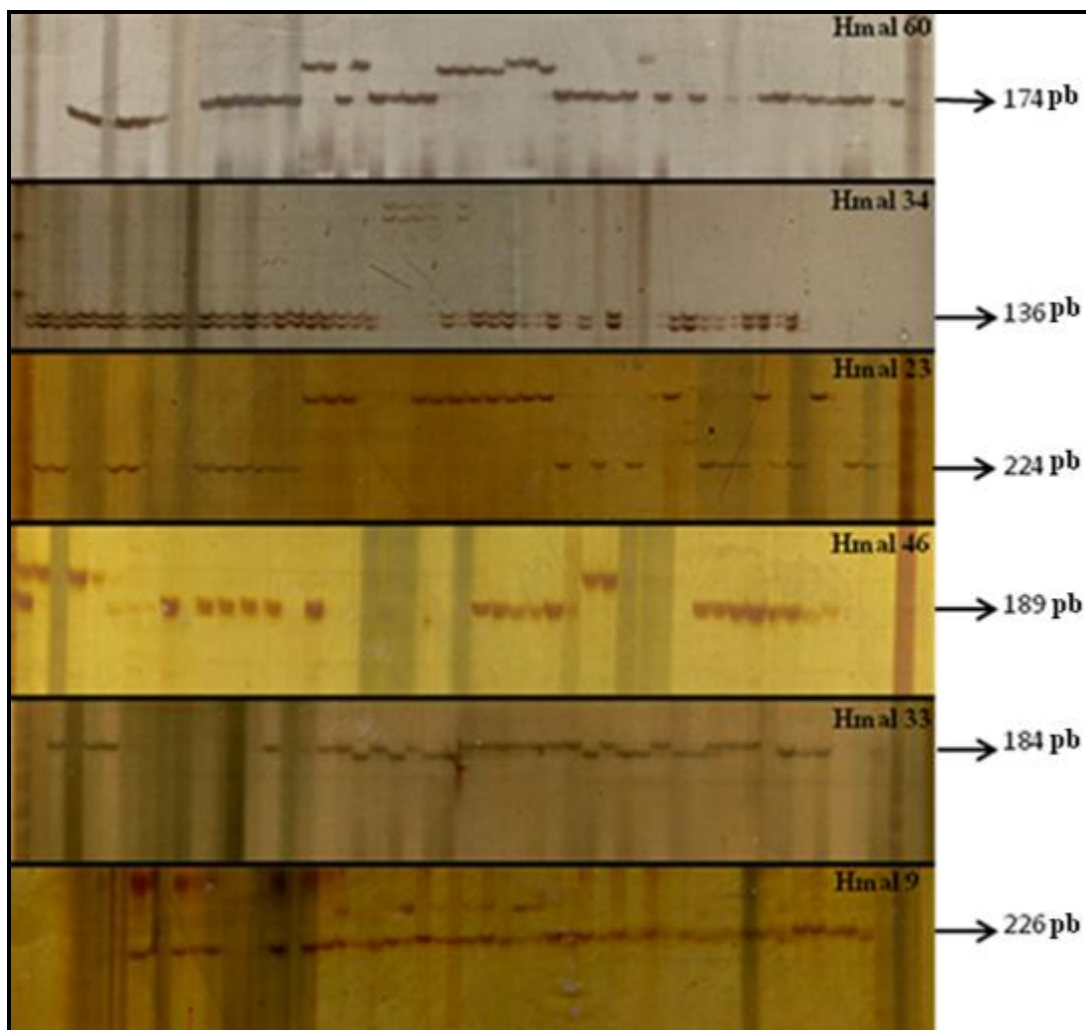
Dos 25 locos testados, 14 apresentaram produtos de amplificação satisfatórios e foram, portanto, considerados padronizados. Durante a padronização das condições de amplificação, houve a necessidade de ajuste nas condições de amplificação para o loco Hmal-15 (Anexo VI).

A faixa de variação do tamanho dos alelos dos 14 locos padronizados ficou entre 136 e 236 pares de bases (pb), conforme descrito na Tabela 6. Os locos Hmal-11, Hmal-15, Hmal-26, Hmal-39, Hmal-59, Hmal- 6, Hmal-71, e Hmal-72 apresentaram-se monomórficos para os 48 indivíduos, portanto, não são informativos para análises genético-populacionais. Para os locos Hmal-9, Hmal-23, Hmal-33, Hmal-34, Hmal-46 e Hmal 60 foi possível observar a presença de polimorfismos (Tabela 6).



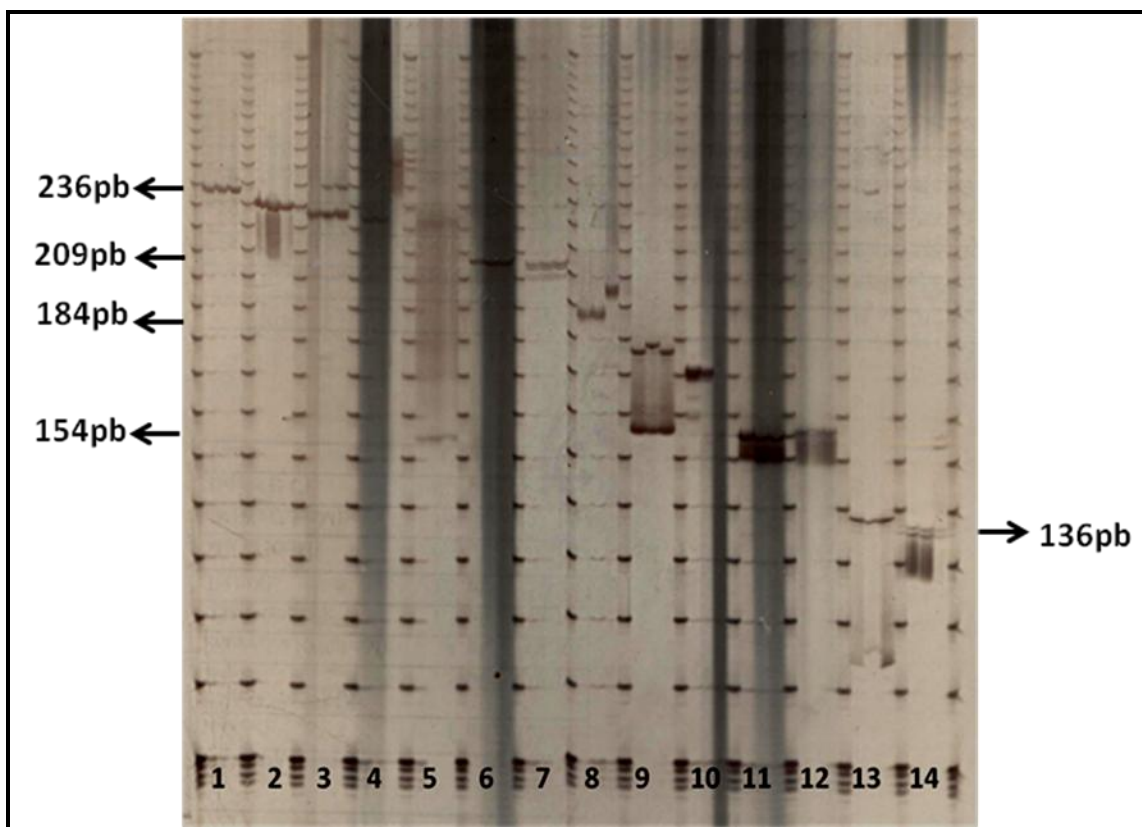
**Figura 16.** Proporções das 25 regiões microssatélites escolhidas para a espécie *Hoplias malabaricus*, de acordo com o tamanho do motivo.

A figura 18 exemplifica o padrão de amplificação dos locos Hmal-60, Hmal-34, Hmal-23, Hmal-46, Hmal-33 e Hmal-9. O número médio de alelos nos locos polimórficos foi igual a 2,166, variando entre 2 a 3 alelos por loco (Tabela 6). Para cada loco, foi confirmada a existência de cada um dos alelos a partir de uma nova eletroforese dos fragmentos de amplificação obtidos do menor número de indivíduos que contemplava todos os alelos de cada loco, formado uma escada alélica (Figura 19).



