

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

Identificação de Loci microssatélites em Viola - *Loricariichthys anus*
(Valenciennes, 1840)

Verônica Hammes Garcia

Pelotas, 2015

Verônica Hammes Garcia

**Identificação de Loci microssatélites em Viola - *Loricariichthys anus*
(Valenciennes, 1840)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: recursos pesqueiros).

Orientador: Dr. Sérgio Renato Nogueira Piedras

Co-orientador: Dr. Rafael Aldrighi Tavares

Co-orientador: Dr. Heden Luiz Marques Moreira

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G216i Garcia, Verônica Hammes

Identificação de Loci microssatélites em Viola -
Loricariichthys anus (Valenciennes, 1840) / Verônica
Hammes Garcia ; Sérgio Renato Noguez Piedras, orientador
; Rafael Aldrighi Tavares, Heden Luiz Marques Moreira,
coorientadores. — Pelotas, 2015.

45 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,
Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Peixe nativo. 2. SSR. 3. PALs. 4. NGS. I. Piedras,
Sérgio Renato Noguez, orient. II. Tavares, Rafael Aldrighi,
coorient. III. Moreira, Heden Luiz Marques, coorient. IV.
Título.

CDD : 639.3

Verônica Hammes Garcia

**Identificação de Loci microssatélites em Viola – *Loricariichtys anus*
(Valenciennes, 1840)**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26/02/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rafael Aldrighi Tavares (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Juvêncio Luís Osório Fernandes Pouey
Doutor em Produção Animal pela Universidade de Zaragoza

Prof. Dr. Daniel Ângelo Sganzerla Graichen.
Doutor em Genética em Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a. Carla Giovane Ávila Moreira
Doutora em Genética em Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedico

Especialmente a Deus, criador do mundo e do amor, mas também a todas as pessoas que participam do meu caminhar pela felicidade, dentre elas minha família e meu namorado.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Carlos Dagoberto e Rejani Bernadete Hammes Garcia, pela dedicação, amor, ensinamentos, me mostrando o caminho correto, sendo suporte nesta fase de estudos e fazendo com que eu siga meus sonhos, me tornando a pessoa que sou.

A minha irmã, Analice Hammes Garcia por todo amor, momentos de desabafo, descontração, mimos e parceria, e por compreender meus momentos de silêncio e estudos.

Ao meu namorado Gabriel Augusto Sehn Silva, pro ter sonhado junto comigo, por ter sido meu apoio e alavanca, por ter me permitido dividir essa jornada com ele, tanto em trabalho, conquistas, dificuldades e lágrimas. Por cada sacrifício, oração e preocupação.

A todos que acreditam no meu potencial e nos meus talentos.

Aos meus amigos do coração, por acompanharem e compreenderem minhas ausências, estando junto de mim, torcendo e orando por mim.

Ao meu orientador Sérgio Noguez Piedras, por ter dito sim ao meu pedido de orientação e por ter me acompanhado durante o mestrado, não medindo esforços aos meus pedidos e necessidades.

Ao meu co-orientador, Rafael Aldrighi Tavares, por todos os ensinamentos, palavras de incentivo, e oportunidades durante toda essa caminhada, por dar seu exemplo e por em nenhum momento negar auxílio e sabedoria; E também a sua família que foram super acolhedores e amáveis durante meus dias em Palmeira das Missões.

Ao meu co-orientador Heden Luiz Moreira, pelos ensinamentos na área que tanto me identifico e por desde o início da minha jornada acadêmica ter me aberto as portas de seu grupo de pesquisa.

A todos do programa de pós graduação em Zootecnia e demais professores que participaram da minha formação, e aqueles que me oportunizaram trabalhar ao seu lado durante estes últimos anos.

Aos colegas do Laboratório de Ictiologia e do Laboratório de Engenharia Genética animal pelos auxílios, partilhas e coleguismo.

Aos colegas biólogos e futuros biólogos do Laboratório de Genética e Evolução da UFSM – Campus Palmeira das Missões, agradeço nos nomes do Professor Daniel Graichen e da bióloga Marícia, que foram especiais nos ensinamentos, no companheirismo e na disponibilidade de me acolher no laboratório para realizar minhas análises.

E agradeço acima de tudo a Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por todos os seus sinais em minha vida.

“Ser homem é ser responsável. É sentir que colabora na construção do mundo.”

Antoine de Saint-Exupéry – Voo Noturno

Resumo

GARCIA, Verônica Hammes. **Identificação de Loci microssatélites em Viola - *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1840)**

2015. 45 folhas. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

No Brasil existe uma rica diversidade de peixes, porém, pouco se conhece sobre a biologia das diferentes espécies. A Viola – *Loricariichthys anus* – é uma espécie nativa do sul da América do Sul que possui grande potencial econômico e que necessita de uma grande atenção em relação à conservação. Os marcadores microssatélites são uma ótima ferramenta para o estudo genético, conservação e melhoramento genético de peixes, ainda mais com as tecnologias de nova geração de sequenciamento, que diminuem os custos e otimizam o tempo e os resultados. O objetivo do trabalho foi identificar loci microssatélites para a espécie não-modelo *L. anus* para posteriormente conhecer como a espécie está e se comporta geneticamente. A extração de DNA foi realizada pelo protocolo de extração de sílica de vidro modificada. Uma biblioteca genômica shotgun paired-end foi preparada através do protocolo Kit Illumina Nextera DNA Library, sendo então sequenciada em um sequenciador MiSeq Illumina e as 1.103.580 leituras obtidas foram analisadas no programa PAL_FINDER_V0.02.03 a fim de reconhecer os marcadores microssatélites. Foram obtidos 444 loci microssatélites potencialmente amplificáveis (PALs), dos quais 161 eram de dinucleotídeos, 65 de trinucleotídeos, 170 de tetranucleotídeos, 32 de pentanucleotídeos e 16 de hexanucleotídeos. Um grupo de doze loci foram escolhidos para validação através da técnica de PCR, destes 6 foram amplificados – quatro dinucleotídeos e dois tetranucleotídeos. Contudo, podemos definir que a estratégia de sequenciamento através de biblioteca shotgun paired-end da plataforma MiSeq (Illumina) apresentou-se eficaz mesmo apresentando um baixo número de PALs quando comparado a outros trabalhos, além de ser rápida e de baixo custo, quando comparada a técnicas antigas, para desenvolver marcadores microssatélites para espécies não modelo como a viola.

Palavras-Chave: peixe nativo, SSR, PALs, NGS.

Abstract

GARCIA, Verônica Hammes. **Identification of microsatellite Loci in Viola – *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1840)**. 2015. 45 sheets. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

In Brazil there is a rich diversity of fish, however, little is known about the biology of different species. The Viola - *Loricariichthys anus* - is a native species of southern South America which has great economic potential and requires great attention towards conservation. Microsatellite markers are a great tool for the genetic study, conservation and breeding of fish, especially with the next-generation sequencing technologies that reduce costs and optimize time and results. The objective was to identify microsatellite loci for the non-template species *L. anus* and know how the species is and behave genetically. DNA extraction was performed by the modified glass silica extraction protocol. A genomic library shotgun paired-end was prepared by Kit Nextera Illumina DNA Library protocol and then sequenced in a MiSeq Illumina sequencer and 1,103,580 of obtained readings were analyzed in PAL_FINDER_V0.02.03 program to recognize the microsatellite markers. Were obtained 444 microsatellite loci potentially amplifiable (PALs), of which 161 were dinucleotides, 65 were trinucleotides, 170 were tetranucleotides, 32 and 16 pentanucleotides and hexanucleotides. A group of twelve loci were chosen for validation by PCR. These 6 were amplified - four dinucleotides and two tetranucleotides. However, we can define the sequencing strategy through library shotgun paired-end MiSeq platform (Illumina) presented itself effective even with a low number of PALs when compared with other studies, as well as being quick and inexpensive to develop microsatellite markers for non-template species such as the viola.

