



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDREI LINCOLN YAMACHITA

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES E ANÁLISE POPULACIONAL NO  
*Hyphessobrycon eques* E AMPLIFICAÇÃO CRUZADA EM  
*Serrapinnus notomelas***

---

Londrina  
2020

ANDREI LINCOLN YAMACHITA

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES E ANÁLISE POPULACIONAL NO  
*Hyphessobrycon eques* E AMPLIFICAÇÃO CRUZADA EM  
*Serrapinnus notomelas***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera Barrero

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

- Y19 Yamachita, Andrei Lincoln.  
Desenvolvimento de marcadores microssatélites e análise populacional no *Hyphessobrycon eques* e amplificação cruzada em *Serrapinnus notomelas* / Andrei Lincoln Yamachita. - Londrina, 2020.  
49 f. : il.
- Orientador: Nelson Mauricio Lopera Barrero.  
Coorientador: Claudete Ruas.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.  
Inclui bibliografia.
1. Conservação genética - Tese. 2. Diversidade genética - Tese. 3. Marcador Molecular - Tese. 4. SSR - Tese. I. Lopera Barrero, Nelson Mauricio. II. Ruas, Claudete. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.
- CDU 636

ANDREI LINCOLN YAMACHITA

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E  
ANÁLISE POPULACIONAL NO *Hyphessobrycon eques* E  
AMPLIFICAÇÃO CRUZADA EM *Serrapinnus notomelas***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera  
Barrero  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Carlos Antonio Lopes de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Sara Mataroli de Godoy  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho a minha família, que sempre me apoiou na carreira acadêmica e tornou esse sonho possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Nelson Mauricio Lopera Barrero, meu orientador e amigo de todas as horas, que me acompanhou desde a graduação e me ajudou com muitos problemas além da faculdade, sempre me apoiando e sendo compreensível...

A Prof<sup>a</sup> Claudete Ruas pela disponibilização do seu laboratório e de seus orientados que permitiram que esse trabalho fosse concluído...

Aos colegas Felipe Pinheiro de Souza, Ed Christian Suzuki de Lima, Victor César Freitas Pandolfi, Angela, Pamela Furlan, por todos os dias de convívio no laboratório e disponibilidade do seu conhecimento...

A todos os participantes do grupo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Aquicultura e Genética – NEPAG.

**“Try not to become a man of success, but  
rather try to become a man of value”**

(Albert Einstein)

Yamachita, Andrei Lincoln. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e análise populacional no *Hyphessobrycon eques* e amplificação cruzada em *Serrapinnus notomelas*** 2020. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

O Mato Grosso (*Hyphessobrycon eques*) é um peixe de água doce presente em diversos rios e bacias da América do Sul. Esse peixe possui grande importância do ponto de vista biológico, científico e econômico no Brasil e no mundo. Nesse estudo, foi desenvolvido e caracterizado os primeiros *primers* microssatélites para o *H. eques*, e testado a transferibilidade dos *primers* em uma espécie ornamental relacionada (*Serrapinnus notomelas*) (*Characidae*). Uma análise genética de 44 espécimes de *H. eques*, oriundos de uma população natural (WIL) e um estoque em cativeiro (CAP), revelou oito *loci* com elevado grau de polimorfismo. Foram produzidos um total de 45 alelos, variando de 126 pb (Hype2G2) e 420 pb (Hype2E2). Um desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ) foi observado em um *loci* em WIL (Hype1G4) e três *loci* em CAP (Hype1F4, Hype2C3 e Hype2G2). A presença de alelos nulos ( $p < 0,05$ ) ocorreu em apenas um locus (Hype1G4). As populações WIL e CAP apresentaram alta diferenciação genética entre si. O teste de amplificação cruzada em *S. notomelas*, revelou que apenas dois *loci* (Hype2C3 e Hype2G2B) apresentaram resultados satisfatórios de transferibilidade. Os *primers* microssatélites desenvolvidos serão úteis em estudos de diversidade genética e estrutura populacional em populações selvagens e pisciculturas de *H. eques* no Brasil e nas bacias da América do Sul.

**Palavras-chave:** Conservação genética. Diversidade genética. Mato grosso. Marcador molecular. SSR.

Yamachita, Andrei Lincoln. **Primer development and population analysis in *Hyphessobrycon eques* and cross-amplification in *Serrapinnus notomelas***. 2020. 49 p. Dissertation (Master's degree in Animal science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

Jewel tetra (*Hyphessobrycon eques*) (Characidae) is a freshwater fish present in several rivers and basins in South America. This fish has great importance for the biological, scientific, and economic point of view in Brazil and in the world. In this study, we report the development and characterisation of the first microsatellite primers of *H. eques*, and we tested the transferability of primers in a related ornamental species (*Serrapinnus notomelas*) (Characidae). A genetic analysis of 44 specimens of *H. eques*, from a natural population (WIL) and a stock in captivity (CAP), revealed eight loci with a high degree of polymorphism. A total of 45 alleles were produced, ranging from 126 bp (Hype2G2) to 420 bp (Hype2E2). A deviation in the Hardy-Weinberg balance ( $p < 0.05$ ) was observed in one locus in WIL (Hype1G4) and three loci in CAP (Hype1F4, Hype2C3 and Hype2G2). The presence of null alleles ( $p < 0.05$ ) occurred in only one locus (Hype1G4). The WIL and CAP populations showed high genetic differentiation between them. The cross amplification test in *S. notomelas*, revealed that only two loci (Hype2C3 and Hype2G2B) showed satisfactory transferability results. The microsatellite primers developed will be useful in studies of the genetic diversity and population structure in wild populations and fish farms of *H. eques* in Brazilian and other South American basins.

**Key-words:** Genetic conservation. Genetic diversity. Jewel tetra. Molecular marker. SSR.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – <i>Hyphessobrycon eques</i> .....	17
<b>Figura 2</b> – Ocorrência de <i>Hyphessobrycon eques</i> na América do Sul .....	18
<b>Figura 3</b> – <i>Serrapinnus notomelas</i> .....	19
<b>Figura 4</b> – Ocorrência de <i>Serrapinnus notomelas</i> na bacia do rio Ivinhema-MS, Alto Paraná.....	20
<b>Figura 5</b> – (a) Representação gráfica das duas primeiras análises de correspondência fatorial (FCA), quadrados amarelos: NAT, quadrados azuis = COM. (b) Análise de agrupamentos de ( <i>Hyphessobrycon eques</i> ). 1 = NAT, 2 = COM .....	40

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Caracterização do Locus, Classe/Genebank, Repetição e motif, Tamanho dos alelos (pb), Temperatura de anelamento ( $T_a$  °C) e Conteúdo de informação polimórfica dos *primers* utilizados na das populações de *Hyphessobrycon eques*.....36
- Tabela 2** – Número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), riqueza alélica ( $R_a$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p$  valor) ( $H_w$ ), coeficiente de endogamia (FIS) por população por locus .....37
- Tabela 3** – Teste de sinal para excesso/deficiência de heterozigotos nas duas populações de *Hyphessobrycon eques*.....38
- Tabela 4** – Amplificação cruzada em *S. notomelas*. Tamanho dos alelos, número de alelos ( $N_a$ ), e taxa de sucesso na amplificação ( $A_s$  %).....40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SSR	Sequence simple repeats
UEL	Universidade Estadual de Londrina
<i>H. eques</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>
<i>S. notomelas</i>	<i>Serrapinnus notomelas</i>
IAM	Infinity mutation model
TPM	Two-phase mutation model
SMM	Step-wise mutation model

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1	AQUICULTURA ORNAMENTAL NO BRASIL.....	16
2.2	HYPHESSOBRYCON EQUES .....	17
2.3	SERRAPINNUS NOTOMELAS.....	19
2.4	MARCADORES MOLECULARES.....	22
2.5	MICROSSATELITES (SSR).....	22
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
5.1	OBJETIVO GERAL.....	30
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>6</b>	<b>ARTIGO A - DESENVOLVIMENTO DE <i>PRIMERS</i> E ANÁLISE POPULACIONAL NO MATO GROSSO (<i>HYPHESSOBRYCON EQUES</i>) E AMPLIFICAÇÃO CRUZADA EM <i>SERRAPINNUS NOTOMELAS</i></b> .....	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Mato grosso, *Hyphessobrycon eques* (STEINDACHNER, 1882) está presente em diversos rios e bacias da América do Sul, como a bacia dos rios Amazonas (BUCKUP *et al.*, 2007). Apresenta grande importância do ponto de vista biológico e econômico, no Brasil e no mundo (MARCON, *et al.*, 2016; PAN, *et al.*, 2011). Apesar da importância biológica e econômica relatadas para essa espécie, não apresenta *primers* microssatélite desenvolvidos, razão pela qual se fazem necessárias pesquisas que viabilizem essa ferramenta para análises genéticas.

Entre as ações tomadas nos projetos de conservação de peixes, destaca-se a análise genética de populações. De acordo com Lopera-Barrero (2009) é de grande importância a análise de estoques e populações naturais de espécies de peixe para se saber o potencial genético caso se depare com situações de risco, permitindo a utilização desses dados para se conduzir estratégias de proteção e conservação.

Vem sendo feita a utilização de marcadores moleculares para se obter informações sobre dados de variabilidade e estrutura genética. Um dos melhores marcadores para essa finalidade são os microssatélites, pois fornecem uma grande quantidade de informações devido ao seu alto polimorfismo e a sua característica co-dominante (ABDUL-MUNEER *et al.*, 2014). Porém, para a caracterização de novos microssatélites é necessário a construção de bibliotecas de DNA genômico, triagem e sequenciamento de trechos com loci microssatélites, um processo exigente e dispendioso (HOPKINS *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2000).