**Figura 17.** Perfil eletroforético, em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, de seis locos microssatélites polimórficos (Hmal-60, Hmal-34, Hmal-23, Hmal-46, Hmal-33 e Hmal-9) desenvolvidos para espécie *Hoplias malabaricus*.





**Figura 18.** Escadas alélicas para a confirmação da altura dos alelos dos 14 locos microssatélites desenvolvidos para a espécie *Hoplias malabaricus*, onde 1.Hmal-71, 2.Hmal-69, 3.Hmal-9, 4.Hmal-23, 5.Hmal-15, 6.Hmal-39, 7.Hmal-26, 8.Hmal-46, 9.Hmal-33, 10.Hmal-60, 11.Hmal-59, 12.Hmal-72, 13.Hmal-11, 14.Hmal-34, analisados em gel de poliacrilameida 6%, corado com nitrato de prata. As colunas das extremidades de cada foto são os marcadores de massa molecular (10 pares de bases, da Invitrogen®).

As frequências relativas dos alelos, para cada loco, estão apresentadas na Tabela 7 e Figura 20. Nesse aspecto, pode-se verificar que esse conjunto de locos não permite a detecção de variabilidade genética para produzir um bom poder de discriminação individual.

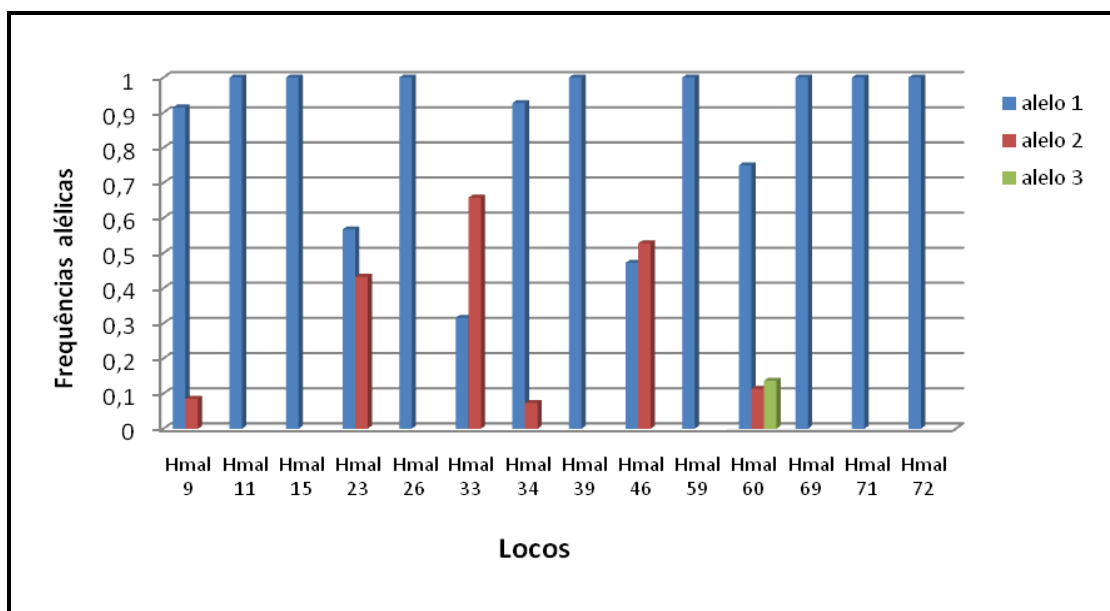
**Tabela 6.** Relação dos 14 locos microssatélites que apresentaram padrão eletroforético satisfatório para 48 indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus*, contendo a temperatura de anelamento dos locos (Ta); o número de alelos observados (Na) e a amplitude de variação do tamanho dos alelos em pares de base (AVA).

Loco	Iniciador- Forward (F)	Iniciador-Reverse (R)	Motivo	Ta	Na	AVA (pb)
Hmal 9	CAACACCTGTCCTGAGAGCA	TGGCAGTCATACACCACAGA	(GA)6	58°C	2	226 - 232
Hmal 11	TCACTCTAACCCAGGGCAAC	ACATTCCGAGTAGGCTCCG	(TTCA)3	68°C	1	137
Hmal 15	CTTGTCAGCAGAAAGTGCCC	GCTACCATTCATCACCAGCA	(AG)10	62°C	1	226
Hmal 23	CACAAGAGCAGAGGCAGTTG	TGGCAAGAATTTCCACCTT	(TAA)4	66°C	2	224- 252
Hmal 26	GGGCTAAGCGCTATTCTCT	GCACTGCAAGCAAGCAAATA	(TGTT)6	68°C	1	204
Hmal 33	AGGGGATTTCTTCAAGTCCG	GGTGGAGCGAAAAATTCAAA	(AG)6	66°C	2	184 - 190
Hmal 34	ACGCGCTCCTACAACAGTTT	TGGTGAAAGGGTGGATTTTC	(AAAC)4	66°C	2	136 - 156
Hmal 39	CCGATGTTTGTGGTATTTGC	GATGTTGTGGTTGGAGTGGA	(GGA)4	66°C	1	209
Hmal 46	GGGGCAGTGAGGATCTTTCT	TCACCAACCATTCCCATTTT	(AT)7	54°C	2	189-196
Hmal 59	AGAAAAGTGAATTGGCCGTG	TGAGGATTAGCATCAAGGGC	(TTTA)4	68°C	1	154
Hmal 60	TTTAATTGAACCCGTGAGCC	AGCATAACATTCCAGGGAGC	(AAAC)3	66°C	3	174 - 186
Hmal 69	AGCCTTTCAGCCAAGGACAG	GGTGCCATTACTTGTTAGCCA	(GA)5	66°C	1	229
Hmal 71	ATCAATGGGTGGTTCCTCAG	CACCTGTGACCATGGAATTG	(ACTC)3	66°C	1	236
Hmal 72	TGCAGTTTGCTTTGAGGTTG	CCCCTTAAACTCAGCTCCAA	(ATT)4	58°C	1	155

**Tabela 7.** Frequências alélicas dos 14 locos microssatélites.

Loco	F1 <sup>1</sup>	F2 <sup>1</sup>	F3 <sup>1</sup>
Hmal 9	0,914	0,085	0
Hmal 11	1	0	0
Hmal 15	1	0	0
Hmal 23	0,567	0,432	0
Hmal 26	1	0	0
Hmal 33	0,315	0,657	0
Hmal 34	0,927	0,072	0
Hmal 39	1	0	0
Hmal 46	0,472	0,527	0
Hmal 59	1	0	0
Hmal 60	0,750	0,113	0,136
Hmal 69	1	0	0
Hmal 71	1	0	0
Hmal 72	1	0	0

<sup>1</sup>- F1,F2,F3 – Frequências alélicas.



**Figura 19.** Frequências alélicas dos 14 locos microssatélites, estimadas a partir dos 48 indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus*.

Verifica-se que a quantidade de locos polimórficos e o número de alelos por loco foi relativamente baixo, considerando que locos microssatélites são potencialmente

multialélicos (Brondani et al., 1998; Goldstein & Schlötterer, 1999; Ellegren, 2004). Entretanto, esta quantidade pequena de alelos pode estar relacionada com o tamanho reduzido das regiões microssatélites encontradas no genoma de *H. malabaricus*, independente do tamanho do motivo de repetição, mesmo sabendo que se esperam taxas de mutação menores em motivos de repetição maiores (Ellegren, 2004). Existem diversos modelos de mutação para regiões microssatélites e a variação diferente do esperado, em função do tamanho, tem sido observada em locos microssatélites de alguns outros organismos (Van Oppen et al., 2000).

Considerando os 14 locos analisados, a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) apresentou uma média igual a 0,054 variando entre 0,020 e 0,170. A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) apresentou um valor médio igual a 0,246 variando entre 0,136 e 0,505 (Tabela 8).

Os locos Hmal-34 e Hmal-46 apresentaram menor e maior valor das estimativas de heterozigosidade, respectivamente, mostrando que, apesar do baixo polimorfismo, existe uma considerável diversidade genética nesses locos.

Os valores obtidos para o índice de fixação ( $f$ ) por loco, variaram entre -0,081 (Hmal-9) e 1,0 (Hmal-23, Hmal-33, Hmal-34, Hmal-46, Hmal-60), com média igual a 0,346 (Tabela 8). Dentre os locos que apresentaram polimorfismo, apenas o Hmal-9 apresentou desvios significativos para o teste de aderência às proporções esperados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse resultado pode ter aparecido tanto em função do tamanho amostral reduzido, quanto pelo fato de se tratar de indivíduos oriundos de localidades distintas.