Key-Words: native fish, SSR, PALs, NGS

Lista de Figuras

Figura 1	Termociclador Biocycler.....	20
Figura 2	Figura 2 - Amplificação do loci vio_343 com gradiente para verificação da extração de DNA genômico pelo protocolo de sílica de vidro modificado para o peixe <i>L. anus</i>	22
Figura 3	Viola (<i>Loricariichthys anus</i>).....	26

Artigo 1 – Nas normas da revista *Conservation Genetics Resources*

Figura 1	Frequência de repetições de microssatélites potencialmente amplificáveis em <i>L.anus</i>	33
----------	---	----

Lista de Tabelas

Artigo 1 – Submetido à revista Conservation Genetics Resources

Tabela 1	Tamanho dos motivos de repetições de microssatélites potencialmente amplificáveis (PALs).....	34
----------	---	----

Sumário

1	Introdução.....	12
2	Projeto de pesquisa.....	13
3	Relatório de atividades.....	19
3.1	Laboratório de Ictiologia.....	19
3.2	Laboratório de Genética e Evolução.....	19
3.3	Coleta do material biológico.....	20
3.4	Extração de DNA.....	21
3.5	Preparação da biblioteca genômica, desenho dos primers e PCR.....	22
4	Revisão bibliográfica.....	25
4.1	Ictiofauna continental e nativa.....	25
4.2	A Viola.....	26
4.3	Marcadores microssatélites.....	27
4.4	Sequenciamento de nova geração.....	29
5	Artigo nas normas da Revista Conservation Genetics Resources.....	31
	Considerações finais.....	38
	Referências.....	39

1 Introdução

A perda da biodiversidade em ambientes aquáticos está entre os mais sérios problemas enfrentados pelos países ao redor do mundo (MOYLE e LEIDY, 1992). Contudo, apesar da diversidade de peixes e da sua grande importância econômica para o homem, ainda pouco se conhece sobre suas características biológicas, ecológicas e genéticas (RESENDE et al., 2006).

A falta de conhecimento das espécies e conseqüentemente a falta de manejo destas, além das altas taxas de pesca são os principais responsáveis da perda de diversidade e reduções drásticas nas populações (NASCIMENTO et al., 2001; ALBUQUERQUE et al., 2003; PETRERE et al., 2004). Por isso torna-se necessário conhecer a fundo nossa biodiversidade, especialmente quando se trata de espécies nativas, e espécies que possuem um grande potencial econômico.

A Viola - *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1840) é uma espécie nativa do sul da América do Sul, que tem se mostrado um importante recurso pesqueiro (SANTOS, 2012). Porém pouco se conhece sobre sua biologia, e existem mínimas discussões sobre suas características populacionais e genéticas. E para Galetti (2008) é fundamental conhecer como as populações estão organizadas geneticamente para a conservação dos recursos pesqueiros.

Os marcadores microssatélites se mostram uma ferramenta eficiente para monitorar uma população geneticamente (MELO et al., 2006). E a partir das novas tecnologias de sequenciamento, os marcadores microssatélites são obtidos em maior escala, em menos tempo e com os custos bem a baixo comparados com as tecnologias tradicionais para a criação de bibliotecas (CASTOE et al., 2012).

2 Projeto de pesquisa

Equipe:

- Verônica Hammes Garcia - Aluna de Mestrado PPGZ/UFPel
- Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras – Orientador – Recursos Pesqueiros
- Dr. Heden Luiz Marques Moreira – Melhoramento Genético Animal
- M. Sc. Rafael Aldrighi Tavares – Aluno de Doutorado PPGZ/UFPel
- M. Sc. Cristiano Costenaro Ferreira – Aluno de Doutorado PPGZ/UFPel
- Dr. Fabio Ricardo Pablos de Souza – Professor Instituto de Biologia
- Dr. Cristina Helena Maria Moreira Verneti
- Harold Julián Pérez Gutierrez – Aluno de Mestrado PPGZ/UFPel

2.1 Caracterização do problema

A perda da biodiversidade em ambientes aquáticos está entre os mais sérios problemas enfrentados pelos países ao redor do mundo (MOYLE e LEIDY, 1992). Contudo, apesar desta diversidade de espécies de peixes e da sua grande importância econômica para o homem, ainda pouco se conhece sobre suas características biológicas, ecológicas e genéticas (RESENDE et al., 2006).

A falta de conhecimento e conseqüentemente a utilização de manejo inadequado das espécies se apresentam como uns dos fatores responsáveis pela perda de diversidade e reduções drásticas nas populações (NASCIMENTO et al., 2001; PETRERE et al., 2004).

Para a conservação dos recursos pesqueiros conhecer como as populações estão organizadas geneticamente é fundamental (GALETTI, 2008).

A Viola - *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1840) tem se mostrado um importante recurso pesqueiro, até meados da década de 1980, a Viola não possuía valor comercial, passando a ser comercializada a partir de 1990 e atingindo no ano de 2011, 52% das espécies capturadas na Lagoa Mangureira (SANTOS, 2012).

Ocorre abundantemente nas lagoas costeiras e em diversos rios do estado, sendo um dos locais a barragem do Chasqueiro, localizada no município de Arroio Grande RS. Esta é um lago artificial formado pelo barramento do arroio Chasqueiro sendo construída no final da década de 1970, dentro do programa (PROMIRIM) entrando em operação em 1984. Possui um sistema de canais com cerca de 50 km, e infra-estrutura física adequada para a produção (irrigação, estradas e outros serviços) contribuindo com a produção agrícola regional. Com 1.900 ha de lâmina de água é reconhecida como área de grande produção pesqueira e desperta interesse de comunidades pesqueiras da região, que pretendem usufruir da produção de peixes do local.

O interesse pelo cultivo de espécies nativas vem crescendo, mostrando que a viola apresenta um grande potencial para a aquicultura, porém pouco se conhece sobre sua biologia, e não há registro sobre suas características genéticas.

Os marcadores microssatélites se mostram uma ferramenta eficiente para monitorar uma população geneticamente (MELO et al., 2006).

2.2 Objetivos e metas

2.2.1 Objetivos

- Definir marcadores microssatélites para a Viola (*Loricariichthys anus*);
- Caracterizar geneticamente a população do peixe Viola na Barragem do Chasqueiro localizada em Arroio Grande, RS.

2.2.2 Metas

- Analisar a frequência alélica dos *loci* microssatélites definidos, para obtenção da diversidade e estrutura da população;
- Realizar análise estatística dos parâmetros genéticos populacionais que definem a estrutura da população. Analisar a diferenciação alélica e genotípica e desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

2.3 Metodologia

Os animais analisados serão coletados na Barragem do Chasqueiro, identificados e armazenados, após será realizada coleta de tecido muscular e nadadeiras. No Laboratório de Engenharia Genética Animal, localizado no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, serão realizadas as extrações de DNA destes tecidos utilizando kits de extração. Para a obtenção dos marcadores microssatélites o material genético de alguns indivíduos será enviado para a FEALQ - Fundação de estudos agrários Luiz de Queiroz - Piracicaba para criação das bibliotecas, e estas serão analisadas no programa PAL_FINDER_v0.02.03.

Após validação dos marcadores microssatélites, todas as amostras de DNA serão submetidas a reações de PCR. Neste material serão realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida a 8%.

Após a eletroforese, os géis serão corados pelo método do nitrato de prata e fotografados com câmera digital. Para análise semi-automática das bandas observadas nos géis, será utilizado o programa Image Master - Totallab4 versão 1.0.

O coeficiente de endogamia da população (F_{is}), o número de alelos observados (N), as frequências alélicas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg seram calculados utilizando o programa Genepop web v. 3.15.

2.4 Resultados e impactos esperados

2.4.1 Resultados

Caracterizar a espécie *Loricariichthys anus* geneticamente, em busca de uma população com uma grande diversidade, o que se mostra essencial para conservação e manejo da espécie.

2.4.2 Impactos

Obtenção de marcadores microssatélites que poderão ser aplicados em diversas populações de *Loricariichthys anus*. Podendo assim compará-las geneticamente verificando as populações mais promissoras para a pesca, criação e conservação.

2.5 Cronograma do projeto

Atividades a serem realizadas	2013		2014	
	1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre
Revisão Bibliográfica	x	x	x	x
Envio do material para sequenciamento	x			
Desenho dos primers		x		
Extração de DNA		x	x	
PCR		x	x	
Gel de poliacrilamida		x	x	
Análise dos dados			x	x
Elaboração de artigo				x
Defesa da dissertação				x

2.6 Outros projetos e financiamentos

2.6.1 Recursos humanos

			Preços	
Item	Qtd.	Descrição	Unid.	Total
1	24	Bolsa de Pós-Graduação/Capes	1.500,00	36.000,00
Sub-total: Recursos Humanos				36.000,00

2.6.2 Material de Consumo

			Preços	
Item	Qtd.	Descrição	Unid.	Total
1	1	Biblioteca de microsatélites	850,00	850,00
2	1	Kit de extração de dna genômico multiorigem 50 reações Axygen	370,00	370,00
3	1	Água Ultra pura, Grau PCR, 100ml,	75,00	75,00
4	1	100 bp DNA Ladder 50 µg	300,00	300,00
5	1	Microtubo PCR 200µL, c/ 1000	50,00	50,00
6	1	Tubos para microcentrífuga, 1,5 ml, c/ 500	50,00	50,00
7	2	Ponteira 0,5-10 µL, Microvolume (Curta), c/ 1000	50,00	100,00
8	1	Ponteira 100-1000 µL, c/ 1000 Unids	55,00	55,00
9	2	TAQ Polimerase (Kit) c/ 500U	200,00	400,00
10	1	DNTP (100 mM)	600,00	600,00
11	1	TBE BUFFER 10X	130,00	130,00
12	1	Agarose 100G	450,00	450,00
13	1	Acrilamida 500G	500,00	500,00
14	1	Temed	130,00	130,00
15	1	Glicerol	160,00	160,00
16	1	Primers		600,00
17	1	GelGreen	480,00	480,00
Sub-total: Material de Consumo				5.300,00

2.6.3 Total do Investimento

Item	Descrição	Total
1	Sub-total: Bolsa de Pós-Graduação/Capes	36.000,00
2	Sub-total: Material de Consumo	5.300,00
	Valor Total	41.300,00

2.7 Aspectos éticos

Os animais que analisaremos serão comprados de pescadores locais.