Uma metodologia para contornar esta situação é a utilização de *primers* heterólogos, estudos mostraram que a região de DNA que flanqueia os *loci* microssatélites e os *primers* são relativamente conservados e os *primers* desenvolvidos para uma espécie, quando testados e adaptados, podem ser utilizados em táxons intimamente relacionados, algumas vezes apresentando um menor polimorfismo ou amplificação inespecífica (ECHT *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2006; WESTMAN & KRESOVICH, 1998).

Portanto, se mostra necessário o desenvolvimento de *primers* espécie-específicos para aprimorar e melhorar as análises genéticas no *H. eques* e a realização de testes como heterólogos na espécie *Serrapinnus notomelas*, espécie da

mesma família, de alto valor biológico e cultural, que está amplamente distribuída pelos rios do país.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AQUICULTURA ORNAMENTAL NO BRASIL

O cultivo de peixes ornamentais se iniciou no Brasil em 1955, com a descoberta e comercialização do peixe cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*, e vem se desenvolvendo desde então (CHAO *et al.*, 2001). O comércio mundial de peixes ornamentais movimentou cerca de US\$500 milhões entre os anos de 2014 e 2015 (COMTRADE, 2016), onde o Brasil saiu da vigésima primeira para a oitava posição no mercado exportador, com uma produção de US\$13,5 milhões (FARIA *et al.*, 2016).

A criação em cativeiro está levando à 'extinção' a pesca extrativista que culmina em uma alta mortalidade durante o seu processo de captura e quando executada de forma descontrolada, pode colocar os recursos naturais em risco (RIBEIRO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2010)

Essa atividade pode ajudar na sustentabilidade dos mercados ornamentais, gerando renda, milhares de empregos e oportunidades de negócio (PRANG, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2010) e auxilia na restauração de populações selvagens que foram impactadas pela exploração descontrolada podendo evitar futuros problemas (HBOI, 2000). Essa criação também permite obter maior conhecimento biológico sobre hábitos reprodutivos e alimentares de todas as fases de desenvolvimento de uma espécie (DHERT *et al.*, 1997). Outro benefício da criação em cativeiro é a possibilidade de desenvolver através de programas de melhoramento, novas linhagens com diferentes colorações e formatos que dificilmente poderiam ser encontradas na natureza (TLUSTY, 2002).

O maior polo produtor de peixes ornamentais no Brasil está localizado no estado de Minas Gerais (CARDOSO *et al.*, 2012). A aquicultura ornamental é vantajosa quando comparada a aquicultura de corte pois pode ser realizada em regime familiar, necessitando de pouco espaço; animais são vendidos por unidade e não por quilo, podendo chegar a uma valorização de 1000% (FARIA *et al.*, 2016). Para a prática de criação de peixes ornamentais, o aquarista deve ter bom controle de fuga dos animais e preferir produzir espécies nativas do que exóticas devido ao risco de escape, e quando necessário, descartar os animais de maneira adequada não os introduzindo em ambientes naturais (RIBEIRO *et al.*, 2010).

## 2.2 *Hyphessobrycon eques*

Taxonomia do Mato Grosso (STEINDACHNER, 1882):

Ordem: Characiformes

Família: *Characidae*

Gênero: *Hyphessobrycon*

Espécie: *Hyphessobrycon eques*

**Figura 1.** *Hyphessobrycon eques*.

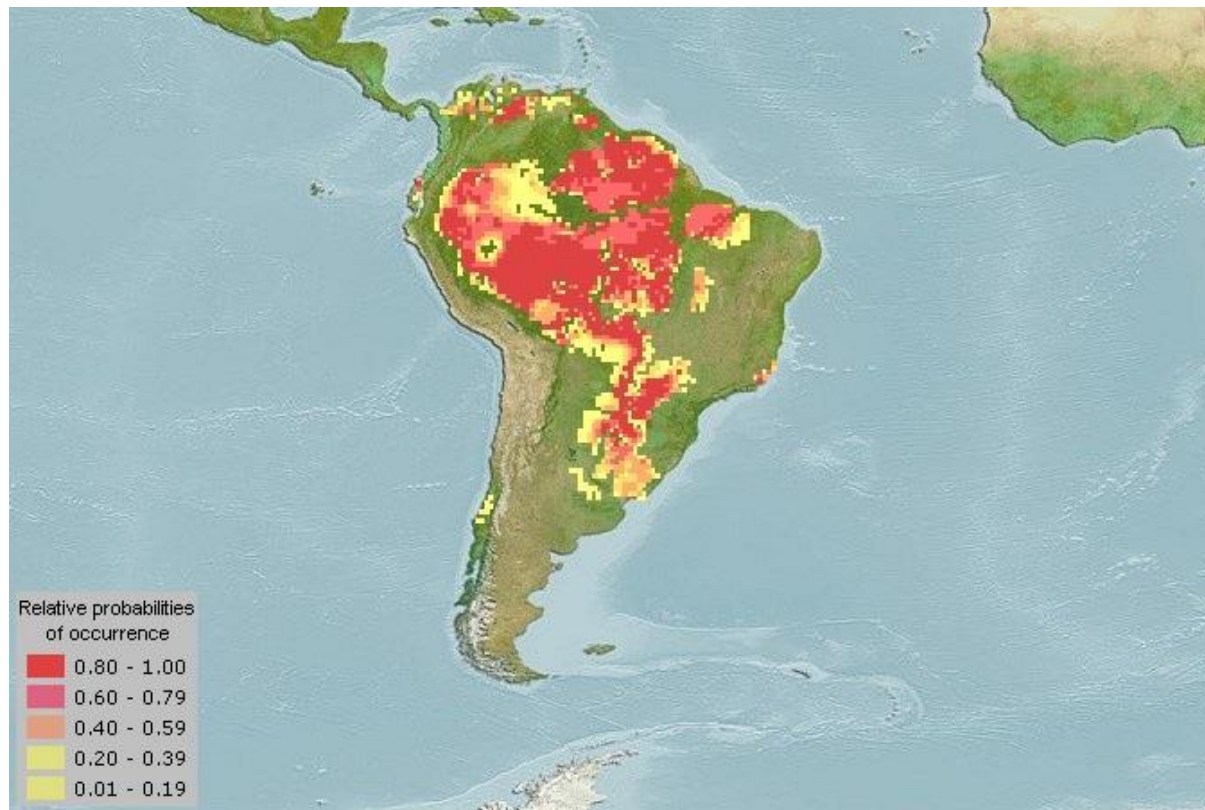


**Fonte:** o Autor

*Hyphessobrycon eques* (Figura 1), popularmente conhecido como Mato Grosso, é um peixe de pequeno porte, podendo chegar a 30mm, neotropical amplamente distribuído pela América do Sul (Figura 2), é uma das principais espécies comercializadas (GONÇALVES *et al.*, 2003). Possui grande importância como peixe ornamental devido a coloração do seu corpo, formato, facilidade de reprodução e valor econômico no mercado interno e externo (BERCHIELLI-MORAIS *et al.*, 2016; COLE & HARING, 1999).

É uma espécie que possui comportamento gregário e que vive geralmente próxima a superfície, frequentemente encontrada em águas paradas.

**Figura 2.** Ocorrência de *Hyphessobrycon eques* na América do Sul.



**Fonte:** Aquamaps (KASHNER *et al.*, 2016)

Possui hábito pacífico, exceto quando estão se alimentando (PLANQUETTE *et al.*, 1996). No ambiente natural se alimentam de minhocas, crustáceos, insetos e plantas (MILLS *et al.*, 1989).

Vem sendo utilizado como bioindicador para testes toxicológicos no Brasil, pois é altamente sensível a diferentes substâncias e adaptado a ambientes de altas temperaturas e acidez da água. (AGUINASA *et al.*, 2014).

### 2.3 SERRAPINUS NOTOMELAS

Taxonomia do *Serrapinnus notomelas* (EIGENMANN, 1915):

Ordem: Characiformes

Família: *Characidae*

Gênero: *Serrapinnus*

Espécie: *Serrapinnus notomelas*

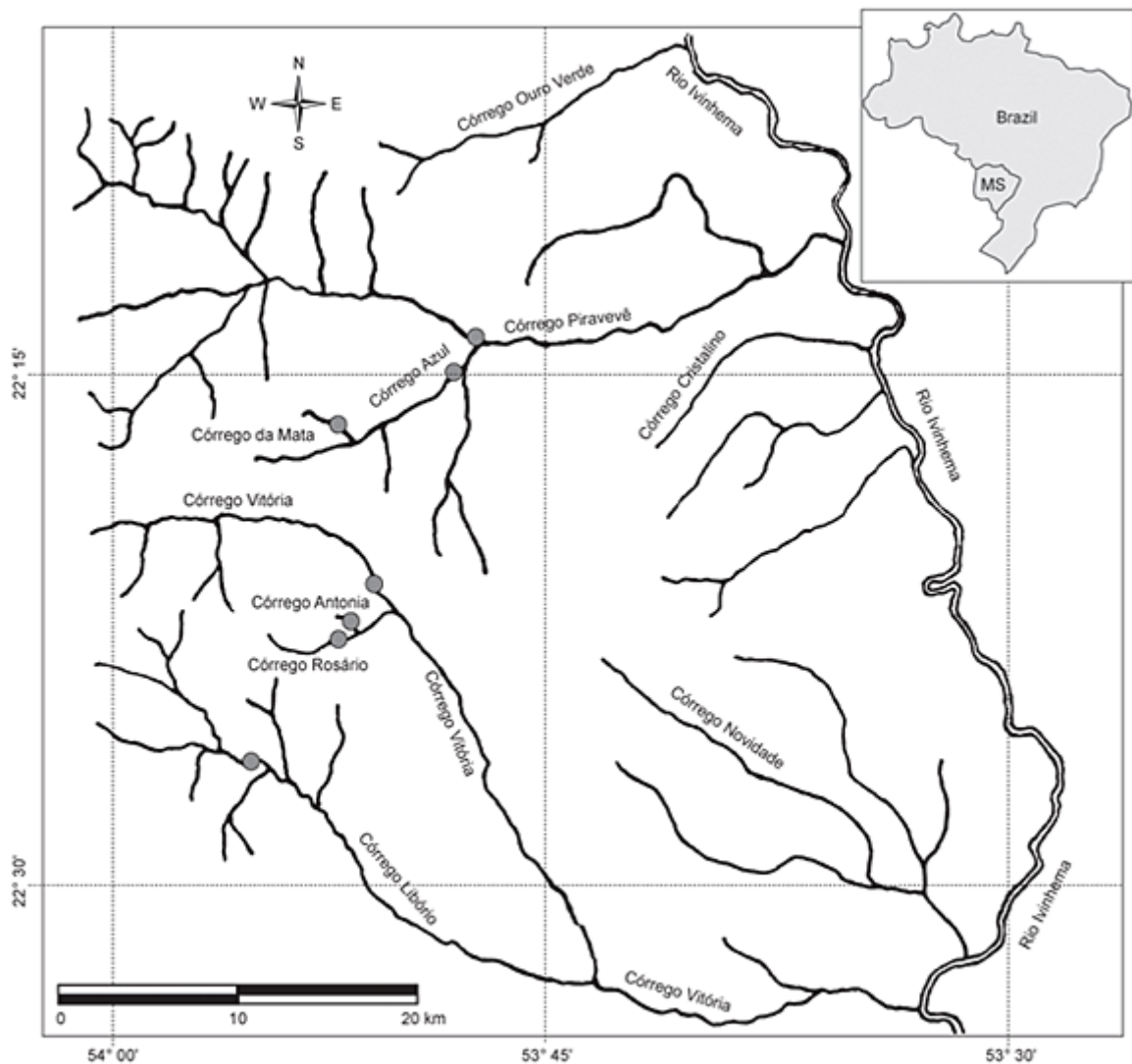
**Figura 3.** *Serrapinnus notomelas*.