A espécie *Hoplias malabaricus* já foi estudada geneticamente com marcadores RAPD e SPAR para estudos da diversidade cariotípica, caracterização molecular e variabilidade genética (Dergan & Bertollo, 1990; Dergam et al., 1998; Lucio et al., 2004; Pereira, 2005). Para os estudos com os marcadores RAPD foi utilizado *mtDNA* para verificar divergência genômica e para estudos filogeográficos. Mas até o momento nenhum estudo foi feito com o isolamento e a caracterização de iniciadores utilizando marcadores microssatélites para a espécie *Hoplias malabaricus*.

**Tabela 8.** Relação dos 14 locos microssatélites que apresentaram padrão eletroforético satisfatório para 48 indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus*, onde, (He) e (Ho) representam a heterozigosidade esperada e observada, respectivamente, (f) é o índice de fixação e (p value) é o índice de significância para o teste de aderência às proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

	<b>Loco</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>	<b>f</b>	<b>p value</b>
<b>1</b>	Hmal 9	0,158	0,170	-0,081	1,0
<b>2</b>	Hmal 11	0,0	0,0	0,0	-
<b>3</b>	Hmal 15	0,0	0,0	0,0	-
<b>4</b>	Hmal 23	0,497	0,0	1,0	0,0
<b>5</b>	Hmal 26	0,0	0,0	0,0	-
<b>6</b>	Hmal 33	0,456	0,0	1,0	0,0
<b>7</b>	Hmal 34	0,136	0,020	0,848	0,001
<b>8</b>	Hmal 39	0,0	0,0	0,0	-
<b>9</b>	Hmal 46	0,505	0,0	1,0	0,0
<b>10</b>	Hmal 59	0,0	0,0	0,0	-
<b>11</b>	Hmal 60	0,410	0,0	1,0	0,0
<b>12</b>	Hmal 69	0,0	0,0	0,0	-
<b>13</b>	Hmal 71	0,0	0,0	0,0	-
<b>14</b>	Hmal 72	0,0	0,0	0,0	-
<b>Média</b>		<b>0,246</b>	<b>0,054</b>	<b>0,346</b>	-

Renesto & Peres (2000) realizaram estudos genéticos e moleculares utilizando marcadores enzimáticos para *H. malabaricus* da bacia do Alto Rio Paraná, para estimar a variabilidade genética da espécie. Os resultados encontrados por estes autores foram relativamente próximos aos resultados encontrados neste estudo, com marcadores microssatélites, no que se refere à quantidade de locos polimórficos encontrados e à heterozigosidade observada e esperada. Renesto & Peres (2000) encontraram, para traíras coletadas em rios, uma heterozigosidade média observada de 0,048, enquanto que neste estudo a média Ho foi de 0,054, e uma heterozigosidade média esperada de 0,14, enquanto que aqui encontramos a média He de 0,24. Em relação à proporção de locos polimórficos, aqueles autores encontraram 33,3% e neste estudo o valor encontrado foi de 42,8%.

De acordo com a literatura (Yazbeck & Kalapothakis, 2007; Morelli et al., 2007; Assunção, 2009; Santos et al., 2009) já foram desenvolvidos alguns iniciadores para ordem Characiformes, conforme a (Tabela 9). Dessa forma, é possível observar que há uma grande diferença entre a quantidade de polimorfismos detectados neste estudo, com a espécie *H. malabaricus*, em comparação com a quantidade de polimorfismos encontrados por outros autores para a ordem Characiformes.

**Tabela 9.** Iniciadores desenvolvidos para a ordem Characiforme.

Espécies	Estratégia de Desenvolvimento	Números de iniciadores	Números de locos polimórficos	Números de alelos por loco	Literatura citada
<i>Prochilodus lineatus</i>	B.E <sup>1</sup>	5	5	3 - 21	(Yazbeck & Kalapothakis, 2007)
<i>Paracheirodon axelrodi</i>	B.E <sup>1</sup>	12	5	17	(Assunção, 2009)
<i>Leporinus macrocephalus</i>	B.E <sup>1</sup>	8	8	5 - 17	(Morelli et al., 2007)
<i>Colossoma macropomum</i>	B.E <sup>1</sup>	14	14	4 - 21	(Santos et al., 2009)

<sup>1</sup>- **B.E** – Biblioteca Enriquecida.

Para fins de análise de vínculo genético foi estimada a probabilidade de exclusão de paternidade (PE), que se refere à probabilidade de excluir uma falsa paternidade. Considerando os 14 locos, variou entre 0,0 (Hmal 11, Hmal 15, Hmal 26, Hmal 39, Hmal 59, Hmal 69, Hmal 71, Hmal 72) e 0,212 (Hmal 60). A probabilidade de exclusão combinada (PEC) foi igual a 0,638 que pode ser considerada “ruim”, pois foi calculada com base em 14 locos, isso ocorreu pois os locos apresentaram poucos alelos (Tabela 10). Outra medida importante em análises de vínculo genético é a probabilidade de identidade (PI), que é a probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente em uma população terem genótipo idêntico. Ela variou entre 0,460 (Hmal 60) e 1,0 (Hmal 11, Hmal 15, Hmal 26, Hmal 39, Hmal 59, Hmal 69, Hmal 71, Hmal 72) (Tabela 10).

Segundo Rodrigues et al. (2002) um bom microssatélite para análise de vínculo genético é aquele que apresenta altos valores de probabilidade de exclusão (PE), sendo satisfatórios os valores de PE maiores que 50%. Níveis reduzidos de polimorfismo ou fixação de alelos para alguns marcadores causam baixos valores de PE. É preciso ressaltar que o valor de PE é dependente do número de alelos e a distribuição de

frequências desses alelos na população. O único loco que apresentou valor de PE superior a 50%, neste estudo, foi o Hmal 60.

**Tabela 10.** Número de indivíduos (n), Número de alelos observados (Na), Probabilidade de exclusão de paternidade (PE), Probabilidade de identidade (PI).

<b>Locos</b>	<b>n</b>	<b>Na</b>	<b>PE</b>	<b>PI</b>
<b>Hmal 9</b>	41	2	0,071	0,748
<b>Hmal 11</b>	37	1	0,0	1,0
<b>Hmal 15</b>	48	1	0,0	1,0
<b>Hmal 23</b>	37	2	0,185	0,620
<b>Hmal 26</b>	48	1	0,0	1,0
<b>Hmal 33</b>	38	2	0,0	0,545
<b>Hmal 34</b>	48	2	0,063	0,775
<b>Hmal 39</b>	40	1	0,0	1,0
<b>Hmal 46</b>	36	2	0,187	0,624
<b>Hmal 59</b>	42	1	0,0	1,0
<b>Hmal 60</b>	44	3	0,212	0,460
<b>Hmal 69</b>	47	1	0,0	1,0
<b>Hmal 71</b>	45	1	0,0	1,0
<b>Hmal 72</b>	47	1	0,0	1,0
<b>Total</b>	-	21	0,638	-

## 6. CONCLUSÕES

- A estratégia de desenvolvimento de iniciadores a partir de biblioteca shotgun foi eficiente para a detecção de diferentes tipos de regiões microssatélites no genoma da espécie *Hoplias malabaricus*;
- Foi possível padronizar a amplificação de 14 locos para análise genético populacional da espécie *Hoplias malabaricus*;
- Existe um baixo polimorfismos nos 14 locos microssatélites avaliados em 48 indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus*.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Agassiz, L., Spix, J. B. Von., Selecta genera et species piscium quos in itinere per Brasiliam jussu et auspiciis Maximiliano Josephi colleget et pingendo curavit Dr J. B. de Spix. Monachi; 1829, p. 49-101.

Aguero, F. & Verdun, R. E., A random sequencing approach for the analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome: general structure, large gene and repetitive DNA families, and gene discovery. *Genome Research*; 2000, v. 10, n. 12, p. 1996-2005.

AGI. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*; 2000, v. 408, n. 6.814, p. 796-815.

AGMA, AGETOP, WWF & IMAGEM. PDIAP - Projeto de Identificação de Áreas Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade no Estado de Goiás. AGMA. Formato Digital; 2004.