3 Relatório de atividades

3.1 Laboratório de Ictiologia

O material coletado para este trabalho foi encaminhado para o laboratório de ictiologia para coleta específica do material e armazenamento.

O Laboratório de Ictiologia, pertence ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel – Campus Capão do Leão. E está sob a responsabilidade dos professores Dr. Juvêncio Pouey e Dr. Sérgio Piedras. O laboratório possui uma área coberta de 300 m² que compreende 20 tanques de 100L para larvicultura e tanques para indução hormonal, tudo isso com instalação de sistemas de água circulante; equipamentos para incubação em bandeja e incubação em funil; e ainda possui uma área externa onde há uma instalação composta por tanques escavados, sendo eles divididos para a produção de plâncton e para alevinagem e reprodutores.

3.2 Laboratório de Genética Evolutiva

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética e Evolução – LabGenEvo - que está localizado na Universidade Federal de Santa Maria – Campus Palmeira das Missões. Este está sob a responsabilidade do Professor Dr. Daniel Angelo Sganzerla Graichen e conta também com a bióloga laboratorista Dr^a Marícia Fantineal D'Ávila. O laboratório conta com diversos equipamentos de biologia molecular como um termociclador da marca Bioclycler (Figura 1), cubas de eletroforeses e seus equipamentos auxiliares, transluminador de luz UV e outros diversos equipamentos menos específicos como centrífuga refrigerada, vortex, banhos-maria, ultrafreezer, geladeiras e freezers vertical, além disso, possui também uma sala exclusiva para a técnica de PCR.



Figura 1 - Termociclador Biocycler

As análises foram realizadas na UFSM devido a parceria do co-orientador Rafael Aldrighi Tavares que atualmente é professor na instituição.

Durante os cerca de 30 dias que lá estive além de fazer as análises do meu material, participei ativamente das discussões dos grupos de pesquisa, que é bastante heterogêneo, palestrando sobre meu projeto de mestrado e orientando os alunos de graduação na teoria e na prática das técnicas moleculares (Extração de DNA, preparação de reagentes, eletroforese e PCR).

3.3 Coleta do material biológico

O material biológico foi coletado na Barragem do Chasqueiro (coordenadas 32° 09' 788" S e 53° 09' 960" O), localizada no município de Arroio Grande RS. Esta é um lago artificial formado pelo barramento do arroio Chasqueiro sendo construída no final da década de 1970, e entrou em operação em 1984. Possui um sistema de canais com cerca de 50 km, e infra-estrutura física adequada para a produção (irrigação, estradas e outros serviços) contribuindo com a produção agrícola regional. Com 1.900 ha de lâmina de água é reconhecida como área de grande

produção pesqueira e desperta interesse de comunidades pesqueiras da região, que pretendem usufruir da produção de peixes do local.

A coleta de uma pequena porção de músculo e de uma porção de nadadeira caudal foi realizada através do material coletado em outro projeto que possui licença no Sisbio, sob o número 34389-1, para realizar coletas na Barragem do Chasqueiro. Foi adotada esta forma de coleta por se necessitar de uma pequena quantidade de material biológico, e por não afetar a metodologia do outro projeto, não se fazendo necessário coletar indivíduos de viola somente para este trabalho.

Os fragmentos de músculo e nadadeira (aproximadamente 200-300mg) foram coletados com o auxílio de pinças e tesouras esterilizadas com álcool 95% e imediatamente armazenados individualmente em etanol 95% em tubos tipo eppendorf 1,5 ml, identificados com o número do animal, data de coleta, local da coleta e sexo, e estocados a -20°C.

3.4 Extração de DNA

A extração de DNA para a criação da biblioteca genômica foi feita através do Kit MiniPrep DNA Genômico Axygen, seguindo seu protocolo padrão. Foi utilizado o método de extração por kit comercial por necessitar de uma boa qualidade para o NGS.

A extração de DNA para a análise posterior em PCR, foi feita com base no protocolo de extração de sílica de leite, que usa a combinação de proteinase K do “coalho” e leite de vidro. Este foi descrito por Oliveira et al. (2009), com o objetivo de reduzir os custos e tempo de extração em comparação a outros protocolos já descritos. O protocolo segue os mesmos princípios dos demais métodos de extração, o que difere é a substituição da proteinase K pelo “coalho” para a digestão das proteínas e o uso do leite de vidro que possibilita a aderência das moléculas de DNA, durante a etapa de purificação do protocolo.

Não havia registros da validação desta metodologia para tecidos de peixes, com isso, o protocolo foi validado com cerca de 30mg de tecido muscular e 40mg de tecido da nadadeira dorsal de viola, com modificação do protocolo em aumento de 4x das quantidades descritas originalmente.

Após extração, as amostras foram analisadas em gel de agarose de 1% corado com brometo de etídeo e verificadas em transluminador de luz UV Clinx Science.

O protocolo se mostrou efetivo para ambos os tecidos de *L. anus* para a extração de DNA genômico, quando aplicada à técnica de PCR, na qual necessita de pequenas quantidades de amostra de DNA para ser realizada com sucesso (Figura 2).

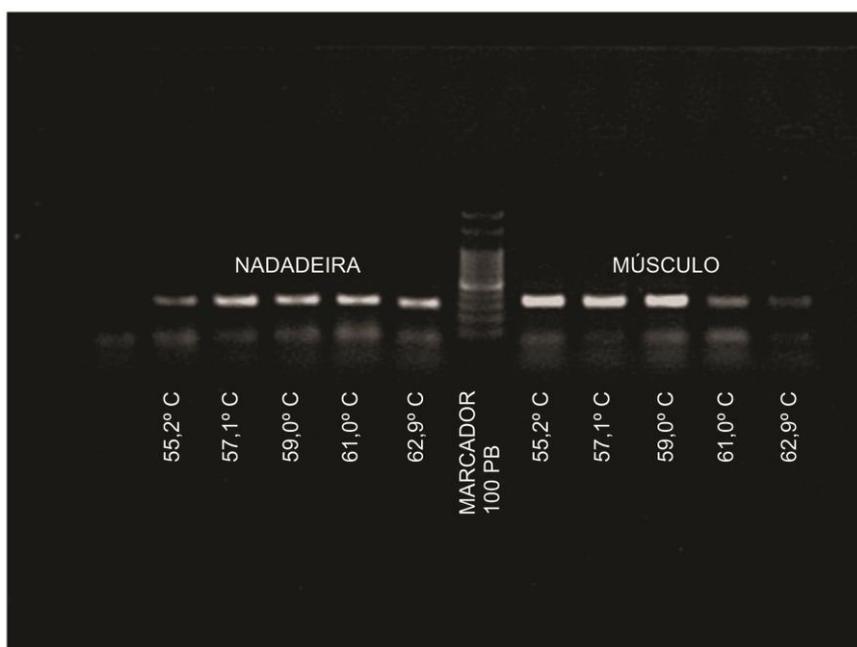


Figura 2 - Amplificação do loci *vio_343* com gradiente para verificação da extração de DNA genômico pelo protocolo de sílica de vidro modificado para o peixe *L. anus*.

3.5 Preparação da biblioteca genômica, desenho dos primers e PCR

A biblioteca genômica foi preparada seguindo o protocolo padrão do Kit Illumina Nextera DNA Library. O sequenciamento desta única biblioteca genômica foi conduzido em um sequenciador MiSeq (Illumina, San Diego, USA) com 150 pares de bases. As leituras obtidas foram analisados no programa PAL_FINDER_V0.02.03 para identificar as leituras que continham microssatélites com dinucleotídeos (2mer), trinucleotídeos (3mer), tetranucleotídeos (4mer), pentanucleotídeos (5mer) e hexanucleotídeos (6mer). Estas sequências, para serem consideradas SSRs, deveriam ter pelo menos 12 pb de comprimento para 2mer, 3mer e 4mer; e de 15pb a 18pb para 5mer e 6mers, respectivamente.

Esta etapa do projeto foi realizada pela empresa EcoMol incubada na FEALQ – Fundação de estudos agrários Luiz de Queiroz – em Piracicaba, pertencente a USP, que é uma das poucas instituições que possui a tecnologia no Brasil.