**Fonte:** o autor

O *Serrapinnus notomelas* (Figura 3), também conhecido como lambarizinho, é um peixe de pequeno porte, com comprimento de 12 a 38 mm, sendo considerado onívoro por ingerir uma ampla variedade de alimentos, como algas, zooplâncton, insetos e que se reproduz o ano todo (COSTA & ROCHA, 2017). Está amplamente distribuído pelos riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná (Figura 4) (LOURENÇO *et al.*, 2008).

**Figura 4.** Ocorrência de *Serrapinnus notomelas* na bacia do rio Ivinhema-MS, Alto Paraná.



Fonte: (LOURENÇO *et al.*, 2008).

Tem grande importância pois além de serem utilizados como peixe ornamentais, são realizados muitos estudos com essa espécie afim de se conhecer mais sobre a cadeia trófica de riachos em que habitam e como animais modelos para testes toxicológicos (BENITEZ e SÚAREZ, 2009; COSTA & ROCHA, 2017; MELETTI e ROCHA 2002).

## 2.4 GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO

A biologia da conservação busca prever quais espécies estão correndo risco de extinção, entendendo o seu motivo e tentando reverter essa situação (MANNE & PIMM, 2001).

Seus pesquisadores já sabem que quanto menor o tamanho dessa população, mais suscetíveis estão a extinção devido a diversas causas ambientais como variações climáticas, competição, predação, parasitas e doenças ou causas genéticas como mudanças nas frequências genéticas devido ao efeito fundador, deriva genética ou endocruzamentos (SHAFFER, 1981).

Outro fator que pode predispor uma espécie a extinção é a fragmentação de habitats, é necessário um moderado fluxo gênico entre as populações para impedir o isolamento de subpopulações, mantendo assim a variabilidade genética e prevenindo a depressão por endogamia (FRANKLIN, 1980).

Com a utilização de técnicas de genética molecular, é possível se avaliar a diversidade genética de uma população, identificando populações com problemas estruturais e possíveis populações colonizadoras (GALBUSERA *et al.*, 2000). Essas identificações são realizadas através de ferramentas moleculares, que permitem determinar as relações de parentesco, no cálculo do tamanho efetivo das populações e número de indivíduos imigrantes (EMERY *et al.*, 2001; RANNALA & MOUNTAIN, 1997; PRITCHARD *et al.*, 2000).

Essas técnicas também podem ser aplicadas em manejos reprodutivos em cativeiro, visto que esses também sofrem por problemas de acasalamento entre indivíduos aparentados, quando sua formação de estoques de reprodutores utilizam um número insuficiente de animais, que irão causar problemas como redução do crescimento, de fecundidade em fêmeas e da sobrevivência das crias, que poderão ser sentidos a partir de três a quatro gerações (FREITAS *et al.*, 2014). A utilização de técnicas de análises genéticas nesses casos, pode assegurar níveis baixos de consanguinidade (WASKO, 2005; SOLÉ-CAVA, 2001).

## 2.5 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares são fragmentos de DNA ou outro dado molecular que permite diferenciar dois ou mais indivíduos. São utilizados para a identificação de clones, linhagens, híbridos e cultivares, também em testes de paternidade, na estimativa de diversidade, no fluxo gênico, na taxa de cruzamento e parentesco e na construção de mapas genéticos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores moleculares apresentam uma grande inovação nos programas de melhoramento clássico pois permitem compreender e organizar a variabilidade genética sem sofrer influência do ambiente e realizar cruzamentos entre genótipos que geralmente não são observados a nível fenotípico (MILACH, 1998).

O desenvolvimento de marcadores moleculares permitiu um grande avanço na engenharia genética e na biotecnologia, com a utilização desses marcadores foi possível mapear, observar e manipular a transferência de genes entre organismos. Existem diversos marcadores moleculares com potencial, como o polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e sequências simples repetidas (SSR) (MOHAN *et al.*, 1996).

Vem sendo feita a utilização de marcadores moleculares para se obter informações sobre dados de variabilidade e estrutura genética. Os marcadores moleculares são utilizados como um método na identificação de linhagens, híbridos, estimativa de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas gênicos (BUSO *et al.*, 2003). São derivados de qualquer tipo de dado molecular, que forneça polimorfismo detectável entre os organismos a serem comparados (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

## 2.6 Microssatélites (SSR)

Dentre os marcadores que são aplicados em estudos genéticos, destacam-se os microssatélites, pois fornecem uma grande quantidade de informações devido ao seu alto polimorfismo e a sua característica co-dominante (ABDUL-MUNEER *et al.*, 2014).

O genoma dos eucariotos contém sequências repetitivas simples

formadas de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em tandem, que podem ser utilizadas como marcadores, sendo chamadas de microssatélites. Esses marcadores são detectados por amplificação utilizando primers específicos e visualizados com a utilização de géis de agarose, poliacrilamida e eletroforese capilar (BUSO *et al.*, 2003; ABDUL-MUNEER, 2014). Durante o processo de replicação, pode ocorrer mutações no DNA através do *crossing-over* ou *slippage*, fazendo com que a sequência microssatélite possua diferentes tamanhos quando comparada entre os indivíduos (SMITH, 1976). A utilização de marcadores microssatélites no estudo de populações e estoques tem auxiliado a compreensão de questões evolutivas, caracterização de linhagens, programas de manejo para conservação e planejamento adequado de estoques de peixes cultivados. (MOREIRA *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

São altamente polimórficos, sendo possível diferenciar entre homozigoto, heterozigoto e multialelos e pode ser realizado com pouca quantidade de DNA, são encontrados em grandes quantidades e não precisam de radiação para reprodução. Porém, para que esse marcador possa ser usado no seu potencial máximo, é necessário um conhecimento prévio do genoma, um processo difícil e de alto custo, o que limita a utilização dessa técnica para aqueles indivíduos que não possuem *primer* espécie-específicos, como é o caso do *H. eques*. (SALLES, *et al.*, 2003).

Uma alternativa para esse caso é a utilização de *primers* construídos para uma determinada espécie, poder ser utilizado para amplificação através de PCR em espécies relacionadas devido à conservação das regiões flangeadoras dos microssatélites (RICO *et al.*, 1996; PRESA & GUYOMARD, 1996).

O método mais comum de desenvolvimento de *primers* microssatélites envolve a criação de bibliotecas genômicas, onde milhares de clones são examinados através da hibridação com sondas de sequências repetitivas marcadas com oligo nucleotídeos (BILLOTE *et al.*, 1999).

## Referências

- ABDUL-MUNEER, P. M. **Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management**: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International*, Cairo, v. 2014, p. 1-11, 2014.
- AGUINASA, J. Y., et al., Acute toxicity and determination of the active constituents of aqueous extract of *Uncaria tomentosa* bark in *Hyphessobrycon eques*. **Journal of Toxicology**, v.2014. p. 5, 2014.
- BENITEZ, R. S.; SÚAREZ, Y. R. Biología populacional de *Serrapinnus notomelas* (Eingenmann, 1915) (Characiformes, Cheirodontinae) em um riacho de primeira ordem na bacia do rio Dourados, Alto do Paraná. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, p 271-278, 2009.
- BERCHIELLI-MORAIS, F. A.; FERNANDES, J. B. K.; TAVARES-SIPAÚBA, L. H. Diets supplemented with microalgal biomass: effects on growth, survival and colouration of ornamental fish *Hyphessobrycon eques* (Steindacher 1882). **Aquaculture Research**, v. 47, p. 3061-3069, 2015.
- BILLOTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits (Paris)**. v.54, p.277-288, 1999.
- BUCKUP, P.A., et al. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 195 p, 2007.
- BUSO, G. S. C. et al. Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 46-50, 2003.
- CARDOSO, R. S.; LANA, A. M. Q.; TEIXEIRA, E. A.; LUZ, R. K.; FARIA, P. M. C. **Caracterização socioeconômica da aquicultura ornamental na região da zona da mata mineira**. Boletim Instituto da Pesca, São Paulo, 38(1): 89 – 96, 2012.
- COLE B.E., HARING, M. **Spawning and production of the serpae tetra**, *Hyphessobrycon serpae*. Univ of Hawaii Sea Grant Extension Service. Hawaii:Faustino, p. 2-4, 1999.
- COMTRADE. 2016. Aquaculture, Import/Export Data. *International Trade Statistics Database*.
- COSTA D. I.; ROCHA V. M. **Feeding ecology of *Serrapinnus notomelas* (Characiformes: Cheirodontinae) in small forests streams in the Machado River basin, Rondônia, Brazil**, *Acta Amazonica*, v. 47(1), p. 19-28, 2017.
- CHAO, N.L.; PETRY, P.; PRANG, G.; SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. **Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro basin**, Amazonia, Brazil - Project Piaba. 1ª ed. Manaus: Editora da Universidade Federal do Amazonas-

EDUA, 301 p, 2001.