Albert, J. S., Campos-da-Paz R., Phylogenetic systematics of gymnotiformes with diagnoses of 58 clades: a review of available data. In: Malabarba L.R., Reis R.E., Vari R.P., Lucena Z.M.S., Lucena C.A.S., editors. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: Edipucrs; 1998, p. 419-446.

Alfnas, A. C., Peters, I., Brune, W., Eletroforese de Proteínas e isoenzimas de Fungos e Essências Florestais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1991, p. 242.

Aparicio, S., J., Chapman, and E. Stupka, et al. (41 co-authors). Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*; 2002, p. 1301-1310.

Arruda, B. M., Projeto Corredor Ecológico Bananal-Araguaia. MMA/IBAMA. Brasília; 2006.

Assunção, A. A. A. D., Estudo da variabilidade genética do cardinal (Ostariophysi) Characiformes: *Paracheirodon axelrodi* na bacia do Rio Negro; 2009.

Bancroft, I., Duplicate and diverge: the evolution of plant genome microstructure. *Trends Genetics*; 2001, v.17, n. 2, p. 89-93.

Bankier, A. T., Weston, K. M., Random cloning and sequencing by the M13/dideoxynucleotide chain termination method. *Methods Enzymol*; 1987, v.155, p. 51-93.

Barbosa, A. S., Andarilhos da Claridade: os primeiros habitantes do Cerrado. Goiânia: Ed. da UCG; 2002.

Barros, L. A., Moraes, F., J., Oliveira, R. L., Larvas de nematóides de importância zoonótica encontradas em traças (*Hoplias malabaricus* Bloch 1794) no município de Santo Antonio do Leverger, MT. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*; 2007, v.59, n. 2, p. 533-535.

- Beckmann, J. S. & Weber, J. L., Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*; 1992, p. 627-631.
- Begossi, A., Braga, B., Food taboos and folk medicine among fishermen from the Tocantins River (Brazil). *Amazoniana*; 1992, v. 12, n.1, p. 101-118.
- Berra, T. M., An atlas of distribution of the freshwater fish families in the world. Lincoln: University of Nebraska Press; 1982.
- Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O., Fontes, M.S., Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Cytotypes with  $2n=40$  chromosomes. *Brazilian Journal of Genetics*; 1997, v. 20, p. 237-342.
- Bertollo, L. A. C., Fontes, MS., Fenocchio, A.S., Cano, J., The X1X2Y Sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I, G-, C- and chromosome replication banding. *Chrom.Res*; 1997, v. 5, p. 493-499.
- Bertollo, L. A. C., Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Pisces, Erythrinidae) [tese]. São Paulo (SP): Dept. Genética e Matemática Aplicada, Fac. Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1978.
- Bertollo, L. A. C, Born, G.G, Dergam, J. A., Fenocchio, A.S., Moreira-Filho O., A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of karyotypes and cytotaxonomic considerations. *Chrom Res*; 2000, p. 603-613.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S., Moreira-Filho, O., Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia*; 1983, v. 48, p. 1-12.
- Byrne, N. & Marquez-Garcia, M., Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Aust. Journal Botanic*; 1996, v. 44, p. 331-341.
- Bloch, M. E., Der malabarische hecht In: *Naturgeschichte des Auslandische Fische*. Berlin, Alemanha: Achter Theil. J. Moreno & Co; 1794, p. 149-150.
- Böhlke, J. E., Weitzman, S. H., Menezes, N. A., Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazônica*; 1978, p. 657-677.
- Böhlke, J. E., Weitzman, S.H., Menezes, N.A., Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amaz*; 1979, p.657-77.
- Born, G. G., Bertollo, L.A.C., Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with  $2n= 42$  chromosomes. *Genetica*; 2001, 110, p. 1-9.
- Born, G. G., Bertollo, L.A.C., A new sympatric region for distinct karyotypic forms of, *Hoplias malabaricus*. (Pisces, Erythrinidae; 2006, p. 205-210.

- Born, G. G., Bertollo, L.A.C., An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chrom.Res*; 2000, 8(2), p.111-118.
- Bouree, P., Paugan, A., Petithory, J. C., Anisakidosis: report of 25 cases and review of the literature. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis*; 1995, v. 18, p. 75-84.
- Britski, H. A., Peixes de Água Doce do Estado de São Paulo. In: *Poluição e Piscicultura, Com. Inter. Ac. Paraná- Uruguai*; 1972, p. 79-108.
- Britski, H. A., Sato Y., Rosa Abs. Manual de identificação de peixes das regiões de Três Marias: com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco. 3ª ed. Brasília: CODEVASF; 1988, p. 54-55.
- Brondani, R. P. V., Brondani, C., Tarchini, R., Grattapaglia, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*; 1998, v. 97, p. 816-827.
- Brookfield, J. F. Y., A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*; 1996, v. 5, p. 453-455.
- Bruford, M.W., Hanotte O, Brookfield J.F.Y., Burke T., Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel AR, editor. *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford (UK); 1992, p. 225–269.
- Buckup, P.A., Malabarba, L.R., A list of the fishes of the Taim Ecological Station, Rio Grande do Sul, Brazil. *Iheringia, Sér. Zool*; 1983, 63, p.103-13.
- Buckup, P. A., Menezes, N. A., Ghazzi, M. S., *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio Janeiro, Museu Nacional; 2007, p. 195.
- Bussing, W. A., Pattern of distribution of Central American ichthyofauna. In: Stehli F.G., Webb S.D., editors. *The Great American Interchange*. New York: Plenum Publ. Corp; 1985, p. 453-473.
- Carvalho G. R. & Pitcher, T. J., *Molecular genetics in fisheries*; Chapman na Hall, London; 1995, p. 141.
- Castelo, A. W., Martins, G. G., TROLL - Tandem Repeat Occurrence Locator, *Bioinformatics Journal*. TROLL - Tandem Repeat Occurrence Locator, *Bioinformatics Journal*; 2002.
- Castro, R. M. C., Casatti, L., The fish fauna from a small forest stream of the upper Parana river basin, southern Brazil. *Ichthyol Explor Freshwat*; 1997, 7(4), p. 337-352.
- Centofane, L., *Citogenética comparativa entre ictiofaunas por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na Serra da Mantiqueira [tese]*. Universidade Federal de São Carlos- São Paulo; 2003.

Chase, M., Kessely, R., Bawa, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany*; 1996, v. 83, n.1, p. 51-57.

Cho, Y. G., Ishit, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., Mccouch, S. R., Park, W. D., Ayres, N., Cartinhour, S., Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*; 2000, v.100, p. 713-722.

Cordiviola de Yuan E., Pignalberi de Hassan, C., Fish population in the Paraná River:lentic environments of Diamante and San Pedro areas (Argentine Republic). *Hydrobiologia*; 1985, 127, p. 213-218.

Courtenay, W. R. J. R., Hensley, D.A., Taylor ,J.N., Mccann, J.A., Distribution of exotic fishes in the continental United States. In: Courtenay WR. JR, Stauffer, J. R, editors. *Distribution, biology and management of exotic fishes*. Baltimore, USA: The John Hopkins University Press; 1984, p. 41-77.

Courtenay, W. R. J. R., Hensley, D.A., Taylor, J.N., Mccann, J.A., Distribution of exotic fishes in North America. In: Hocutt C.O, Wiley E.O, editors. *The Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. New York: John Wiley & Sons; 1986, p. 675-698.

Courtenay, W. R. J. R., Hensley, D.A., Survey of introduced non- native fishes. Phase I Report. *Introduced exotic fishes in North America: status*. Report submitted to National Fishery Research Laboratory. Gainesville, USA: U.S. Fish and Wildlife Service; 1979.

Creste, S. T., Neto, A., Figueira, A., Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*; 2001, v.19, p.1-8.

Cuvier, G., Valenciennes, A., *Histoire naturelle des poissons*. Tome dix- neuvième. Suite du livre dix – neuvième. Brochets ou Lucioïdes. Livre vingtième. De quelques familles de Malacoptérygiens, intermédiairesventre les Brochets et les Clupes. Paris: F. G. Levrault; 1847, p. 554-590.

Dahl, G., *Los peces del norte de Colombia*. Bogotá (Colombia): Inderena; 1971, p. 391.