Uma vez identificadas as leituras, com loci SSRs, estas foram agrupadas para um subdiretório local do programa Primer 3 v.2 (Rozen & Skaletsky, 2000) para o desenho dos primers. Foram utilizados alguns critérios para o desenho dos primers, os mesmos utilizados por Castoe et al. (2102):

- conteúdo de GC maior que 30%;
- temperaturas de melting entre 58°C e 65°C, com um máximo de 2°C de diferença entre os primers;
- os últimos dois nucleotídeos na extremidade 3', sendo G ou C;
- máximo poli-N de 4 nucleotídeos.

Se todos os outros critérios forem atingidos, um único par de primer é escolhido, apresentando o maior escore assinalado pelo Primer3, além do maior tamanho da região de amplificação da sequência repetida.

Após o agrupamento dos loci SSRs e desenho dos respectivos primers, foram descartadas as sequências que não foi possível desenhar os primers com sucesso. Com isso, selecionamos somente os loci potencialmente amplificáveis – PALs, com seus respectivos primers.

Foi possível selecionar entre o PALs, 39 sequências que podemos chamar de Best PALs, os Loci SSRs de melhor qualidade, a partir dos seguintes critérios de seleção: serem sequências de repetições simples com longas repetições, tendo mais de 7 unidades de repetições; e sendo estas mais propensas a ter alta variabilidade na população (Castoe et al. 2012; Lance et al. 2013).

A partir dos melhores loci potencialmente amplificáveis – Best PALs - obtidos, um grupo de doze loci foi escolhido, através de alguns critérios menos rígidos como baixa porcentagem de harpins e dímeros, porcentagens altas de CG nos primers e preferência aos loci com longas repetições. Então as sequências de seus respectivos primers foram enviadas, para a síntese dos oligonucleotídeos, à empresa Sigma Aldrich.

Os oligonucleotídeos dos primers estavam liofilizados, e foram ressuspensos em água ficando com uma concentração estoque de 200 μ M, após foram feitas alíquotas de trabalho de 100 μ L na concentração 20 μ M.

As amplificações foram realizadas num volume total de 25 μ l incluindo 20 μ M de cada *primer*, ~30–50 ng de DNA template, 200 μ M dNTP, 1 unidade de Taq DNA polymerase NeoTaq, e 1 \times PCR buffer MgCl₂. A temperatura de anelamento foi testada para cada um dos loci por gradiente em um termociclador Biocycler. As temperaturas do gradiente foram de 52°C a 66,4°C, gerando um gradiente com 10 temperaturas diferentes com alternadas variações, que variaram de 0,4°C a 2,0°C. A temperatura mais baixa e mais alta para cada loci foi escolhida de acordo com as temperaturas indicadas pelo desenho dos primers e pela síntese do oligonucleotídeos dos primers.

Estas amplificações foram analisadas em gel de agarose de 1% corado com brometo de etídio e verificadas em transluminador de luz UV Clinx Science.

Dos doze loci, somente 6 amplificaram com êxito. Estes foram preparados e enviados para a purificação e sequenciamento de Sanger (Macrogen, Korea), para identificação da sequência completa dos microssatélites resultantes do sequenciamento de próxima geração através da plataforma MiSeq (Illumina). As sequências obtidas foram analisadas para os padrões de repetição usando WebSat (Martins et al. 2009).

4 Revisão bibliográfica

4.1 Ictiofauna continental e nativa

A mais rica diversidade de peixes de água doce está na região neotropical (VARI & MALABARBA, 1998), e o Brasil detém uma considerável proporção desta biodiversidade. A conservação de peixes é uma área que tem recebido uma maior atenção (HELFMAN, 2007), porém ainda são os animais aquáticos menos considerados em ações conservacionistas. Sendo geralmente obscuras as estimativas de biodiversidade e programas de conservação deste grupo.

Segundo Menegez (2006), a avaliação e compreensão dessa rica diversidade são essenciais e negativamente afetadas pelo conhecimento incompleto de sua biologia, ecologia e sistemática.

Com isso, estoques continentais de peixes vem apresentando um significativa redução na diversidade de peixes nativos, devido principalmente a degradação dos habitats, a introdução de espécies exóticas e a sobrepesca dos estoques (MARINHO et. al., 2006), e também ao desrespeito das leis quanto aos períodos de pesca e quanto ao tamanho das malhas de redes. Juntos, estes fatores provocam a desestruturação das comunidades ou até mesmo a extinção local de algumas espécies (MARINHO et. al., 2006).

Quando falamos da introdução de espécies exóticas, temos a aquicultura como maior responsável pela introdução destas novas espécies (GOZLAN, 2008). E estas espécies introduzidas afetam diretamente nossa biodiversidade nativa.

Uma saída para a aquicultura brasileira dar continuidade a expansão produtiva, deixando de lado a degradação dos habitats, é incentivar o cultivo de espécies nativas como já acontece com o tambaqui - *Colosoma* sp., e o surubim - *Pseudoplatystoma* sp. (BRITTON e ORSI, 2012). E este incentivo vem acontecendo nos últimos anos (TROCA e VIEIRA, 2012).

4.2 A Viola

A espécie *Loricariichthys anus* (Valenciennes,1840), é chamada popularmente por viola, cascudo-viola, cascudo-chicote, e é pertencente à ordem Siluriforme, família Loricariidae.

Os locarídeos ou cascudinhos, como são chamados os indivíduos da família Loricariidae, ocorrem em clima temperado e águas doces, sendo o sul da América do Sul um de seus principais habitats (SUZUKI et al., 2000). São peixes de fundo, dotados de respiração acessória, resistentes aos baixos níveis de oxigenação de água e ocupam diversos habitats de água doce, favorecidos pelo hábito alimentar detritívoro-herbívoro (SILVANO e BEGOSSI, 2001).

A Viola (Figura 3), especificamente, ocorre na América do Sul, em rios costeiros do Uruguai e no sul do Brasil, além da bacia inferior do estado do Paraná (FERRARIS, 2003). Habitam principalmente ambientes lânticos e semi-lóticos (QUEROL et al., 2002; MEGA e BEMVENUTI, 2006).



Figura 3 - Viola (*Loricariichthys anus*)
Fonte: Benvenuti & Moresco (2005)

Os peixes deste gênero são de pequeno e médio porte (TEIXEIRA DE MELLO et al., 2009), e segundo o banco Fish Base (2012) o tamanho máximo registrado para a espécie é de 46cm. Caracterizados por cabeça pontiaguda, posicionamento bucal inferior com presença de grandes lábios, corpo achatado dorso-ventralmente revestido de placas ósseas com coloração parda amarelo-claro (MEGA e BEMVENUTI, 2006).

Alimentam-se de insetos, pequenos moluscos e crustáceos quando jovens e já na fase adulta se alimentam de lodo e detritos orgânicos (MEGA e BEMVENUTI, 2006).

Reproduzem-se durante os meses de novembro e fevereiro (CARDOSO, 2013), e os machos carregam os ovos até o momento da eclosão na cavidade bucal. Para Mega e Bemvenuti (2006), isto faz com que a espécie apresente uma forma eficiente de reprodução, existindo então um grande número de indivíduos no sul do estado do Rio Grande do Sul.

De Britto (2014) descreveu que o filé da Viola possui um pequeno teor de gordura e um alto teor de proteína, o que influencia a desempenho produtivo e a aceitação pelo mercado consumidor, modifica o sabor da carne e demonstra um alto valor nutritivo.

Até meados da década de 1980, a Viola não possuía valor comercial, passando a ser comercializada a partir de 1990, com isso atingindo a espécie mais pescada na Lagoa Mangueira, sendo em 2011, 52% do total capturados na Lagoa (SANTOS, 2012).

Pouco ainda se conhece sobre a espécie, mas o interesse pelo cultivo de espécies nativas vem crescendo, e isso aliado a grande comercialização da espécie, juntamente com as características biológicas, mostra que a viola apresenta um grande potencial para a aquicultura.

A comercialização da Viola hoje, se origina em grande parte através da pesca local. Por isso é essencial um monitoramento populacional da espécie para que se mantenham os estoques naturais, pois sabe-se que pode estar ocorrendo níveis elevados de sobrepesca nestes estoques.

Rosso (2012) identificou o DNA barcode de *L. anus* em estudo de peixes Neotropicais na Argentina.

4.3 Marcadores Microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos como STR – (Repetições curtas em tandem “Short tandem Repeats”) ou SSR – (Simple sequências repetidas “Simple repeated sequences”), são sequências de DNA repetitivas, arranjadas em tandem, com o comprimento de dois a seis nucleotídeos, e estão entre os loci mais polimórficos do genoma (MILACH, 1998; MATIOLI, 2001). O polimorfismo destes

marcadores se apresenta através da variação do número de elementos repetidos, e estas variações podem se originar através de erros na enzima de polimerização durante a replicação do DNA. Porém suas sequências flanqueantes geralmente encontram-se conservadas entre os indivíduos da mesma espécie, além disso, podem ser transferidas entre espécies e populações do mesmo gênero (ALVES et al., 2006).