DHERT, P., LIM, L.C., CANDREVA, P., VAN DUFFEL, H., SORGELOSS, P. **Possible applications of modern fish larviculture technology to ornamental fish production.** *Aquarium Sci. Conserv*1, p.119–128, 1997.

ECHT, C.S., VENDRAMIN, G.G., NELSON, C.D., and MARQUARDT, P. Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. **Can. J. For. Res.** V.29, p.365–371, 1999.

EMERY, A.M.; WILSON, I.J; CRAIG, S.; BOYLE, P.R.; NOBLE, L.R. Assignment of paternity groups without access to parental genotypes: multiple mating and development plasticity in squid. **Molecular Ecology**, v.19, n. 5, p. 1265-1278, 2001.

FARIA, P. M. C., *et al.*, **Aquicultura Ornamental: um mercado promissor.** Panorama da aquicultura, 2016. Ed.154.

FERREIRA, M. E. and GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 3 ed. p.220 1998.

FRANKLIN, I.R. Evolutionary change in small populations. **Conservation Biology: Na evolutionary-Ecological Perspective.** p.135-150, 1980.

FREITAS, R. T. F.; HILSDORF, A. W. S.; GONÇALVES, A. C. S.; MOREIRA, H. L. M. O que é endogamia e como controlá-la. **Panorama da AQUICULTURA**, vol.24, no.144, p.42 – 53, jul/ago. 2014.

GALBUSERA, P.; LENS, L.; SCHENCK, T.; WAIYAKI, E.; MATTHYSEN, E. Genetic variability and gene flow in the globally, critically-endangered Taita thrush. **Conservation Genetics**, v.1, n.1, p.45-55, 2000.

GONÇALVES, C. S.; SOUZA, U.P.; FERREIRA, F.C.; PERESSIN, A. and BRAGA, F.M.S. Life-history strategies associated to reproduction of three *Hyphessobrycon* species (Characidae) in lentic environments of upper Paraná River basin. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 25, n. 4, p. 398-405. 2013.

HBOI. **Marine ornamental production.** [www.hboi.edu/aquaculture/marine.html](http://www.hboi.edu/aquaculture/marine.html). 1 October 2000.

HOPKINS, M.S., CASA, A.M., WANG, T., MITCHELL, S.E., DEAN, R.E., KOCHERT, G.D., and KRESOVICH, S. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. **Crop Sci.**, v 39, p.1243–1247, 1999.

KASCHNER, K., KESNER-REYES, C. GARILAO, J. RIUS-BARILE, T. REES, R. FROESE. **AquaMaps:** Predicted range maps for aquatic species. World wide web electronic publication, [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org), version 10/2019

Li, C.D., ROSSNAGEL, B.G., and SCOLES, G.J. The development of oat microsatellite

markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. **Theor. Appl. Genet.**, v.101, p.1259–1268, 2000.

LOPERA-BARRERO, N.M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciência e Investigação Agrária**, v. 36, p. 191-208, 2009.

LOURENÇO, L. S.; SÚAREZ, Y. R.; FLORENTINO, A. C. Lourenço, L.S. Aspectos populacionais de *Serrapinnus notomelas* Eigenmann, 1915 e *Bryconamericus stramineus* Eigenmann, (Characiformes: Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná. **Biota Neotrop.** Oct/Dec 2008 v. 8, no. 4, 1908.

MANNE, L. L., PIMM, S. L. Beyond eight forms of rarity: which species are threatened and which will be next? **Animal Conservation.** V. 4, p.221-229, 2001.

MARCON, J., LOPES, D. S., MOUNTEER, A. H., GOULART, A. M. A., LEANDRO, M. V., BENJAMIN, L. A. Patological and histometric analysis of the gills of female *Hyphessobrycon eques* (Teleostei: Characidae) exposed to different concentrations of the insecticide Dimilin. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 131, p. 135-142, 2016.

MELETTI, P. C., ROCHA, O. Development of a chamber for in situ toxicity tests with small fishes. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 187-190, 2002

MILACH, S. C. K., **Marcadores moleculares em plantas.** p. 3-15. UFRGS, Porto Alegre, 1998.

MILLS, D., G. VEVERS. **The Tetra encyclopedia of freshwater tropical aquarium fishes.** Tetra Press, New Jersey, p.208, 1989.

MOHAN, M., NAIR, S., BHAGWAT, A., KRISHNA, T. G., YANO, M., BHATIA, C.R., SASAKI, T., **Molecular Breeding.** 3 ed. Belgium: Springer, p. 87-193, 1997.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** Brasília, vol.42, no.4, p.521-526, abr. 2007.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p. 294-307, 2006.

PAN, C. H.; CHIEN, Y. H.; WANG, Y. J. Antioxidant defence to ammonia stress of characins (*Hyphessobrycon eques* Steindachner) fed diets supplemented with carotenoids. **Aquaculture Nutrition.** v. 17, p. 258-266, 2011.

PLANQUETTE, P., P. KEITH, P.-Y. Le Bail. **Atlas des poissons d'eau douce de Guyane**. Tome 1. Collection du Patrimoine Naturel Volume 22, MNHN, Paris & INRA, Paris, p. 429, 1996.

PRANG, G. **Aviamento and the Ornamental Fishery of the Rio Negro, Brazil: Implications for Sustainable Resource Use**. In: CHAO, N.L.; PETRY, P.; PRANG, G.; SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, p.43-74, 2001.

PRESA, P.; GUYOMARD, R. Conservation of microsatellite in three species of salmonids. **Journal of Fish Biology**, v. 49, n. 6, p.1326-1329, 1996.

PRITCHARD, J.K; MATTHEW, S.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000.

RANNALA, B.; MOUNTAIN, L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. **Processing of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 94, n.17, p.9197-9201, 1997.

RIBEIRO, F. D. A. S.; CARVALHO Jr., J. R.; FERNANDES, J. B.K. e NAKAYAMA, L. Comércio brasileiro de peixes ornamentais. **Panorama da Aquicultura**, v. 18, p.54-59, 2008.

RIBEIRO, F. D. A. S.; LIMA, M. T.; FERNANDES, C. **Panorama do mercado de organismos aquáticos ornamentais**. Boletim Sociedade Brasileira de Limnologia, v. 38, n. 2, p. 15, 2010.

RICO, C.; RICO, I.; HEWITT, G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. **Proceeding of the Royal Society of London**. V. 262, n.1370, p.549-557, 1996.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P., et al., Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília. V.48 ed. 10, p.1385-1393, 2013.

SALLES, G.; BUSO, C.; CIAMPI, A. Y.; MRETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P.S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular Técnica**, Brasília, n.20, p. 1-11, set. 2003.

SHAFFER, M. L. Minimum Population Sizes for Species Conservation. **American Institute of Biological Sciences**. V. 31, n. 2, p.131-134, 1981.

SMITH, G. P. **Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover**. Science, v. 191, p. 528-35, 1976.

SOLÉ-CAVA, A.M.; Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, p.172-192, 2001.

LOURENÇO, L. S.; SÚAREZ, Y. R., FLORENTINO, A. C. Aspectos populacionais de *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann, 1915) e *Bryconamericus stramineus* Eigenmann, 1908 (Characiformes: Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná. **Biota Neotropica**, v.8, n.4, p. 43-49, 2008.

TLUSTY, M. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. **Aquaculture**, V.205, p.203-219, 2002.

WASKO, A. P. A importância do monitoramento genético em estoques cultivados de matrinxã e Piracanjuba. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 15, n.88, p.47-49, mar./abr. 2005.

WESTMAN, A.L., & KRESOVICH, S. The potential for cross-taxa simple-sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* L., and crop brassicas. **Theor. Appl. Genet.** V. 96, p. 272–281, 1998.

#### 4 HIPÓTESE

Os *primers* microsatélites desenvolvidos são uma ferramenta eficaz na avaliação de populações e estoques de Mato Grosso (*Hyphessobrycon eques*).

## 5 OBJETIVO

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver *primers* microssatélite para o *Hyphessobrycon eques* e através deles realizar a análise da variabilidade e estrutura genética de uma população e de um estoque comercial.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver *primers* espécie-específicos para o *H. eques*.
- Realizar testes de amplificação cruzada dos *primers* desenvolvidos em *S. notomelas*.

## 6 ARTIGO A – DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS E ANÁLISE POPULACIONAL EM *Hyphessobrycon eques* E AMPLIFICAÇÃO CRUZADA EM *Serrapinnus notomelas*

### Abstract

Jewel tetra (*Hyphessobrycon eques*) (Characidae) is a freshwater fish present in several rivers and basins in South America. This fish has great importance for the biological, scientific, and economic point of view in Brazil and in the world. In this study, we report the development and characterisation of the first microsatellite primers of *H. eques*, and we tested the transferability of primers in a related ornamental species (*Serrapinnus notomelas*) (Characidae). A genetic analysis of 44 specimens of *H. eques*, from a natural population (WIL) and a stock in captivity (CAP), revealed eight loci with a high degree of polymorphism. A total of 45 alleles were produced, ranging from 126 bp (Hype2G2) to 420 bp (Hype2E2). A deviation in the Hardy-Weinberg balance ( $p < 0.05$ ) was observed in one locus in WIL (Hype1G4) and three loci in CAP (Hype1F4, Hype2C3 and Hype2G2). The presence of null alleles ( $p < 0.05$ ) occurred in only one locus (Hype1G4). The WIL and CAP populations showed high genetic differentiation between them. The cross amplification test in *S. notomelas*, revealed that only two loci (Hype2C3 and Hype2G2B) showed satisfactory transferability results. The microsatellite primers developed will be useful in studies of the genetic diversity and population structure in wild populations and fish farms of *H. eques* in Brazilian and other South American basins.