Dergam, J.A., Bertollo, L.A.C. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. *Brazilian Journal of Genetics*; 1990, v.13, p.755-766.

Dergam, J.A., *Phylogeography and character congruence within the Hoplias malabaricus*Bloch; 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysa) [dissertation]. Fort Collins, Colorado: Colorado State University; 1996.

Dergam, J.A., Suzuki, H.I., Shibatta, O.A., Duboc, L.F., Júlio Jr., H.F., Giuliano-Caetano L,Black IV WC. Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi, and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology*; 1998, p. 493-496.

- Dergam, J.A., Paiva, S.R., Shaeffer, 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*; 2002, 25(4), p. 379-387.
- Domanico, A., Delfino, R. & Freyre, L., Crecimiento de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) en la laguna de Lobos (Argentina). *Iheringia, Sèr. Zool*; 1993, v.74, p. 141-149.
- Dooles, D. E. M., “O Vale dos Grandes Rios”. *Revista do Instituto Histórico e Geográfico de Goiás*. Goiânia; 1978, nº07, p. 65-73.
- Edwards, Y. J. & Elgar, G., The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *Journal Molecular Biology*; 1998, v. 278, n. 4, p. 843-854.
- Elgar, G., Clark, M. S., Meek, S., Smith, S., Warner, S., Edwards, Y. J. K., Bouchireb, N., Cottage, A., Yeo, G. S., Umrانيا, Y., Williams, G., Brenner, S. Generation and analysis of 25 Mb of genomic DNA from the pufferfish *Fugu rubripes* by sequence scanning. *Genome Research*; 1999, v.9, n.10, p. 960-971.
- Ellegren, H., Microsatélites: seqüências simples com evolução complexa. *Nature Reviews Genetics*; 2004, v.5, p. 435-445.
- Eevett, I. W., Weir, B. S., *Interpreting DNA evidence: Statistical for forensic scientists*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers; 1998, p. 278.
- Ferdig, M. T., & Su, X. Z., Microsatellite Markers and Genetic Mapping in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*; 2000, n. 16, p. 307-312.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D., *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª Ed. Brasília: Embrapa; 1996, p. 220.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D., *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ª ed. Brasília; EMBRAPA-CENARGEN; 1998.
- Ferreira, M. F. N., Pellegrini-Caramaschi, E., Aspectos da estratégia reprodutiva de machos de teleósteo na área de influência da usina hidrelétrica de Serra da Mesa, alto rio Tocantins,GO. Ferreira, M.F.N. & Caramaschi, E. P. In: *Ecologia de Reservatórios. Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata*. ed.São Carlos, SP : Rima editora; 2005, v.01, p. 305-328.
- Froese R., Pauly. D., editors. *FishBase*. World Wide Web electronic publication. Version; 2007, Disponível em: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).
- Galvis, G., Mojica, J.I., Camargo, M., *Peces del río Catatumbo*. Santafé de Bogotá (Colombia): Asociación Cravo Norte; 1997, p. 118.
- Gao, L., Tang, J., Li, H., Jia, J., Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Molecular Breeding*; 2003, p. 245-261.

- Géry, J., Characiods of the World. Neputine, T.F.H. Publications; 1977, p. 672 .
- Gill, T.N., Synopsis of the freshwater fishes of the western portion of the island of Trinidad. W. I. Ann. Lyceum Nat. Hist. N. Y; 1858, v. 6, p.363-431.
- Gill, T.N., The differential characters of characinoid and erythrinoid fishes. Proc. U. S. NatlMus; 1903, p. 205-209.
- Gimenes, M.F., Influência de variações morfológicas intraespecíficas no conteúdo energético de *Hoplias aff. malabaricus* (Bloch, 1794) na planície de inundação do alto rio Paraná [dissertação]. Universidade Estadual de Maringá Centro de Ciências Biológicas, Maringá (Paraná); 2006.
- Godoy, M., Peixes do Brasil. Subordem Caracoidei, Bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba (Brasil): Editora F; 1975.
- Goldstein, D. B. & Schlötterer, C., Microsatellites: evolution and applications. Oxford: Oxford University Press; 1999.
- Google Earth, Image Digital Globe Cnes/Spot Image, Terra Metrics; 2010.
- Grattapaglia, D., Kirst, M., *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools; 2007.
- Griffiths, A. J. F., Wessler, S.R., Lewontin, R. C., Gelbart, W.M., Miller, J. H., Suzuki, D.T. Introdução à Genética. 8ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 2006, p. 346.
- Günther, A., Catalogue of the fishes in the British Museum; 1864, p. 295
- Hamrick, J. L. & Godt, J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. D. H; CLEG, M. T; KAHLER, A. L; WEIR, B. S. (Eds) Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland: Sinauer Associates; 1990.
- Hensley, D.A., Moody, D.P. Occurrence and possible establishment of *Hoplias malabaricus* (Characoidei: Erythrinidae) in Florida. Flor Sci; 1975, v.38, p. 122-128.
- Hensley, D.A., Collection of postlarval and juvenile *Hoplias malabaricus* (Characoidei: Erythrinidae) in Florida. Flor Sci; 1976, p. 236-238.
- Hightower, L.E., Renfro, J.L., Recent applications of fish cell culture to biomedical research. Journal of Experimental Zoology; 1988, p. 284, 290-302.
- Hutchison, C. A., DNA sequencing: bench to bedside and beyond. Nucleic Acids Research; 2007, p. 6227-6237.
- Kaufman, L., Catastrophic change in species-rich freshwater ecosystem. BioScience; 1992, 42(11), p.846-58.
- Kenny, J.S., Views from the bridge: a memoir on the freshwater fishes of Trinidad.

- Maracas, St. Joseph, Trinidad and Tobago; 1995, p. 98.
- Kock, W.R., Milani P.C., Grosser K.M. Guia ilustrado: peixes Parque Delta do Jacuí. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul; 2000, p. 91.
- Lagercrantz, U., Elligren, H., Anderson, L., The abundance of various polymorphic microsatellite mitifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, v; 1993, p. 1111-1115.
- Lamas, I.R., Análise de características reprodutivas de peixes brasileiros de água doce, com ênfase no local de desova [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (M.G): Universidade Federal de Minas Gerais; 1993.
- Laurence, W.F., A crisis in the making: responses of Amazonian forests to land use and climate change. *Trends in Ecology & Evolution*; 1998, p. 411-5.
- Leoi, T.C.L., Desenvolvimento de marcadores microsatélites (SSR) em *arachis hypogaea*; 2008.
- Lewis, P. O., Zaykin, D., Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>; 2001.
- Litt, M. & Luty, J. A., A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Annual Journal Human Genetics*; 1989, p. 397-401.
- Lucio, L.C., Caracterização Molecular e Variabilidade Genética em Populações de *Hoplias aff. malabaricus* da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná. Maringá; 2002.
- Malabarba, M.C.S.L., Phylogeny of fossil Characiformes and paleobiogeography of the Tremembé Formation, São Paulo. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: Brazil: Edipucrs; 1998, p. 69-84.
- Marques, D.K.S., Gurgel, H.C.B., Lucena, I., Época de reprodução de *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. *Zoociências Juiz de Fora*; 2001, p. 61-67.
- Martins, M. L., Onaka, E. M., Fenerick, J. R., J., Larval os *Contracecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in *Hoplias malabaricus* and *Hopleryrhinus unitaeniatus* (Osteichthyes: Erythrinidae) of economic importance in occidental marshlands of Maranhão, Brazil. *Vet. Parasitol*; 2006, v. 127, p. 51-59.
- Melo, C.D., Oliveira, A.A.D., Seerig, A., Carvalho C.D., Practical application of microsatellite markers in genetic characterization and identification of stocks of tilapia; 2008.
- Menezes, N.A., Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das principais bacias fluviais do Brasil. In: *Poluição e Piscicultura: notas sobre população, ictiologia e*

piscicultura. São Paulo: Comissão Estadual Bacia Paraná- Uruguai/ Faculdade de Saúde Pública da USP/ Instituto de Pesca; 1972, p.73-78.

Milach, S.C.K., Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: UFRGS; 1998, p. 141

Miles, C., Peces del rio Magdalena. Bogotá, Colômbia: Ministerio de Economía Nacional, Sección de Piscicultura, Pesca y Caza; 1947, p. 214

Miller, R.R., Geographic distribution of Central American freshwater fishes. Copeia; 1966, p. 773-802.