Os microssatélites apresentam como características um comportamento codominante, que possibilita a detecção de alelos dominantes e recessivos em um dado locus, um alto grau de informação de polimorfismo por locus gênico, uma distribuição aleatória sendo abundante por todo o genoma, e dependentes de pouca quantidade de DNA na amostra e amplificáveis via PCR (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996)

Podem ser classificados conforme a composição das sequências repetidas em: Repetições imperfeitas, quando apresentam interrupções por bases que não correspondem ao motivo (Ex: ACACACATGTACACACA); Repetições perfeitas, quando não há interrupções (Ex: AGAGAGAGA); Repetições compostas, quando duas ou mais classes estão dispostas de forma adjacente (Ex: CACACACACACAGAGAGAGAGA). Além da composição das sequências, os microssatélites são classificados em relação à unidade repetitiva: mononucleotídica (Ex: AAAAAAA), dinucleotídica (Ex: ACACACACAC), trinucleotídica (Ex: ACTACTACTACTACT), Tetranucleotídica (Ex: ACGGACGGACGGACGG), Pentanucleotídica (Ex: AAACCAAACCAAACCAAACCAA) e Hexanucleotídica (Ex: AATTCGAATTCGAATTCGAATTCG) (OLIVEIRA et al., 2006).

Os marcadores microssatélites estão sendo amplamente utilizados em peixes. Na área do melhoramento animal, segundo Resende et al.(2008), a avaliação dos peixes a partir de marcadores moleculares consiste em identificar e analisar uma grande variabilidade inicial e correlação dos marcadores com os fenótipos de interesse para melhorias nas sucessivas gerações.

Dentro da genética de populações, utiliza-se para avaliar o tamanho efetivo de uma população de um estoque (N_e), identificação de populações, níveis de endogamia, estrutura populacional e fluxo gênico, parentesco e características quantitativas (NEFF et al., 2000; MELO et al., 2006).

Os marcadores moleculares, em geral, têm se mostrado eficientes aliados na distinção de espécies, independente do estágio de vida do animal, ou na

identificação da origem de produtos processados, o que é crucial para programas de conservação (RESENDE et al., 2006; MELO et al., 2006).

O desenvolvimento de marcadores microssatélites era custoso, tanto em tempo, quanto trabalho e dinheiro, pois dependia de técnicas moleculares como a criação de bibliotecas genômicas enriquecidas, clonagens, hibridização, isolamento plasmidial e sequenciamento do tipo Sanger. O que tem mudado com os constantes avanços das tecnologias de sequenciamento de DNA, ultrapassando estas antigas técnicas e possibilitando efetivar e aumentar os estudos dependentes deste marcadores.

4.4 Sequenciamento de nova geração

Next-generation sequencing (NGS) refere-se a uma tecnologia de alto rendimento de sequenciamento de DNA, diferente da base de sequenciamento tradicional de Sanger.

Milhões ou bilhões de cadeias de DNA podem ser sequenciadas em paralelo a partir de uma única amostra de DNA, obtendo-se substancialmente mais rendimento, não sendo mais necessários os métodos de clonagem do genoma que eram frequentemente utilizados junto do sequenciamento de Sanger.

O desenvolvimento destas novas tecnologias foi impulsionado pela demanda de métodos de sequenciamento mais baratos e mais rápidos, desde a conclusão do primeiro sequenciamento do genoma humano (GRADA e WEINBRECHT, 2013).

Antes disso, o sequenciamento de Sanger, desenvolvido em 1974, foi considerado o melhor para o sequenciamento de ácidos nucléicos durante 2 décadas e meia (SANGER et al., 1977).

A criação dessas plataformas de NGS fez do sequenciamento acessível a mais laboratórios, aumentando rapidamente a quantidade de pesquisas e diagnósticos clínicos sendo realizadas com o sequenciamento de ácidos nucléicos. (GRADA e WEINBRECHT, 2013).

As aplicações do NGS parecem quase infinitas, permitindo rápidos avanços em muitas áreas das ciências biológicas.

A partir do NGS, o desenvolvimento de microssatélites sofreu uma revolução, que agora permite extrair um grande número de sequências de DNA com potencial

para SSR (FERNANDEZ-SILVA, 2013). Isso tem permitido descobrir loci microssatélites em um número crescente de espécies.

5 Artigo

Formatado segundo as normas da revista **Conservation Genetics Resources**
(ISSN 1877-7252)

Identificação de Loci microssatélites em Viola - *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1840)

Identification of microsatellite Loci in Viola – *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1840)

¹ Verônica Hammes Garcia, ² Heden Luiz Marques Moreira, ³ Rafael Aldrighi Tavares,
⁴ Sérgio Noguez Piedras.

¹ Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, S/N, Pelotas/RS, Brasil.
veronica.hgarcia@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, S/N, Pelotas/RS, Brasil. heden.lui@gmail.com

³ Universidade Federal de Santa Maria, Campus CESNORS, Palmeira das Missões/RS, Brasil.
rafaaldrighi@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, S/N, Pelotas/RS, Brasil.
oceanopiedras@gmail.com

Resumo

Através do sequenciamento de próxima geração (NGS) objetivou-se identificar marcadores microssatélites para viola - *Loricariichthys anus* - espécie nativa do sul da América do Sul e que tem despertado o interesse econômico da região, por isso é fundamental compreender sua genética e a estrutura populacional da espécie para fim de conservação e de produção. A extração de DNA para a criação da biblioteca foi realizada através do Kit comercial MiniPrep DNA Genômico Axygen e para a técnica de PCR foi realizada através do protocolo de extração de sílica de vidro modificada. Uma biblioteca genômica shotgun paired-end foi preparada através do protocolo Kit Illumina Nextera DNA Library, sendo então sequenciada em um sequenciador MiSeq Illumina e as 1.103.580 de leituras obtidas foram analisadas no programa PAL_FINDER_V0.02.03 a fim de reconhecer os marcadores microssatélites. Foram obtidos, 444 loci microssatélites potencialmente amplificáveis (PALs), dos quais 161 eram de dinucleotídeos, 65 de trinucleotídeos, 170 de tetranucleotídeos, 32 de pentanucleotídeos e 16 de hexanucleotídeos. Um grupo de doze loci foram escolhidos para validação através da técnica de PCR, destes 6 foram amplificados – quatro dinucleotídeos e dois tetranucleotídeos. O sequenciamento de nova geração através de biblioteca da plataforma MiSeq (Illumina) possibilitou identificar marcadores microssatélites para espécies não modelo como a viola, possibilitando uma promissora análise genética da espécie em futuro estudo.

Palavras-chave: peixe nativo, SSR, PALs, NGS.

Abstract

Through next-generation sequencing (NGS) aimed to identify and characterize microsatellite markers for viola - *Loricariichthys anus* - native species of southern South America and that has aroused economic interest, so it is essential to understand their genetic and population structure of the species for purposes of conservation and production. DNA extraction for the creation of the genomic library was realized by the commercial kit MiniPrep DNA Genômico Axygen and for the PCR technique the extraction was realized through modified glass silica extraction protocol. A genomic library shotgun paired-end was prepared by Kit Nextera Illumina DNA Library protocol and then sequenced in a MiSeq Illumina sequencer and 1,103,580 of obtained readings were analyzed in PAL_FINDER_V0.02.03 program to recognize the microsatellite markers. Were obtained 444 microsatellite loci potentially amplifiable (PALs), of which 161 were dinucleotides, 65 trinucleotides, 170 tetranucleotides, 32 and 16 pentanucleotides and hexanucleotides. A group of twelve loci were chosen for validation by PCR, these 6 were amplified - four dinucleotides and two tetranucleotides. The next-generation sequencing through the platform MiSeq (Illumina) library allowed to identify microsatellite markers for non-template species as Viola, enabling a promising genetic analysis of the species in a future review.

Key-words: native fish, SSR, PALs, NGS.

Introdução

Os constantes avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA, aliados a sua redução dos custos, têm possibilitado um aumento nos estudos sobre ecologia, evolução, melhoramento genético e genética de populações da biodiversidade, tanto na área animal quanto vegetal. Os marcadores microssatélites (SSP – Simple Sequence Repeats) se mostram ferramentas importantes para estes estudos (Castoe et al. 2012; Melo et al. 2008; Tavares 2011), e segundo Castoe et al. (2012) a partir desta nova geração de sequenciamento (NGS - Next Generation Sequencers), é possível se obter os microssatélites por menores custos, com mais eficiência e em maior escala, ultrapassando antigas técnicas que demandavam grande esforço, como a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas e radioativas.