**Key-words:** Genetic conservation; genetic diversity; Jewel tetra; molecular marker; SSR.

### Introdução

O Mato grosso, *Hyphessobrycon eques* (Teleostei: Characidae) (STEINDACHNER, 1882), é uma espécie de peixe amplamente distribuída nas bacias Sul Americanas, entre elas, as bacias do rio Paraguai e Amazonas (1). Essa espécie apresenta grande importância do ponto de vista biológico, científico e econômico, já que é amplamente utilizada como espécie ornamental, possui grande importância na cadeia trófica, e também é utilizado como organismo modelo em diversos estudos toxicológicos (2,3,4). Devido a essa importância, essa espécie pode se deparar com situações de risco, onde necessita de ferramentas genéticas para conduzir estratégias de proteção, conservação e controle de reprodutivo em pisciculturas (5).

Nesse contexto, os marcadores microssatélites destacam-se entre as ferramentas genéticas úteis para gestão de atividades relacionadas à conservação de populações naturais e controle genético de plantéis de peixes, principalmente devido ao seu alto grau polimorfismo por locus e a sua característica co-dominante (5, [6](#), [7](#)). Esses marcadores, por exemplo, já demonstraram ser úteis para auxiliar programas de conservação através de avaliações genéticas de populações naturais e em cativeiro de outros peixes da família *Characidae* como a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (5,8). Além disso, outra característica importante desse marcador é a possibilidade de amplificação cruzada em espécies relacionadas, ou seja, marcadores desenvolvidos para uma espécie podem ser utilizados em diferentes gêneros de uma família, quando testados e adaptados ([7](#),[8](#),[9](#)). Isso é importante já que permite uma economia de recursos e de tempo de desenvolvimento de *primers* espécies específicas.

No entanto, devido à ausência de marcadores moleculares para *H. eques*, estudos genéticos são muito limitados para a espécie. Portanto, o desenvolvimento e caracterização de *primers* microssatélites espécie-específicos podem aprimorar e melhorar as análises genéticas, e possibilitar, inclusive, estudos em espécies relacionadas, como o *Serrapinnus notomelas* (*Teleostei: Characidae*) (EIGENMAN, 1915), espécie ornamental de importância econômica e também utilizada como modelo para testes toxicológicos ([10](#),[11](#),[12](#)).

Portanto, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de desenvolver marcadores microssatélites espécie-específicos para *H. eques* e validá-los através de análise genética de uma população selvagem e de um estoque em cativeiro. Paralelamente, objetivou-se avaliar a possibilidade de amplificação cruzada dos marcadores desenvolvidos em *S. notomelas*.

## Material e Métodos

Foram coletados 24 indivíduos da espécie *H. eques* e 10 indivíduos da espécie *S. notomelas* no Ribeirão do Cafezal (23°22'36,3" S 51°10'47" W) localizado na cidade de Londrina, no Paraná. Também foram adquiridos 24 *H. eques* em piscicultura localizada no município de Muriaé – Minas Gerais, Brasil. As metodologias empregadas foram aprovadas pelo Comitê de ética no uso de animais

da Universidade Estadual de Londrina (CEUA\_UEL nº 69/2019)

### **Extração de DNA**

O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo de NaCl descrito por Lopera-Barrero, *et al.* (13). O produto dessa extração foi quantificado utilizando espectrofotômetro SLIPQ 026 – Quantificador L-Quant (Loccus Biotecnologia, Ribeirão Preto, Brasil) e diluído para 30ng/μl para uma padronização da concentração das amostras. Em seguida, a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose (1%) com tampão TBE 1X por uma hora a 100 V e 400 mA.

### **Desenvolvimento e caracterização de *primers* microssatélites.**

Para o desenvolvimento de *primers* microssatélites foi utilizado o método de captura por hibridização segundo o protocolo descrito por Billote *et al.* (14). O DNA genômico extraído (5 μg) de *H. eques* foi digerido com 50 U da enzima de restrição tipo II RsaI para a obtenção de diversos fragmentos com uma terminação conhecida, esses fragmentos foram ligados aos adaptadores de fitas simples (10 μM) Rsa 21 (5' – CTCTTGCTTACGCGTGGACTA – 3') e Rsa 25 (5' – TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA – 3') com DNA ligase T4 (Promega, Madison, WI). Para a ocorrência da ligação foi realizada a incubação a 20°C por duas horas. Os fragmentos foram selecionados por hibridização com oligo nucleotídeos biotínicos (AGA)<sub>5</sub>, (CT)<sub>8</sub> e (GT)<sub>8</sub>, complementares às sequências de microssatélites, estes fragmentos foram capturados com o uso de esferas magnéticas revestidas com estreptavidina que possui alta capacidade de conjugação com a biotina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Os fragmentos capturados foram amplificados via PCR com os *primers* para Rsa21, inseridos e clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformados em células competentes *Escherichia coli* JM 109 (Promega). Isolaram-se os plasmídeos de colônias únicas que conseguiram expressar esses genes, então foi construída uma biblioteca enriquecida em microssatélites e as inserções foram sequenciadas usando o kit de sequenciamento Big Dye Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) em sequenciador automático (ABI 3500xL, Applied Biosystems).

As leituras e análises das sequências foram feitas utilizando o

software MEGA versão 6.0 (15). O *primers* foram desenhados com o auxílio do software Primer3 versão 0.4.0 (16) e sintetizados.

## PCR e Eletroforese

Para a amplificação do DNA dos H. eques utilizando os primers sintetizados, a PCR foi realizada em um volume final de reação de 15  $\mu$ L, consistindo em 1x tampão Tris-KCL, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ M de cada dNTP, M13-tailed (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') forward primer (5pM), reverse primer (5pM), 5 $\mu$ M solution of M13-labelled (6-FAM, HEX, NED or PET), uma unidade de Hot Start Taq DNA Polimerase (LGC Biotecnologia, Cotia - SP) e 60 ng de DNA. A PCR foi realizada nas seguintes condições: quatro minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguidos por 35 ciclos de 60s de desnaturação a 95°C, 45s de anelamento (temperatura variável para cada primer) e 60 s de extensão a 72°C e uma extensão final, após os 35 ciclos, durante quinze minutos a 72°C para garantir que todos os fragmentos ligados sejam amplificados.

Inicialmente, realizou-se um teste de gradiente de temperatura para padronização das temperaturas de anelamento e descarte dos primers que apresentaram ampliações inespecíficas. Para esse teste, foi realizada amplificação em nove amostras de DNA de H. eques (três para cada temperatura) para cada par de primer. Os fragmentos gerados foram visualizados através da eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (corados com nitrato de prata). A eletroforese foi conduzida em TBE 0,5X a 180V durante 480 min. Então, foram selecionadas as melhores temperaturas de anelamento de acordo com o padrão de bandas e descartados os primers que apresentaram inespecificidade durante a amplificação.

Com as melhores temperaturas de anelamento já selecionadas, foram realizadas PCRs do DNA extraído dos 44 espécimes de H. eques (20 da população natural – WIL, e 24 do estoque em cativeiro - CAP). Os reagentes e condições de PCR foram idênticos aos citados no teste de gradiente.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3500xL, utilizando o GeneScan 600 Liz dye (Thermo Fisher Scientific) como padrão de tamanho molecular. Os alelos foram visualizados utilizando o software GeneMarker versão 2.6.3 (SoftGenetics LLC).

## **Amplificação cruzada**

Para os testes de amplificação cruzada, o DNA de 10 indivíduos de *S. notomelas* foi amplificado nas mesmas condições citadas para *H. eques*. No entanto, os fragmentos foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. O gel foi corado com nitrato de prata e o tamanho dos alelos foi estimado com base no ladder 100 pb. Nos primers que demonstraram amplificação, foi determinado o número de alelos produzidos ( $N_a$ ) e a taxa de sucesso da amplificação ( $A_s$  %) (percentagem de bandas com amplificação satisfatória).

## **Análise genética populacional em *H. eques***

Os valores de heterozigosidade observada ( $H_o$ ), esperada ( $H_e$ ), a Análise de Variância Molecular (AMOVA) e o índice de fixação par a par ( $F_{ST}$ ) foram calculados pelo software Arlequin versão 3.5 (17). A riqueza alélica ( $R_a$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), alelos de baixa frequência e exclusivos foram calculados pelo software FSTAT versão 2.9.3 (18). O gargalo genético foi calculado com o software Bottleneck 1.2.02 (19). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado com o software Cervus versão 3.0.7 (20) O software Parallel Structure (21,22) foi utilizado para a verificação de possíveis agrupamentos ( $K$ ) de populações semelhantes geneticamente, seguindo o modelo misto de clusters com um período de burn-in de 250.000 e 1.000.000 repetições de MCMC (Markov chain Monte Carlo), com 20 execuções para cada valor hipotético de  $K$ , com  $K$  variando de um a seis ( $K = 1 - 6$ ). Foi utilizado o método proposto por Evanno; Regnaut; Goudet (23), para determinar o número de clusters implementado no site do Structure Harvester (24). A análise de correspondência fatorial (ACF) baseada nas frequências alélicas foi elaborada pelo software GENETIX versão 4.05 (25). Foi testada a presença de alelos ( $p < 0.05$ ) nulos através do programa Micro-Checker (26)

## **Resultados**

Foi obtido um total de 19 regiões microssatélites, as quais foram sintetizadas os primers específicos para *H. eques*. Nos testes para padronização da

temperatura de anelamento (gradiente), foram excluídos nove primers por geração de padrões inespecíficos de amplificação. Dos dez primers que obtiveram padrões adequados de banda, dois apresentaram padrões monomórficos na análise populacional (HYPE2D2 e HYPE1D4) e foram excluídos das análises. Portanto, foram encontrados oito loci polimórficos, que produziram um total de 45 alelos, variando de 126 pb (Hype2G2) a 420 pb (Hype2E2). A melhor temperatura de anelamento para cada loci está descrita na Tabela 1. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,523 (Hype2G2B) a 0,787 (Hype1F4). (Tabela 1). Apenas o locus Hype1G4 mostrou a presença de alelos nulos ( $p < 0.05$ ) pelo software Micro-Checker. As sequências de DNA que possuíam os *loci* microsatélites foram registradas no GenBank de acordo com os números descritos na tabela 1.