Miller, P. M., Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA); 1997.

Morgante, M. & Oliveiri, A. M., PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. The Plant Journal; 1993, v. 3, p. 175-182.

Morelli, K., Revaldaves, E., Oliveira, C., Foresti, F., Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification, Genetics Molecular Research; 2007, p. 32 - 34.

Morelli, S., Citogenética Evolutiva em Espécies do Gênero Hoplias, grupo lacerdae. Macroestrutura Cariotípica, Heterocromatina e Regiões Organizadoras de Nucléolo [tese de doutorado]. São Carlos: UFSCar; 1998, p. 76 .

Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T., Erlich, H.A., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol; 1987, p. 263-273.

Nadir, E., Margalit, H., Gallily, T., and Ben-Sasson, S.A., "Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications."; 1996, p. 6470-6475.

Nei, M., Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences; 1973, v.70, n.12, p. 3321-3323.

Nelson, J.S., Fishes of the World New York. Jhon Wiley Sons; 1994, p. 600.

Oyakawa, O.T., Revisão sistemática das espécies do gênero Hoplias (grupo lacerdae) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil (Teleostei: Erythrinidae) [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1990.

Oyakawa, O.T., Relações Filogenéticas das Famílias Pyrrhulididae, Lebiassinidade e Erythrinidae (Osteichthyes, Characiformes) [tese]. São Paulo (SP): Dept. Zoologia, Instituto de Biociências, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; 1998.

Oyakawa, O.T., Family Erythrinidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ, editors. Check List of the Freshwater Fishes of South America. Porto Alegre: Edipucrs; 2003, p 238-240.



Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Viera, M. L.C., Origin, Evolution and Genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*; 2006, p. 294-307.

Oliveira, J. E., Dantas, L.L.J., Castellen, S.M., Machado, D. M., Identification of microsatellites for papaya by DNA data bank exploration; 2008.

Pacheco, M.R., Estudo morfológico de duas populações de *Hoplias* grupo *Malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) procedentes da bacia do Rio Grande, Estado de São Paulo; 2004.

Paetkau, D., Waits, L. P., Clarkson, P. L., Variation in genetic diversity across the range of north american brown bears. *Conservation Biology*; 1998.

Paiva, M. P., Crescimento, Alimetação e Reprodução da Traíra *Hoplias malabaricus* no Nordeste Brasileiro. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza; 1974.

Parker, P. G., Snow, A. A., Booton, G., Schug, M. D., Fuerst, P., What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*; 1998, n. 79, p. 361-382.

Pellegrin, J., Characinidés américains nouveaux. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat Sér*; 1907, p.125–27.

Pereira, T.L., Divergência genômica e filogeografia de traíras *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) na costa leste do Brasil [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2005.

Pesca.Com., *Hoplias malabaricus* Disponível em:< <http://peska.com.br/novopeska/>> Acesso em: 13 Janeiro; 2010.

Pesca.tur., Disponível em <http://www.pesca.tur.br/page/> 9 Março; 2008

Powell, W., Morgante, ., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A., The comparasions RFLP, RAPD, AFLP, and SSR markers for geroplasm analysis. *Molecular Breeding*; 1996, v.2, p.238-255.

Powers, D.A., Fish as model systems; 1989, *Science* 246, p. 352-358.

Prado, C.P.A.I., Gomiero, L.M.I., Froehlich, O., Spawning and parental care in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae) in the Southern Pantanal, Brazil; 2006.

Reis, R.E., Revision of the Neotropical catfish genus *Hoplosterum* (Ostariophysi: Siluriformes: Callichthyidae), with the description of two new genera and three new species. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*; 1997, 7(4), p.299-326.

Renesto, E., Peres, D. M., Estimativa da Variabilidade Genética de Peixes da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná Evidenciadas por Marcadores Moleculares. Universidade Estadual de Maringá; 2000.

- Ribeiro, A. M., Peixes da Ribeira. Kosmos; 1908, p. 1-5.
- Ringuelet, R. A., Aramburu, R. H., Aramburu, A. A., Los peces argentinos de água dulce. La Plata: Comision de Investigacion Cientifica; 1967, p. 602 .
- Rios, F. S., Kalinin, A. L., Rantin, F. T., The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. J. Fish Biol; 2002, p. 61, 85- 95.
- Ryder, O. A., Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. Trends Ecol. Evol; 1986, p.9-10.
- Rodrigues, S. G., Oliveira, D. A. A., Teixeira, C. S., et al. Microsatélites BM2113, ILSTS005, ILSTS008, ETH131 e RM88 em testes de 96 verificação de parentesco para bovinos da raça Gir. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte; 2002, p. 309-313.
- Rosa, R., Estudos Citogenéticos em diferentes populações de *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) [dissertação de mestrado]. Universidade Estadual de Londrina, Londrina (Paraná); 2006. p. 102.
- Rozen, S., Skaletsky, H., Primer3 on the <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S., (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ; 2000.
- Sabino, J., Zuanon, J. A., Stream fish assemblage in central Amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior. Ichthyological Exploration of Freshwaters; 1998, 8, p. 201-210.
- Sambrook, L.B., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Edição, Cold Spring Harbor, NY; 1989.
- Santos, M. C. F., Hrbek, T., Farias, I. P., Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain; Genetics Molecular Research ; 2009, p.874 - 876.
- Scavone, M.D.P., Bertollo, L.A.C., Cavallini, M.M., Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Cytobios; 1994, p. 223-227.
- Schaefer, S. A., Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae) In L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. L. Lucena (eds). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998, p. 375-400.
- Schlötterer, C. and B. Harr, Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma; 2000, p. 365-371.

Schaefer, S.A., Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: Brazil: Edipucrs; 1998, p.375-400.

Schug, M. D., Hutter, C. H., Wetterstrand, K. A., Gaudette, M. S., Mackay, T. F. C., Quadro, C. F., The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *D. melanogaster*. Molecular Biology Evolution; 1998, p. 1751-1760.

Shendure, J., Ji, H., Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnology; 2008, p. 1135-1145.

Slatkin, M., A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics; 1995, p. 457-462.

Smith, W.G., The distribution of summer flounder, *Paralichthys dentatus*, eggs and larvae on the continental shelf between Cape Cod and Cape Lookout; 1973, Fish Bull (Wash D C) 71, p. 527-548

Souza, L. M. F. I., Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hil. (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) – Brasil. Piracicaba ; Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidades de São Paulo; 1997.

Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E., Inouye, M., Frameshift mutations and the genetic code. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology; 1966, p. 77- 84

Takahashi, N., Phinney, B. O., Mamillan, J., A.S.C.A. Observação de um Flare X-Ray/TeV do Objeto BL Lacertae Markarian 421. New York: Springer-Verlag; 1996, p. 199-210.

Tautz, D., Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research; 1989, p. 6463-6471.

Tautz, D. & Schötterer, C., Simple sequences. Current Opinion in Genetics & Development; 1994, p. 832-837.

Telles, M.P.C., Soares, T.N., Barbosa, T.C.S., Resende, L.V., Rodrigues, F.M., Vasconcellos, B.F., Rodrigues, E. B., Luz, F. B., Marcadores RAPD para a análise genética de pau-papel (*Tibouchina papyrus*); uma espécie endêmica do Cerrado. In: Congresso Brasileiro de Genética, 49º. 2003. Águas de Lindóia. Anais. Água de Lindóia: SBG; 2003.

Timm, D. C., Disponível em: <<http://www.flickr.com/photos/32674493@N04/3111045881/in/set72157610328039849/>> 8 Dezembro; 2008.

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 2003, v. 13 p. 57-149.

Vari, R.P., & Malabarba, L.R., Neotropical Ichthyology: an overview. In Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena eds. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs; 1998, p.1-11.

Valenciennes, A., Poissons. En: D'Orbigny "Voyage dans l'Amérique Meridionale", tomo V(2): 1-9 y Atlas ictiológico (poissons:9); 1847.

Van Oppen, M. J. H., Rico, C.; Turner, G. F., Hewitt, G. M., Extensive Homoplasy, Nonstepwise Mutations, and Shared Ancestral Polymorphism at a Complex Microsatellite Locus in Lake Malawi Cichlids. *Molecular Biology and Evolution*; 2000, p. 489-498.