Este avanço na tecnologia tem permitido desenvolver marcadores moleculares para espécies que ainda não possuem informações genéticas, e que mesmo não sendo espécies modelos, possuem forte potencial para se tornarem economicamente importantes. A partir do sequenciamento do DNA destas espécies, são gerados os loci potencialmente amplificáveis (PALs) (Lance et al. 2013), e que são uma ferramenta poderosa para o estudo genético (Calabuig et al. 2012).

Loricariichthys anus, chamada popularmente por Viola, é um peixe pertencente à ordem Siluriforme, família Loricariidae e não apresentava interesse comercial e ecológico até meados da década de 1980. A partir de 1990 começou a ser comercializada e atingiu, no ano de 2011, 52% das espécies capturadas na Lagoa Mangueira (Santos 2012). A Viola ocorre na América do Sul, em rios costeiros do Uruguai e no sul do Brasil, além da bacia inferior do estado do Paraná (Ferraris 2003).

Pouco se conhece sobre a biologia deste peixe, porém, o interesse pelo cultivo de espécies nativas vem crescendo, e isso, aliado ao seu forte potencial econômico, faz dela um importante recurso pesqueiro. Sendo assim, se faz necessário conhecer suas características genéticas e populacionais tanto para o desenvolvimento aquícola, quanto para o monitoramento populacional e conservação da espécie.

O presente trabalho teve como objetivo identificar loci potencialmente amplificáveis de marcadores microssatélites para a espécie *Loricariichthys anus*, levando a conhecer sua genética.

Materiais e métodos

Animais e extração de DNA

O material biológico foi coletado na Barragem do Chasqueiro, localizada entre as coordenadas 32° 02' 15" e 32° 11' 07" de latitude sul, e 52° 57' 46" e 53° 11' 18" de longitude oeste, no município de Arroio Grande - RS, Brasil, que é reconhecida como área de grande produção pesqueira e que desperta interesse de comunidades pesqueiras da região, pois possui uma rica diversidade ictiológica. O DNA genômico total foi extraído partir de nadadeira caudal de *L. anus* através de dois métodos, a partir do Kit comercial MiniPrep DNA Genômico Axygen, seguindo seu protocolo padrão para a criação da biblioteca gênica através do NGS que necessita de uma boa qualidade e quantidade de DNA, e a partir do protocolo modificado que usa a combinação de proteinase K do “coalho” e leite de vidro (Oliveira 2009) para a amplificação das sequências.

A qualidade da extração foi checada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz UV Clinx Science.

Preparação da biblioteca genômica e desenho dos primers

A biblioteca genômica foi preparada seguindo o protocolo padrão do Kit Illumina Nextera DNA Library. O sequenciamento desta única biblioteca genômica foi conduzido em um sequenciador MiSeq (Illumina, San Diego, USA) com 150 pares de bases. As leituras obtidas foram analisados no programa PAL_FINDER_V0.02.03 para identificar as leituras que continham microssatélites com dinucleotídeos (2mer), trinucleotídeos (3mer), tetranucleotídeos (4mer), pentanucleotídeos (5mer) e hexanucleotídeos (6mer). Estas sequências, para serem consideradas SSRs, deveriam ter pelo menos 12 pb de comprimento para 2mer, 3mer e 4mer; e de 15pb a 18pb para 5mer e 6mers, respectivamente.

Uma vez identificadas as leituras, com loci SSRs, estas foram agrupadas para um subdiretório local do programa Primer 3 v.2 (Rozen & Skaletsky 2000) para o desenho dos primers. Foram utilizados alguns critérios para o desenho dos primers, os mesmos utilizados por Castoe et al. (2012): 1 - Conteúdo de GC maior que 30%; 2 - temperaturas de melting entre 58°C e 65°C, com um máximo de 2°C de diferença entre os primers; 3 - os últimos dois nucleotídeos na extremidade 3', sendo G ou C 4 - máximo poli-N de 4 nucleotídeos.

Se todos os outros critérios forem atingidos, um único par de primer é escolhido, apresentando o maior score assinalado pelo Primer3, além do maior tamanho da região de amplificação da sequência repetida.

Validação dos primers

A partir dos melhores loci potencialmente amplificáveis – Best PALs obtidos, um grupo de doze loci foi escolhido e amplificado. As amplificações foram realizadas num volume total de 25 µl incluindo 20µM de cada *primer*, ~30–50 ng de DNA template, 200 µM dNTP, 1 unidade de Taq DNA polymerase NeoTaq, e 1 × PCR buffer MgCl₂. A temperatura de anelamento foi testada para cada um dos loci por gradiente em um termociclador Biocycler.

Os que obtiveram amplificação foram preparados e enviados para a purificação e sequenciamento de Sanger (Macrogen, Korea), para identificação da sequência completa dos microssatélites resultantes do sequenciamento de próxima geração através da plataforma MiSeq (Illumina). As sequências obtidas foram analisadas para os padrões de repetição usando WebSat (Martins et al. 2009).

Resultados

No sequenciamento da biblioteca genômica foram obtidas 1.103.580 leituras, contendo aproximadamente 0,159 Gpb.

Deste total de leituras, 32% - 350.678 continham SSRs, sendo destas somente 444 que apresentam sequências flanqueantes para o desenho de primers, sendo loci potencialmente amplificáveis (PALs). Dentro destas 444 sequências, 161 eram de dinucleotídeos, 65 de trinucleotídeos, 170 de tetranucleotídeos, 32 de pentanucleotídeos e 16 de hexanucleotídeos. As repetições mais frequentes foram então de dinucleotídeos e tetranucleotídeos (Fig1).

Os motivos mais frequentes de dinucleotídeos, trinucleotídeos e tetranucleotídeos foram TC e AC, TCC e TCTG, respectivamente (Fig1). Para as repetições de pentanucleotídeos e hexanucleotídeos ocorreram um pequeno número de motivos, apenas 19 motivos para 5mers, com o motivo mais frequente sendo ATTTT; e apenas 8 motivos para 6mers, sendo AACCCCT o motivo mais aparente.

Após obter os PALs, a partir destes foram selecionados os “Best PALs”, os *Loci SSRs* de melhor qualidade, a partir dos seguintes critérios de seleção: Serem sequências de repetições simples com longas repetições, tendo mais de 7 unidades de repetições, sendo estas mais propensas a ter alta variabilidade na população (Castoe et al. 2012; Lance et al. 2013).

O número de bPALs foi de 39 sequências, sendo 29 sequências de dinucleotídeos, 7 de trinucleotídeos e 3 de tetranucleotídeos. Não foram constatadas sequências de pentanucleotídeos e hexanucleotídeos dentro destes padrões.

Das 39 sequências de bPALs obtidas para a *viola* através da plataforma MiSeq (Illumina), um grupo de doze loci foram selecionados, sendo 3 tetranucleotídeos e 9 dinucleotídeos e primers específicos foram desenhados para a obtenção dos fragmentos.

A amplificação foi obtida para seis loci, 2 tetranucleotídeos e 4 dinucleotídeos na avaliação inicial dos primers.

O restante dos iniciadores não geraram os produtos de amplificação desejada sob as condições de PCR testadas. As sequências dos primers, nome do locus, motivos das repetições, temperaturas de anelamento e o tamanho do produto de PCR para os doze loci microssatélite para *L.anus* encontram-se resumidos na tab1.

Estes primers para loci microssatélites desenvolvidos para *Loricariichthys anus* serão publicados no GenBank com seus respectivos nomes.

Os loci microssatélites, Vio 481, Vio 343, Vio 147, Vio 173, Vio 214 e Vio 589 após amplificação foram sequenciados.