**Tabela 1.** Caracterização do Loci, Classe/Genebank, Repetição e motif, tamanho dos alelos (pb), Temperatura de anelamento ( $T_a$  °C) e Conteúdo de informação polimórfica dos *primers* utilizados nas das populações de *Hyphessobrycon eques*.

Locus / Genebank	Sequência 5' – 3'	Classe	Repetição e motif	Tamanho dos alelos (pb)	$T_a$ °C	PIC
Hype1C4/ MT084600	F: GGCTAAATGGGAGTCTAACGC R: GTGTGAGGATTTAGCTGGGC	Di	(CA) <sub>11</sub>	306 – 320	62	0,690
Hype1F4/ MT084601	F: TGGAACAGGTGAAGATGCATA R: TCTTTTGGCAGAGGGTGTGA	Com	(CAGT) <sub>2</sub> (AG) <sub>18</sub>	315 – 369	59	0,787
Hype1G4/ MT084602	F: ACACGTATCCTGCACTGCTACT R: TGTGCCGTTTTAATGTCTCAAG	Com	(TG) <sub>3</sub> TA(TG) <sub>11</sub>	290 – 298	58	0,555
Hype2A3/ MT084603	F: AGCACCTGTAAACCCTCG R: GCTGTTTGATTTAAAGCTCCGG	Comp	(TG) <sub>2</sub> (TG) <sub>9</sub> (CA) <sub>2</sub> (CTTT) <sub>3</sub>	342 – 413	58	0,655
Hype2C3/ MT084604	F: AGAGACAGATGGAAGACAGAACT R: GCCGTAGACAGGAAAACCAC	Di-	(GA) <sub>3</sub> (GA) <sub>2</sub> (GA) <sub>2</sub> Ga(Ga) <sub>12</sub>	274 – 322	59	0,734
Hype2E2/ MT084605	F: TCAAGGGTAAGCAAAGTCAGC R: ACAATTGCCCAACCGAAGAG	Di-	(AG) <sub>10</sub> G(GA) <sub>5</sub>	412 – 420	59	0,548
Hype2G2/ MT084606	F: ATGCAGAAATACAGCCTGACT R: GCTAAAACACTGCCATCCCC	Comp	(GA) <sub>18</sub> GCAAG AAA (GA) <sub>7</sub>	126 – 148	59	0,688
Hype2G2B/ MT084607	F: CGATAGCAAAGACACTGGC R: GCACAGAAGCAGCCAATCA	Di	(GT) <sub>3</sub> A(TG) <sub>9</sub>	240 – 258	62	0,523

Di- = Dímero; Com: Complex; pb: pares de base.

O estoque CAP apresentou o nove de alelos de baixa frequência (<0,100), enquanto a população WIL apresentou apenas três. Em relação ao número de alelos exclusivos, foram encontrados doze alelos para a população natural e quinze

para os indivíduos CAP (Tabela Suplementar 1).

Uma média total de 4.500 alelos por locus foi observada em WIL e 5.125 em CAP (Tabela 2). O número de alelos efetivos variou entre 1.262 a 4.571, com a menor média em WIL (2.772). Os maiores valores de riqueza alélica foram identificados no locus Hype 1F4 (4,571) em WIL.

**Tabela 2.** Número de alelos (Na), número de alelos efetivos (Ne), riqueza alélica (Ra), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), equilíbrio de Hardy-Weinberg (p valor) (Hw), coeficiente de endogamia (F<sub>IS</sub>) por população por locus.

<b>WIL</b>							
<b>Locus</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ra</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Hw</b>	<b>F<sub>IS</sub></b>
Hype1C4	4.000	2.766	4.000	0.526	0.639	0.246	0.202
Hype1F4	7.000	4.571	6.550	0.850	0.781	0.878	-0.063
Hype1G4	4.000	2.391	3.991	0.211	0.582	0.000*	0.654*
Hype2A3	5.000	2.888	4.991	0.526	0.654	0.512	0.221
Hype2C3	5.000	2.945	4.944	0.889	0.660	0.063	-0.32
Hype2E2	4.000	2.360	3.981	0.450	0.576	0.350	0.243
Hype2G2	3.000	1.736	3.000	0.529	0.424	0.531	-0.220
Hype2G2B	4.000	2.254	3.979	0.550	0.556	0.862	0.037
Média	4.500	2.772	4.429	0.566	0.609	0.430	0.097
<b>CAP</b>							
<b>Locus</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ra</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Hw</b>	<b>F<sub>IS</sub></b>
Hype1C4	7.000	4.069	6.597	0.652	0.754	0.467	0.157
Hype1F4	7.000	3.767	6.707	0.591	0.735	0.009*	0.218
Hype1G4	4.000	2.262	3.967	0.619	0.558	0.616	-0.086
Hype2A3	3.000	1.262	2.943	0.227	0.208	0.948	-0.071
Hype2C3	9.000	4.083	8.173	0.810	0.755	0.002*	-0.048
Hype2E2	4.000	2.426	3.991	0.500	0.588	0.320	0.172
Hype2G2	2.000	2.000	2.000	1.000	0.500	0.000*	-1.000*
Hype2G2B	5.000	2.594	4.772	0.571	0.615	0.985	0.094
Média	5.125	2.807	4.893	0.621	0.589	0.418	-0.031

WIL: *H. eques* população selvagem, CAP: *H. eques* população cativoiro

\*p<0,05.

As médias de heterozigidade observada ( $H_o$ ) foram ligeiramente inferiores que a heterozigidade esperada ( $H_e$ ) em WIL e ligeiramente superiores que a  $H_e$  em CAP. Com exceção de Hype1G4, não foi observado desvio significativo no equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ) nos loci em WIL; no estoque CAP, por outro lado, foi observado desvio significativo em Hype1F4, Hype2C3 e Hype2G2 ( $p < 0,05$ ). O  $p$  valor de FIS foi obtido ao se comparar com o alfa 0,05 após o nível nominal ajustado de 0,00313, o resultado foi significativo para o loci Hype1G4 na população natural e para o loci Hype2G2 em CAP (Tabela 2). Em ambas as populações, o FIS médio não foi significativo ( $p < 0.05$ ).

A análise de Bottleneck revelou um excesso de heterozigotos ( $H_e$ ) ( $p < 0,05$ ) em WIL para o stepwise mutation model (IAM) e para o two-phase mutation model (TPM), por outro lado, CAP não demonstrou excesso ou deficiência de heterozigotos ( $p > 0.05$ ) nos três modelos avaliados (Tabela 3).

**Tabela 3.** Teste de sinal para excesso/deficiência de heterozigotos nas duas populações de *Hyphessobrycon eques*.

População	N	IAM <sup>a</sup>		TPM <sup>b</sup>		SMM <sup>c</sup>	
		$H_d/H_e$	P	$H_d/H_e$	P	$H_d/H_e$	P
WIL	24	0/8	0.003*	1/7	0.011*	6/2	0.054
CAP	24	2/6	0.195	3/5	0.843	7/1	0.054

N: Número de indivíduos por população,  $H_d$ : Deficiência de Heterozigotos,  $H_e$ : Excesso de Heterozigotos.

<sup>a</sup>Infinite Allele Model, <sup>b</sup>Two-phase Mutation Model, <sup>c</sup>Stepwise Mutation Model.

WIL: *H. eques* população selvagem, CAP: *H. eques* população cativoiro

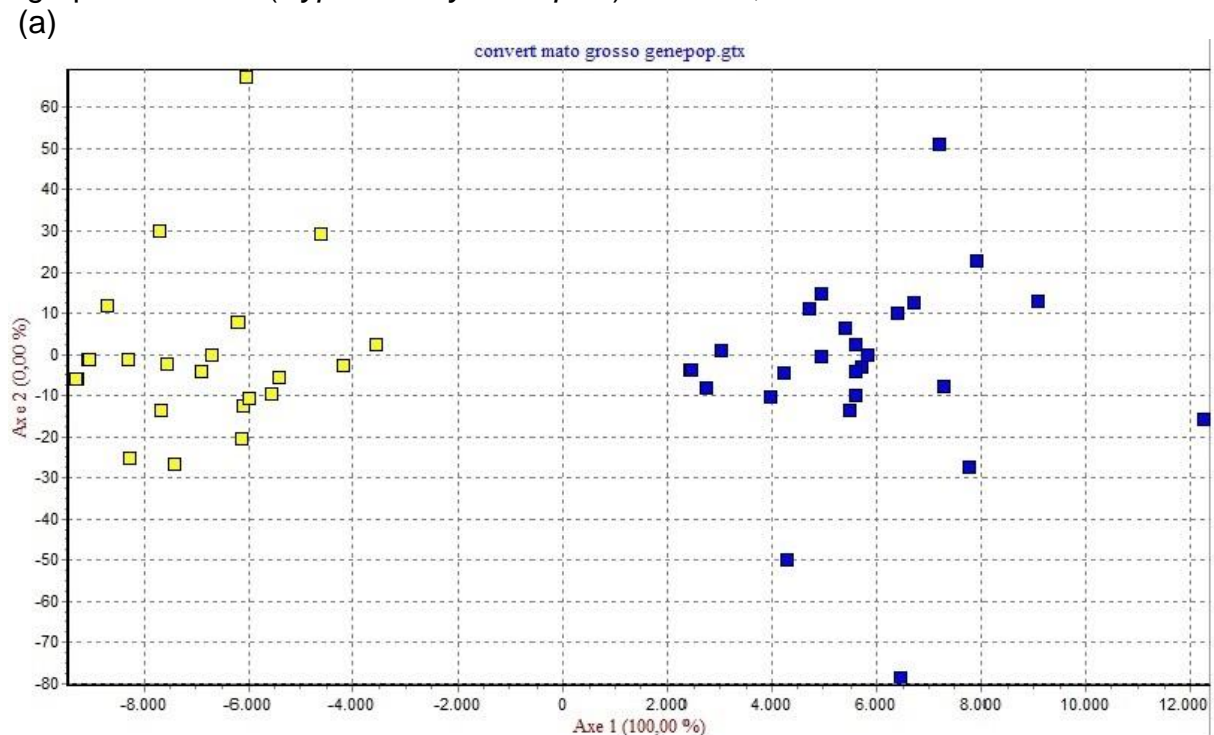
\* Valores significativos dos testes de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ).