Venter, J. C., Adams, M. D., Sutton, G.G., Kerlavage, A.R., Smith, H.O., Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., (41 co-autores). Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*; 2002, v. 297, p. 1301-1310.

Vicari, M.R., Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C., Heterochromatin polymorphism associated with 18S r DNA. A differential pathway among the fish *Hoplias malabaricus* from Southern Brazil. *Cytogenet Genome*; 2003, Res 101, p. 24-28.

Vicari, M.R., Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C., Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genetics and Molecular Biology*; 2005, p. 103-110.

Vicari, M.R., Pazza, R., Artoni, R.F., Margarido V.P., Bertollo L.A.C., Cytogenetics and Biogeography: Considerations about the Natural Origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçú River. *Brazilian Archives of Biology and Technology*; 2006, p. 297-303.

Wagner, H. W., Sefc, K. M., IDENTITY 1.0 - Freeware program for the analysis of microsatellite data, Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences Vienna; 1999.

Waterston, H. R., Lander, S.E., Sulston, E. J., On the sequencing of the human genome, Communicated by Aaron Klug, Medical Research Council, Cambridge, United Kingdom, *Science Sessions (PNAS Podcasts)*; 2001.

Weber, J. L., Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>.(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*; 1990, p. 524-530.

Weir, B. S., *Genetic Data Analysis II: Methods For Discrete Population Genetic Data*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers; 1996, p. 445.

Wharton, D. A., Hassal, M. L., Alders, O., Anisakis (Nematoda) in some New Zealand inshore fish. N.Z.J. Mar. Freshwater Res; 1999, p. 643-648.

Yazbeck, G. M. & Kalapothakis, E., Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes), Genetics Molecular Research; 2007, p. 1026-1034.

Zane, L. Bargelloni, L., Patarnello, T., Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology; 2002, v. 11, p. 1–16.

Zhao, X. P., Kochert, G., Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC) microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). Plant Molecular Biology; 1993, v.21, p. 607-614.

Zucchi, M. I. Análise de estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Piracicaba, Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2002.



































## A N E X O I

### **Protocolo de Extração SDS (Sodium dodecyl sulphate) fenol/clorofórmio**

Passos: Maceração do tecido com o equipamento TissueRuptor diretamente em microtubos de 2,0mL, a partir de algumas gramas de tecido muscular, e em seguida adição dos tampões: 300µl de TNE 20X, 30µl de TrisHCl pH 7,5, 10µl de SDS - 20%. Seguiu-se com a adição de 10µl de proteinase K a 20mg/ml e aquecimento a 55°C por 4 horas ou 37°C durante 12 horas (overnight) em banho Maria.

Na sequência, deixou-se esfriar o material preparado e adicionou-se o volume de 250µl de Fenol, mais 250µl de Clorofórmio:Álcool isoamílico na concentração de (24:1), misturou-se bem (por inversão, por no mínimo 20 vezes) e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos (repetindo mais uma vez esta etapa). Em seguida foi retirado o sobrenadante e colocado em um tubo eppendorf de 1,5 ml; ao sobrenadante foi acrescentado 1000µl de etanol absoluto para causar a precipitação do DNA.

Novamente misturou-se bem (por inversão, no mínimo 10 vezes) e centrifugou-se durante 5 minutos a 12.000 rpm; seguiu-se com uma lavagem com álcool 70% por 2 vezes (500µl cada vez) - Inversão, no mínimo 2 vezes; lavagem mais uma vez com álcool absoluto (500µl) - Inversão, no mínimo 2 vezes e centrifugação por 2 minutos a 12.000 rpm. O pellet foi seco e em seguida ocorreu a ressuspensão com 50µl de TE com RNase (2µl de RNase para 998µl de TE) e o material obtido até este passo foi colocado em banho Maria por 1h a 37°C.

Após a extração, o DNA total foi quantificado com o auxílio de um marcador de peso molecular conhecido, em gel de agarose 1% e tampão para eletroforese TBE (Tris Borato - EDTA) na concentração de 1x. Para a visualização das bandas o gel foi corado com brometo de etídeo (10mg/mL) e fotografado por fotodocumentador.

## A N E X O II

### Construção da biblioteca Genômica

#### 1. Sonicação

Cerca de 8 alíquotas de 40 µl de DNA a 50 ng/µl foram colocadas em tubos de 0,2 ml. Estes tubos foram colocados sobre gelo em um adaptador onde uma fonte de ultra-som, gerando vibração, causou a ruptura do DNA em tamanhos variáveis. Metade dos tubos foram sonicados por 7 segundos de ondas intensas, enquanto a outra metade foi sonicada por 5 segundos de ondas intensas, sendo que a temperatura durante a sonicação era mantida entre 0°C e 4°C para que a quebra do DNA fornecesse fragmentos de todos os tamanhos sem qualquer tipo de viés gerado por aumento de temperatura (Bankier et al., 1987).

Para a seleção dos fragmentos de DNA, realizou-se uma eletroforese com o produto fragmentado (DNA genômico) em gel de agarose 1%, com o auxílio do marcador de peso molecular 1Kb, onde se verificou a presença de fragmentos do tamanho desejado (entre 1Kb a 500pb). Após a confirmação em gel de agarose 1%, obtivemos uma boa qualidade de DNA sonicado nesses tubos.

#### 2. Tratamento das extremidades dos fragmentos

As extremidades dos fragmentos de DNA, obtidos pelo sonicador, foram tratadas por uma reação pk, contendo tampão pk 10x e 100mM de DTT (Dithiothreitol). Misturou-se a enzima pk com os fragmentos do DNA, para posterior ligação ao vetor de clonagem *pMOSBlue*, segundo protocolo do *pMOSBlue Blunt Ended Cloning Kit*, fornecido pela Amersham Biosciences (Sambrook et al., 1989) (Tabela 1). Nessa fase, a reação foi incubada no termociclador a 22°C por 40 minutos, 75°C por 10 minutos e 2 minutos no gelo.

**Tabela 1. Reagentes da reação de tratamento - protocolo do Kit *pMOSBlue Blunt Ended Cloning***

---

#### Reagentes - Volume (para 1 reação)

10µl do produto da reação Pk

1µl do vetor de clonagem *pMOSBlue*, fornecido pelo Kit *pMOSBlue Blunt Ended Cloning*

1µl Tampão/T4 DNA ligase

12µl (total)

---

### **3. Ligação dos fragmentos**

Para a ligação dos fragmentos de DNA foram utilizados: a reação pk, o vetor pMOSBlue e a enzima T4 DNA ligase, que catalisa a reação. Essa reação foi incubada a 22°C overnight e depois armazenada a -20°C.

### **4. Transformação**

Posteriormente, a reação de ligação foi inserida em células competentes, disponibilizadas no próprio Kit. As células permaneceram no gelo por 30 minutos e em seguida foram transferidas para o banho Maria a 42°C por 20 segundos, voltando novamente ao gelo.

O procedimento foi feito em câmara de fluxo devidamente esterilizada com álcool 70% para evitar contaminação do material. Homogeneizou-se a solução X-gal, IPTG, H<sub>2</sub>O MilliQ. Anteriormente, o meio LB sólido foi acrescentado em placas de Petri autoclavadas, tampadas e armazenadas em estufa a (37°C) por 30 minutos para secar. Em seguida adicionou-se a solução X-gal, IPTG, H<sub>2</sub>O MilliQ em todas as placas, espalhando a solução pelas placas com o auxílio de uma alça de vidro (flambada entre uma placa e outra).

Finalmente as células transformadas foram aliqüotadas em placas de Petri contendo meio LB sólido, os antibióticos Ampicilina e Tetraciclina, e incubadas em estufa a 37 ° C por período overnight.

### **5. Seleção de transformantes**

Para a seleção de transformantes, realizou-se o repique das colônias positivas (de cor branca), uma a uma, com auxílio de uma haste de madeira autoclavada. As colônias positivas foram, então, transferidas para placas *deepwell* contendo 110µl de meio Circle Grow, permitindo o crescimento das colônias de bactérias por cerca de 22h a 37°C sob agitação a 225 rpm. Em seguida, realizou-se a preparação de reações de miniprep em placas por lise alcalina, seguindo o protocolo sugerido por Sambrook et al. (1989).