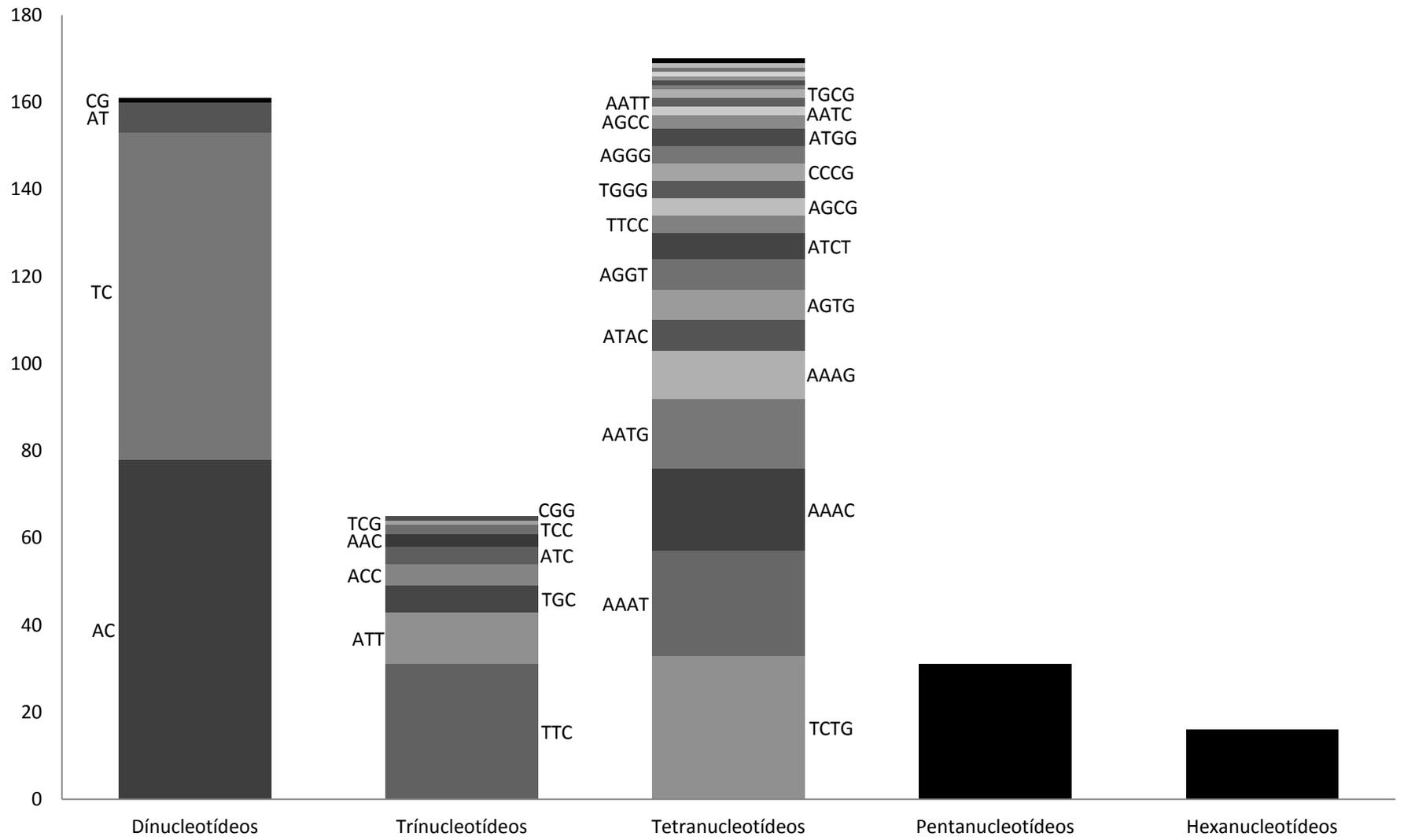


Figura 1 – Frequência de microssatélites potencialmente amplificáveis mais comuns em *L. anus*

Tabela 1 - Primers microssatélites desenvolvidos para *L.anus*, através do programa Primer3 (versão 2.0.0)

Locus	Sequência dos Primers (5'-3')	Motivo de repetição	T _a ° C	Tamanho do produto (pb)	Tamanho do produto esperado (pb)
Vio 481	F: TCATCTCAGTGGTAATGGGG R: AAAGTCTGGCCTAAACTTGC	AC ₁₄	61.0°	151	270
Vio 343	F: AGGAAGAAATGACTTTAGGACC R: CTCACCGATATGGACATTACC	AAAG ₁₃	57.1°	306	212
Vio 173	F: ATCCCATCCTCAAATCCCC R: CAAATTGCATGTGACTGTCC	AG ₁₀ *	64.8°	359	193
Vio 589	F: AGACAACAAGATCGTTGTGG R: CGACAACCATATCTGATTAACC	AAAT	57.1°	-	197
Vio 214	F: CTTGAGGGACATGAAAGTGG R: AGACACATTTGGGCTTGC	AC	62.9°	-	280
Vio 147	F: AATCCACTCCACAATAAGGC R: ACCTTGTATCTTCTTGCTGC	AC	61.0°	-	216
Vio 048	F: TTGTCCTTCTGCATTGAGG R: GTAGGCCAAGTTTGATCTCC	TC	-	-	207
Vio 055	F: CTGGTCACTTCAACAGCC R: TGATACTTTTGTGACTGAAGC	AC	-	-	244
Vio 574	F: CTGATGAGGCTCACTTTATGG R: CATGCAAATAACACTGGC	TC	-	-	239
Vio 355	F: TGATGCAGAATCCAACATGG R: CTGATCAGTATGAATCCAGCC	AATC	-	-	245
Vio 301	F: TCTCTGTCCCTCACCTGG R: TGATCACAGTGACTGATCCC	AC	-	-	298
Vio 138	F: CTGAAGCATGGTTGAAAAGC R: TCACACTCTGCTCTTACTGG	AC	-	-	264

*Motivo de repetição encontrado após amplificação, diferente do obtido na plataforma MiSeq (Illumina)
T_a ° C = temperatura de anelamento

Somente um tetranucleotídeo (Fig6) e um dinucleotídeo (Fig7) dos selecionados para análise e amplificados apresentaram as sequências repetidas com os motivos obtidos através da plataforma MiSeq (Illumina). Porém estes apresentaram também no mesmo locus outros marcadores microssatélites: no Vio 481, além do esperado AC₁₄ foi amplificado também TA₅ e GT₉; no Vio343, além do AAAG₁₃ foi amplificado também GAAA₃.

Apesar de não ter apresentado a sequência repetida com o mesmo motivo esperado e obtido pelo sequenciamento de próxima geração da plataforma MiSeq no locus Vio 173 com seus respectivos primers desenhados pelo programa Primer 3, uma repetição de microssatélite foi encontrado, motivo AG₁₀ (Fig8).

Discussão

O uso das tecnologias de nova geração de sequenciamento se mostra satisfatória para o peixe *Viola*, se apresentando como uma metodologia, além de eficaz, mais barata e rápida, semelhante ao que foi observado em outras espécies, *Rhamdia sp.* (Rodrigues et al. 2015), *Odontesthes humensis* (Tavares et al. 2014).

Desconhece-se o tamanho do genoma de *L. anus*. Porém, o genoma de peixes teleósteos já estudados pode variar de 0,40 Gpb a 4,40 Gpb (Gregory et al. 2007), sendo assim se obteve uma pequena cobertura do genoma, contando que obtivemos aproximadamente 0,159 Gpb.

O número de 444 PALs foi bem inferior em comparação a outras espécies de peixes que tiveram seu material sequenciado através de outras plataformas, como o “zebrafish” *Danio rerio*, espécie modelo que obteve 116.915 SSRs (Rouchka 2010). Porém, este teve uma maior cobertura do genoma (1,7 Gpb), bem superior ao utilizado neste estudo. Também resultados bem diferentes foram obtidos em outras espécies nativas, como para “peixe-rei” *Odontesthes humensis* – 25.806 PALs (Tavares et al. 2014) e para o jundiá *Rhamdia sp.* – 6.331 PALs (Rodrigues et al. 2015). Estas diferenças quanto ao número de PALs podem ser devido à cobertura do genoma obtida, tamanho das leituras e o tamanho desconhecido de cada genoma com suas características peculiares.

O motivo mais encontrado nas repetições de dinucleotídeos foram os mesmos aos encontrados por Rodrigues et al. (2015) em jundiá.

Resultados similares foram encontrados para outras espécies de peixes, no qual apresentaram maior repetição do motivo TC ou motivo AC entre os mais frequentes, como em *Raja pulchra* (Kang et al. 2012) e *Schizothorax biddulphi* (Luo et al. 2012), indicando que mesmo com estas diferenças entre as espécies, o valor encontrado vai de encontro com Megléc et al. (2012), de que os motivos mais comuns de dinucleotídeos em Chordata, dependendo da espécie, são AC e TC.

Novamente segundo Megléc et al. (2012) em geral os motivos mais encontrados para trinucleotídeos e tetranucleotídeos para o grupo Chordata são AAT e AGAT, porém os motivos mais encontrados destas repetições para *viola* não seguiram esse padrão para Chordata, mostrando a grande variação que se pode encontrar na repetições de loci microssatélites e também da ampla diferença entre os genomas dos diferentes grupos filogenéticos.

O número de motivos com repetições do tipo pentanucleotídeos e hexanucleotídeos apresentou-se relativamente baixo (Fig1), e os motivos que mais ocorreram foram bem diferentes dos mais encontrados na literatura.

Contudo, como a fragmentação do genoma para a criação da biblioteca é aleatória, não existe garantia de que o genoma inteiro siga o mesmo padrão do encontrado durante a criação da biblioteca (Calabuig et al. 2012), ainda mais que se obteve uma pequena cobertura do genoma neste trabalho.