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que a variação genética total foi maior dentro (82%) do que entre (18%) as populações. A diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) foi alta e significativa ( $p < 0.05$ ) entre as populações ( $F_{ST} = 0.176$ ).

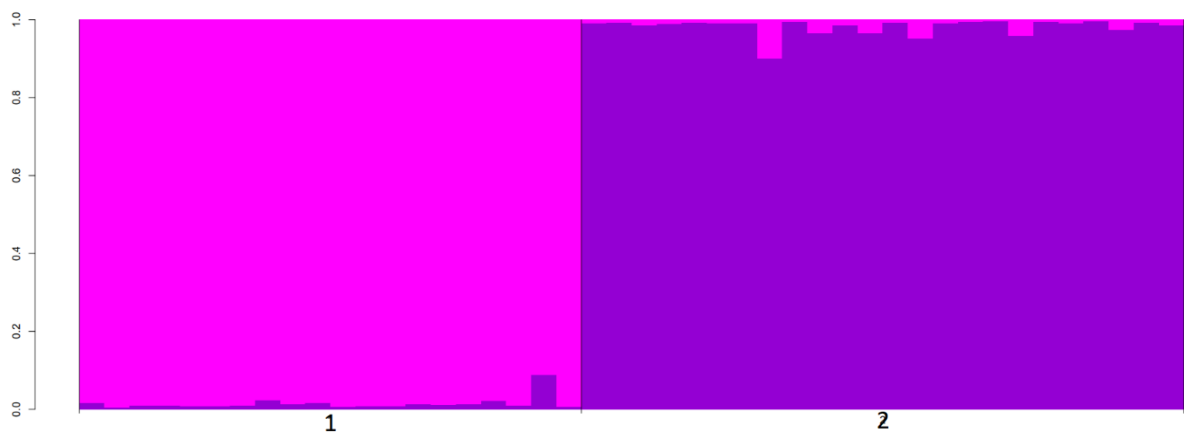
A análise de correspondência fatorial (FCA), que apresenta uma distribuição da variabilidade genética dentro de um plano cartesiano, demonstrou a formação de dois clusters, indicando que as populações estão divididas em

agrupamentos distintos, sendo que não há sobreposição entre elas (Figura 1 a). De acordo com a análise de agrupamentos, é possível observar que CAP e WIL estão estruturadas e possuem dois agrupamentos genéticos distintos (Figura 1 b). A análise de estrutura populacional demonstrou que o modelo  $K = 2$  foi o mais apropriado (Figura Suplementar 1).

**Figura 1.** (a) Representação gráfica das duas primeiras análises de correspondência fatorial (FCA), quadrados amarelos: WIL, quadrados azuis = CAP. (b) Análise de agrupamentos de (*Hyphessobrycon eques*). 1 = WIL, 2 = CAP



(b)



A transferibilidade dos loci microssatélites em *S. notomelas* demonstrou maior sucesso de amplificação nos loci Hype2C3 e o Hype2G2B, onde, respectivamente, 90 e 100% das amostras amplificaram corretamente (Tabela 4), o que foi representado pela formação de bandas bem definidas no gel. Os loci Hype2C3 e Hype2G2B produziram 4 e 3 alelos por locus, respectivamente (Tabela 4). Os restantes dos loci apresentaram baixa taxa de sucesso na amplificação ( $\leq 30\%$ ) e demonstraram não serem úteis para análises genéticas em *S. notomelas*.

**Tabela 4.** Amplificação cruzada em *S. notomelas*. Tamanho dos alelos, número de alelos (Na), e taxa de sucesso na amplificação (As %).

	Loci Microssatélites					
	HYPE1C4	HYPE2A3	HYPE2C3	HYPE2E2	HYPE2F3	HYPE2G2B
Allele size	318	374	285-315	422-437	181-189	283-309
Na	1	1	4	2	2	3
As	10%	10%	90%	20%	30%	100%

## Discussão

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) é baseado na média de heterozigotos encontrada, de acordo com a classificação de Botstein *et al.* (27), todos os primers foram muito informativos ( $>0,5$ ). Esses resultados foram superiores ao encontrado por estudos que desenvolveram marcadores microssatélites específicos para *Brycon orbignyanus* (*Characidae*) (8), e semelhante ao encontrado em estudos genéticos com outros peixes da família *Characidae* como *Bryconamericus aff. Iheringii* (28) e *Colossoma macropomum* (29), demonstrando que os loci encontrados fornecem dados suficientes para uma análise de diversidade e estrutura genética populacional.

A presença de alelos nulos pode ocasionar problemas na interpretação das frequências genotípicas, podendo levar a interpretações equivocadas sobre problemas de endogamia (30). Sua presença pode ser explicada por um problema durante o processo de amplificação ocasionada por divergência nas sequências que flanqueiam o microssatélite (31). Entretanto, apenas um locus apresentou alelos nulos no presente trabalho (Hype1G4), sendo este número inferior ao relatado por outros estudos que desenvolveram primers microssatélites em peixes

(8,32,28). Esse resultado demonstra um correto anelamento de sete dos oito primers desenvolvidos, no entanto, atenta-se à possibilidade de realização de outras investigações para averiguar se a ocorrência desses alelos no locus Hype1G4 pode ser evitada ao caracterizar geneticamente indivíduos de outras populações.

A proximidade dos valores médios de  $H_o$  e  $H_e$  ocasionaram em um coeficiente de endogamia médio (FIS) próximo a zero e não significativo ( $p > 0.05$ ) em ambas as populações. No entanto, ao analisar os *loci* individualmente, percebe-se que CAP apresentou um excesso de heterozigotos em dois loci (Hype2C3 e Hype2G2) que ocasionou em um desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg (Hw) ( $p < 0.05$ ) nesses *loci*. Moreira *et al.* (33) também encontraram valores de FIS negativos em plantéis de quatro linhagens de tilápias (chitralada, red stirling, cruzamentos Red Stirling x Red Stirling e cruzamentos chitralada x Red Stirling). No presente trabalho, contudo, o FIS foi significativo ( $p < 0.05$ ) apenas no locus Hype2G2. Esses resultados demonstram uma adequada variabilidade genética no estoque em cativeiro, indicando que, mesmo com um número limitado de reprodutores, o manejo genético-reprodutivo adotado até então foi correto (33). Entretanto, é importante ressaltar que devido ao elevado número de alelos de baixa frequência nesse estoque, a manutenção e/ou incorporação de novos reprodutores devem ser estratégias a ser consideradas para evitar um futuro declínio da diversidade genética, já que, mesmo em cruzamentos totalmente ao acaso, uma diminuição de heterozigose pode ocorrer (33).

Na população natural, apenas um locus apresentou desvio no equilíbrio de Hw ( $p < 0.05$ ) com déficit de heterozigotos significativo ( $p < 0.05$ ) (Hype1G4), demonstrando, também, a existência de adequada variabilidade genética. No entanto, ressalta-se que a análise de Bottleneck identificou excesso de heterozigotos em dois dos três modelos analisados (IAM e TPM), indicando uma possível redução recente no seu tamanho efetivo. Sabe-se que populações naturais estão sujeitas a diversos fatores podem levar a perda de alelos e consequente perda de diversidade genética, tais como fragmentação do habitat, sobrepesca, seleção natural, entre outros (34,35), podendo afetar a sobrevivência e viabilidade da população (36,37). É importante ressaltar que esses fatores em populações naturais atuam de modo e direção distintos daqueles presentes em estoques em cativeiro. Estes últimos, por sua vez, estão submetidos à seleção artificial – busca por características fenotípicas como padrões de coloração específicos em peixes ornamentais por exemplo – além do efeito fundador e deriva genética, acentuada

devido ao número limitado de reprodutores. Claramente, esses fatores que levaram a alta diferenciação genética entre as duas populações no presente estudo, corroborados pela elevada presença de alelos exclusivos, pela FCA, e pela análise bayesiana. Esse resultado é esperado, pois além dos fatores mencionados, as amostras são oriundas de regiões distantes que não possuem fluxo gênico.