### **6. Sequenciamento automático dos fragmentos de DNA**

As reações foram preparadas a partir da precipitação com isopropanol, seguido de purificação com etanol e secagem em termociclador a 90°C por 1 minuto. Estas

reações foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , protegidas da luz. Imediatamente antes do procedimento de sequenciamento foi adicionado formamida Hi-Di às amostras que, em seguida, foram desnaturadas em termociclador por 5 minutos à  $95^{\circ}\text{C}$  e colocadas por 2 minutos no gelo (Sambrook et al., 1989).



## A N E X O III

### **Procedimento de miniprep em placa por Lise Alcalina**

Importante: Ligar a estufa a 90°C antes de iniciar a miniprep.

- 1) Centrifugar a 20°C (15 minutos 4.000 rpm) a microplaca-cultura e descartar o sobrenadante, invertendo a microplaca sobre papel absorvente por 5 min.
- 2) Adicionar ao segmento bacteriano 240µl da Solução I (GET = Tris/EDTA/Glicose), selar a placa, ressuspender com vórtex (rotação 10) por 2 min: 8 ponteiras amarelas + micropipeta multicanal + recipiente.
- 3) Centrifugar (15 minutos 4.000 rpm), descartar o sobrenadante secando a placa sobre o papel absorvente e ressuspender o sedimento bacteriano em 70µl de GET acrescido de RNase com vórtex: 8 ponteiras amarelas + micropipeta multicanal + recipiente + adesivo + GET + RNase + vórtex. - (2 placas – 14ml GET + 300µl de RNase 10mg/ml). - 150µl de RNase 20mg/ml - (4 placas – 28ml GET + 600µl de RNase 10mg/ml). - 300µl de RNase 20mg/ml
- 4) Transferir 70ul das suspensões de células para microplaca – fundo U: caixa com 96 ponteiras amarelas + 8 ponteiras incolores + micropipeta multicanal + recipiente + microplaca fundo U.
- 5) Adicionar 70ul de solução de lise preparada na hora do uso (SDS1%/NaOH 0,2M, preparar aproximadamente 14ml para 2 placas), selar com adesivo e homogeneizar por inversão 40 vezes e incubar a temperatura ambiente por 10 min: 8 ponteiras amarelas + micropipeta multicanal + recipiente + solução de lise + adesivo.
- 6) Centrifugar (1min a 4000rpm) rapidamente para solução soltar do adesivo antes de removê-lo: centrífuga.
- 7) Adicionar a 70ul de Solução de Neutralização gelada (KOAc 3M), selar com adesivo e homogeneizar por inversão 40 vezes e incubar a temperatura ambiente por 10 min: 8 ponteiras amarelas + micropipeta multicanal + recipiente + solução de Neutralização + adesivo.
- 8) Centrifugar rapidamente (1min a 4000rpm), remover o adesivo e incubar a 90°C por 30 min. A seguir, selar novamente a placa com adesivo e incubar por 10 min em gelo: centrífuga + estufa + adesivo.
- 9) Centrifugar (15min a 4000rpm) e transferir 120ul do sobrenadante para microplaca filtro ( Millipore) com a base fixada com elástico a microplaca – fundo V (cuidado para

não transferir o precipitado): centrífuga + caixa com 96 ponteiros amarelas + micropipeta multicanal + microplaca-filtro + microplaca-fundo V + fita adesivo.

**10)** Centrifugar/Filtrar (6min a 4000rpm placa de filtro nova ou 10 min a 4000 rpm placa de filtro reutilizada) e identificar a microplaca – fundo V: identificação + centrífuga.

**11)** Remover a microplaca-filtro. Precipitar os plasmídeos com a adição de 110ul de isopropanol (temp. ambiente) a microplaca-fundo V, selar com adesivo e homogeneizar por inversão 20 vezes (Incubar 30 minutos em geladeira). Centrifugar (45 minutos 4.000 rpm), descartar o sobrenadante e manter a placa invertida em papel absorvente por 5 mim: 8 ponteiros amarelas + micropipeta multicanal + recipiente + isopropanol + adesivo + centrífuga + geladeira.

**12)** Lavar com adição de 200ul de etanol 70% (temp. ambiente), centrifugar (15 mim a 4.000 rpm) e descartar os sobrenadantes: 8 ponteiros amarelas + micropipeta multicanal + recipiente + etanol 70% + adesivo + centrífuga.

**13)** Centrifugar (20 s a 600 rpm) a microplaca invertida para remoção de traços de etanol e incubar á temperatura ambiente por 1 hora ou 30 minutos na estufa a 37°C: centrífuga + papel absorvente + estufa.

**14)** Ressuspender os plasmídeos em 50ul de água com incubação o/n á temperatura ambiente: 8 ponteiros amarelas + micropipeta multicanal + recipiente + água milli Q + adesivo.

**15)** Estocagem de plasmídeos. Após a retirada de alíquota (1ul) para sequenciamento, a microplaca com o restante da solução de plasmídeos (49ul) será estocada em ultrafreezer ou freezer convencional.

## ANEXO IV

### Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram montadas utilizando o Kit DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare) (Tabela 1 e 2) e os fragmentos de DNA foram submetidos ao sequenciador automático ABI 3100.

O sequenciamento baseia-se em uma eletroforese em capilar, onde 16 capilares ficam submersos em tampões nas suas extremidades. Esses capilares são preenchidos com polímeros de acrilamida por onde passam os fragmentos de DNA que estão sendo sequenciados, que são separados por uma diferença de potencial, sob um campo elétrico. Nessa etapa, os nucleotídeos se separam e o feixe de laser que intercepta os capilares, realiza a leitura das bases nitrogenadas que compõem o fragmento de DNA dos clones.

**Tabela 1. Reação de Sequenciamento**

<b>Reação de Sequenciamento (para um sistema)</b>	
DNA	1 µl
Primer U-19	1 µl
Premix	1 µl
H <sub>2</sub> O MilliQ	7 µl
Total	10 µl

**Tabela 2. Programa para Reação de Sequenciamento**

<b>Programa para reação de Sequenciamento</b>	
<b>Temperatura (C°)</b>	<b>Tempo</b>
1° - 96°C	10 segundos
2° - 53°C	5 segundos
3° - 60°C	4 minutos
4° - 10°C	∞
30 ciclos 1°, 2°, 3°	

## ANEXO V

### Protocolo de Coloração com Nitrato de Prata (Creste, et al., 2001)

**Tabela 1. Protocolo de (Creste, et al., 2001)**

<b>Procedimentos</b>	<b>Solução</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de vezes para reutilização</b>
<b>Fixação Etanol</b>	Etanol 10%, ácido acético 1%	10'	3
<b>Lavagem</b>	Água destilada deionizada	1'	-
<b>Pré-tratamento</b>	Ácido Nítrico 1,5%	3'	4
<b>Lavagem</b>	Água destilada deionizada	1'	-
<b>Impregnação</b>	0,2% AgNO <sub>3</sub>	20'	3
<b>Lavagem</b>	Água destilada deionizada	30''	-
<b>Lavagem</b>	Água destilada deionizada	30''	-
<b>Revelação</b>	30g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 500mL H <sub>2</sub> O Milliq, Formaldeído 0,54Ml <sup>1</sup>	7-10'	-
<b>Bloqueio</b>	Ácido acético	5'	5
<b>Lavagem</b>	Água destilada deionizada	1'	-

<sup>1</sup>-Acrescentar na solução de revelação na hora de utilizar, (resfriada a 12°C) e manter sob lenta agitação.

## A N E X O VI

**Padronização das condições de amplificação, com ajuste nas condições para amplificação para loco Hmal 15.**

**Tabela 1.** Protocolo das Reações em Cadeia da Polimerase demonstrando os reagentes utilizados e suas concentrações de uso e volumes, para um sistema de 15 $\mu$ l.

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume (<math>\mu</math>l)</b>
<b>DNA</b>	25ng/ $\mu$ l	5
<b>Iniciador (F+R)</b>	1,8mM	4,4
<b>Tampão da enzima</b>	10X	1,5
<b>dNTP's</b>	2,5mM	1,3
<b>BSA</b>	10mg/ml	1,3
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50mM	1,0
<b>H<sub>2</sub>O MilliQ - autoclavada</b>	-	0,3
<b>Taq-Polimerase</b>	5U	0,2
<b>Total</b>	-	<b>15</b>