A avaliação da diversidade e estrutura genética em populações de *H. eques* via microssatélites pode ser útil tanto para o controle genético dos estoques em cativeiro e desenvolvimento de linhagens específicas, quanto para proteção de populações ameaçadas. Em estoques de cativeiro, por exemplo, esses marcadores podem ser utilizados para conhecer a base genética dos plantéis, orientar os acasalamentos, controlar a endogamia, e produzir indivíduos com elevada diversidade genética (38). Sabe-se que a variabilidade genética está relacionada com a capacidade de adaptação as diversas adversidades ambientais ou antrópicas as quais os indivíduos são submetidos (34). No âmbito ornamental, isso é muito importante já que os peixes estarão submetidos a distintas condições de ambiente, tais como diferentes características físico-químicas da água, existência de enfermidades, alimentos disponíveis, convivência outras faunas, entre outros fatores específicos de cada aquário. Por outro lado, a busca por padronização de cores nas linhagens comerciais com alto valor econômico pode acelerar os efeitos deletérios da endogamia, sendo que essas ferramentas genéticas também podem auxiliar no controle e gestão dos acasalamentos para minimizar tais efeitos. Outro benefício do controle genético dessa espécie em pisciculturas está na redução da demanda por indivíduos selvagens, diminuindo a pressão de pesca sobre a espécie (39). Por fim, no caso de populações naturais, os microssatélites podem ser utilizados, por exemplo, para resolver problemas de ambiguidades taxonômicas (6), direcionar os programas de conservação (40) e entender a dinâmica evolutiva da espécie (6, 34).

O presente estudo desenvolveu e caracterizou pela primeira vez marcadores microssatélites para *H. eques*. Os resultados obtidos demonstram que esses marcadores serão úteis para estudos de diversidade e estrutura genética, e poderão contribuir substancialmente para programas de conservação e produção da espécie. Infelizmente, a amplificação cruzada em *S. notomelas* obteve apenas dois loci que produziram resultados satisfatórios (Hype2C3 e Hype2G2B). De acordo com Primmer *et al.* (41), espécies filogeneticamente relacionadas possuem maior chance de sucesso na amplificação cruzada. No presente caso, as espécies *H. eques* e *S.*

*notomelas* compartilham apenas a mesma família (Characidae), portanto, é provável que durante o processo de diferenciação evolutiva, as regiões que flanqueiam os microssatélites sofreram mutações que impossibilitam o correto anelamento desses marcadores em *S. notomelas*. Testes em peixes do gênero *Hyphessobrycon*, como *H. fernandezi*, *H. sovichthys*, entre outros, poderiam trazer resultados mais satisfatórios de transferibilidade desses marcadores. Por essa razão, ressalta-se a importância do desenvolvimento novos marcadores microssatélites específicos para estudos genéticos *S. notomelas*.

## **Conclusão**

Os *primers* microssatélites desenvolvidos e caracterizados podem ser utilizados para análises diversidade e estrutura genética em populações naturais e estoques em cativeiro de *H. eques*. Apenas dois marcadores apresentaram sucesso na amplificação cruzada em *S. notomelas*, portanto, novos estudos são necessários para desenvolver marcadores específicos para essa espécie.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os *primers* desenvolvidos nesse trabalho podem ser utilizados como ferramentas para futuras análises populacionais e de estoques, auxiliando a condução de uma reprodução direcionada para produtores ornamentais.

## REFERÊNCIAS

1. Buckup PA, et al. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: *Museu Nacional* 2006;195.
2. Aguinata JY; Claudiano GS; Marcusso, PF; Ikefuti C; Ortega GG; Eto SF; Cruz C; Moraes JRE; Moraes FR; Fernandes JBK. Acute toxicity and determination of the active constituents of aqueous extract of *Uncaria tomentosa* bark in *Hyphessobrycon eques*. *Journal of Toxicology* 2014;1687-8191;2014.
3. Marcon J; Lopes DS; Mounteer AH; Goulart AMA; Leandro MV; Benjamin LA. Pathological and histometric analysis of the gills of female *Hyphessobrycon eques* (Teleostei: Characidae) exposed to different concentrations of the insecticide Dimilin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2016;131;135-142.
4. Pan CH; Chien YH; Wang YJ. Antioxidant defence to ammonia stress of characins (*Hyphessobrycon eques* Steindachner) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquaculture Nutrition*. 2011;17;258-266.
5. Lopera-Barrero NM. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. *Ciencia e Investigación Agraria*, 2009; 36;191-208.
6. Abdul-Muneer PM. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International*, Cairo 2014;1-11.
7. Oliveira EJ; Pádua JG; Zucchi MI; Vencovsky R; Vieira MLC. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 2006;29;294-307.
8. Souza FP; Urrea-Rojas AM; Ruas CF; Povh JA; Ribeiro RP; Ruas EA. Novel

microsatellite markers for the endangered neotropical fish *Brycon orbignyanus* and cross-amplification in related species. *Italian Journal of Animal Science* 2017;17:916-920.

9. Castro PLD; Ribeiro RP; Santos SCAD; Goes ESDR; Souza FPD; Poveda-Parra AR; Lopera-Barrero NM. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. *Ciencia Animal* 2017;47.

10. Benitz RS; Suárez YR. Biología populacional de *Serrapinnus notomelas* (Eingemann, 1915) (Characiformes, Cheirodontinae) em um riacho de primeira ordem na bacia do rio Dourados, Alto do Paraná. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 2009;271-278.

11. Costa DI; Rocha VM. Feeding ecology of *Serrapinnus notomelas* (Characiformes: Cheirodontinae) in small forests streams in the Machado River basin, Rondônia, Brazil, *Acta Amazonica*, 2017;47(1);19-28.

12. Meletti PC, Rocha O. Development of a chamber for in situ toxicity tests with small fishes. *Brazilian Journal of Biology* 2002;62;187-190.

13. Lopera-Barrero NM; Povh JA; Ribeiro RP; Gomes PC; Jacometo CB; Lopes TS Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). *Ciencia e Investigación Agraria*, Santiago, 2008;35;1;15-24.

14. Billotte N; Lagoda PJJ; Risterucci AM; Baurens FC. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits (Paris)* 1999;54;277-288.

15. Tamura K; Stecher G; Peterson D; Filipski, A; Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30;2725–2729.

16. Rozen S; Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist

programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2000;132;365–386.

17. Excoffier L; Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 2010;10;564–567.

18. Goudet J. FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: UNIL – Department of Ecology and Evolution, 2005. . Disponível em: <<https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>.

19. Cournuet JM; Luikart G. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics* 1996;144;2001–2014.

20. Kalinowski ST; Taper ML; Marshall TC. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 2007;16;1099–1106. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305863>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

21. Besnier F; Glover KA. ParallelStructure: A R Package to Distribute Parallel Runs of the Population Genetics Program STRUCTURE on Multi-Core Computers. *PLoS ONE* 8, e70651 2013.

22. Pritchard JK; Stephens M; Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000;155;945–959.

23. Evanno G; Regnaut S; Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology* 2005;14;2611–2620.

24. Earl DA; Vonholdt BM. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 2012;4;359–361.

25. Belkhir K. et al. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions*, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier (France)., , 2004. . Disponible em: <<https://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>>.
26. Van Herwerden L, McIlwain K, Al-Oufi H, Al-Amry W, Reyes A. Development and application of microsatellite markers for *Scomberomorus commerson* (Perciformes; Teleostei) to a population genetic study of Arabian Peninsula stocks. *Fish Res* 2006;79;258-266.
27. Botstein D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 2017;32;314-331 Available from: . Accessed: Mar. 26, 2017.
28. Apolinário-Silva C; Ferreira DG; Cavenagh AF; Aprígio NGO; Bruno AG; Carlsson J; Sofia SH. Development and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci in *Bryconamericus aff. iheringii* (Teleostei: Characidae) and cross-amplification in related Characidae species. *Neotropical Ichthyology* 2018;16.
29. Fazzi-Gomes P; Guerreiro S; Palheta GDA; Melo NFAC; Santos S; Hamoy I. High genetic diversity and connectivity in *Colossoma macropomum* in the Amazon basin revealed by microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 2017;40;142-146.
30. Pemberton JM; Slate K; Bancroft DR; Barret JA. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology* 1995;4;249-252.
31. Smulders MJM; BREDEMEIJER W; RUS-KORTEKASS P; ARENS P; Vosman B. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical and Applied Genetics* 1997;97;264-272.

32. Vaini JO; Mota GK; Ojeda AP; Barreiros JP; Moreira RG; Hilsdorf AWS. Development and characterization of 20 polymorphic microsatellite markers for *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Perciformes: *Epinephelidae*) using 454 pyrosequencing. *Genetics and Molecular Biology* 2019;42;74-79.
33. Moreira AA; Hilsdorf AWS; Silva JV; Souza VR. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília 2007;42;521-526.
34. Frankham R; Ballou JD; Briscoe DA. Fundamentos de Genética da Conservação. Riberão Preto: *Sociedade Brasileira de Genética*, 2008;262.
35. Hassanie HA; Gilbey J. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquaculture Research* 2005;36;1450-1457.
36. Allendorf FW; Leary RF. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: *Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity*. Ed. Soulé ME. Sunderland, Massachusetts 1986;57-76.
37. Westemeier RL; Brown JD; Simpson SA; Esker TL; Jansen RW; Walk JW; Kershner EL; Bouzat JL; Paige KN. Tracking the long-term decline and recovery of a isolated population. *Science* 1998; 282;1695-1698.
38. Resende EK; Oliveira CAL; Legat AP; Ribeiro RP. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal-SBMA 2010.
39. Oliveira RC.; Santos MDCF.; Bernardino G; Hrbek T; Farias IP. From river to farm: an evaluation of genetic diversity in wild and aquaculture stocks of *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), Characidae, Bryconinae. *Hydrobiologia* 2018. 805: 75–88.
40. Souza FP; Castro PL; Goes ESR; Ribeiro RP; Santos SCA; Lima ECS; Murari PJF; Lopera-Barrero NM. 2017. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* in artificial and

semi-natural reproduction. *Italian Journal of Animal Science* 2018, 17: 321–325.

41. Primmer CR; Muller AP; Ellegren H. A wide-range survey of cross-species microsatellite. *Molecular Ecology* 1996, 5: 365-378.