Mas ainda assim deve-se levar em conta a origem da diversidade da composição dos microssatélites entre os diferentes grupos filogenéticos, que pode ser resultado dos diferentes mecanismos de mutação, que alcançam processos evolutivos e a seleção natural (Megléc et al. 2012; Buschiazzo & Gemmell 2006), sugerindo então que as frequências e motivos dos microssatélites são específicos e fazem parte do processo evolutivo.

Apenas metade dos loci amplificaram nesta análise com as condições de PCR testadas. Isto pode ser devido a erro no desenho dos primers, pois segundo Rychlik (1993) a sequência e a combinação dos primers influencia diretamente na qualidade do PCR. Pode ser devido também ainda a mutações nestas regiões flanqueantes, que são sítios de hibridação, tornando estes loci nulos e não amplificáveis na técnica de PCR (Li et al. 2003). Estes fatores podem ter influenciado também o porquê de não termos encontrado os motivos de repetição nos loci sequenciados com Sanger iguais aos sugeridos pelo sequenciamento na plataforma Miseq.

Conclusão

As novas tecnologias de sequenciamento nos permitem identificar um bom número de loci potencialmente amplificáveis para espécies não modelos como a *viola*, mesmo que obtendo uma pequena cobertura do genoma. Apesar do pequeno número de bPALs obtidos, estes números são suficientes para se ter uma promissora análise genética e populacional de *L. anus*.

Referências

- Buschiazzo E, Gemmell NJ (2006) The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays*. 28: 1040-1050.
- Calabuig C, Rodrigues MDN, Moreira CGA, Almeida DB, Katzenberger M, Santos Júnior A, Moreira HLM (2012) Genome-wide identification and characterization of microsatellite loci in *coscoroba* swan (*Coscoroba coscoroba*). *Genomics and Quantitative Genetics*, 5: 14-19.
- Castoe TA et al (2012) Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLoS ONE*, 7(2).
- Ferraris CJ Jr (2003) Loricariidae – Loricariinae (armored catfishes). In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr (Eds). *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 300-350
- Gregory TR, Nicol JA, Tamm H, Kullman B, Kullman K et al (2007) Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 35:332–338.
- Kang JH, Park JY, Jo HS (2012) Rapid Development of Microsatellite Markers with 454 Pyrosequencing in a Vulnerable Fish, the Mottled Skate, *Raja pulchra*. *International Journal of Molecular Science*, 13: 7199-7211.
- Lance SL, Love CN, Nunziata SO et al (2013) 32 species validation of a new Illumina paired-end approach for the development of microsatellites. *PLoS ONE*, Lund, 8(11):1-11.

Li Q, Park C, Kobayashi T, Kijima A (2003) Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discos hannai*. *Marine Biotechnology* 3:331-338.

Luo W, Nie Z, Zhan F, Wei J, Wang W, Gao Z (2012) Rapid Development of Microsatellite Markers for the Endangered Fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) Using Next Generation Sequencing and Cross-Species Amplification. *International Journal of Molecular Science*, 13: 14946-14955.

Martins WS, Lucas DCS, Neves KFS, Bertioli DJ (2009) WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development, *Bioinformatics*, 3(6):282-283.

Megléc E, Nève G, Biffin E, Gardner MG (2012) Breakdown of Phylogenetic Signal: A Survey of Microsatellite Densities in 454 Shotgun Sequences from 154 Non Model Eukaryote Species. *PLoS ONE*, 7(7): e40861.

Melo, DC et al (2008). Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32(4): 220-224.

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2): 294-307.

Rodrigues MDN et al (2015). Development of microsatellite markers for use in breeding catfish, *Rhamdia* sp. *African Journal of Biotechnology*, 14(5): 400-411.

Rouchka, EC (2010) Database of exact tandem repeats in the Zebrafish genome. *BMC Genomics*, 11(347):1-11..

Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawets S, Misener S (Eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, USA. pp. 365-386.

Rychlik W (1993) Selection of primer for polymerase chain reaction. In: White BA. *Methods in molecular biology*. Humana press, Totowa, NJ, USA, pp.31-40.

Santos J (2012) Apropriação das áreas de pesca e uso dos recursos pesqueiros da Lagoa Mangueira por pescadores artesanais. *Dissertação*, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Tavares RA, Piedras SRN, Nunes MD, Almeida DB, Moreira CGA, Fernandes JM, Freitas SF, Moreira, HLM, Pouey JLOF, Dionello NJL (2014) Identificação de loci microssatélites com potencial de amplificação na espécie de Peixe-Rei (*Odontesthes humensis*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66: 1941-1945.

Tavares RA et al (2011) Utilization of microsatellite markers to form families of *Odontesthes bonariensis* in a genetic breeding program. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63:1263-1267.

Considerações finais

Através da nova tecnologia de sequenciamento, foi possível identificar marcadores microssatélites para a viola – *L. anus*. Alguns pontos do sequenciamento ainda devem ser aprofundados, como a qualidade do mesmo, já que se obteve uma pequena quantidade de leituras, que, contudo não interferiu no objetivo principal do trabalho.

É necessário agora caracterizar os SSRs identificados e através deles temos então a perspectiva de caracterizar a espécie e populações locais que sofrem com os impactos da ação humana, especialmente a pesca. O que é essencial para as perspectivas de produção da espécie.

Referências

ALBUQUERQUE, S. P. et al. Sistema de Controle da Pesca de Mato Grosso do Sul SCPECA/MS – 9. **Boletim 31 de Pesquisa e Desenvolvimento**: Embrapa Pantanal, Corumbá, n. 31, p. 47. 57 p. 2002.

ALVES, R. M.; SEBBERN, A. M.; ARTERO, A. S.; FIGUEIRA, A. Microsatellite loci transferability from *Theobroma cacao* to *Theobroma grandiflorum*. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 2, p. 1219-1221, 2006.

BEMVENUTI, M. A.; MORESCO, A. **Peixes-Áreas de banhados e lagoas costeiras do extremo sul do Brasil**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Recursos Hídricos, 2005. 63 p.

BRITTON, J.R.; ORSI, M.L. Non-native fish in aquaculture and sport fishing in Brazil: economic benefits versus risks to fish diversity in the upper River Paraná Basin. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.7, 2012.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMEL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **Bioessays**, v. 28, p.1040-1050, 2006.

CALABUIG, C.; RODRIGUES, M. D. N.; MOREIRA, C. G. A; ALMEIDA, D. B.; KATZENBERGER, M.; SANTOS JÚNIOR, A.; MOREIRA, H. L. M. Genome-wide identification and characterization of microsatellite loci in coscoroba swan (*Coscoroba coscoroba*). **Genomics and Quantitative Genetics**, v.5, p.14-19, 2012.

CARDOSO, A. C. **Biologia reprodutiva da viola *Loricariichthys anus* no reservatório do Chasqueiro - Arroio Grande, RS**. 2013. 43 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

CASTOE, T. A. et al. Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. **PLoS ONE**, v.7, n.2, 2012.

DE BRITTO, A. C. P. **Rendimento corporal e composição química da viola (*Loricariichthys anus*) em duas faixas de peso capturadas na Lagoa Mangueira, RS, Brasil**. 2012. 42 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

DE BRITTO, A. C. P. et al. Rendimento corporal e composição química do file da viola (*Loricariichthys anus*). **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.15, n.1, p. 38-44, 2014.

FERNANDEZ-SILVA, I.; WHITNEY, J.; WAINWRIGHT, B.; ANDREWS, K.R.; YLITALO-WARD, H. et al. Microsatellites for Next-Generation Ecologists: A Post-Sequencing Bioinformatics Pipeline. **PLoS ONE**, v.8, n.2, 2013.

FERRARIS, C, J, Jr. Loricariidae – Loricariinae (Armored catfishes). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. (Eds). **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p.300-350.2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, Ed. 2, 2006. 220 p.

GALETTI JR, P. M. et al. Genética da conservação brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Editora SBG, 290p. 2008. p. 244-274.

GRADA, A.; WEINBRECHT, K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, 2013.

GREGORY, T. R.; NICOL, J. A.; TAMM, H.; KULLMAN, B.; KULLMAN, K. et al. Eukaryotic genome size databases. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.35, n.1, p. 332–338, 2007.

GOZLAN, R. E. Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad? **Fish and Fisheries**. v. 9, p.106-115, 2008.

HELFMAN, G. S. **Fish conservation: a guide to understanding and restoring global aquatic biodiversity and fishery resources**. Washington, DC: Island Press, 584p, 2007.

KANG, J. H.; PARK, J. Y.; JO, H. S. Rapid Development of Microsatellite Markers with 454 Pyrosequencing in a Vulnerable Fish, the Mottled Skate, *Raja pulchra*. **International Journal Molecular Science**, v.13, p. 7199-7211, 2012.

LANCE, S. L.; LOVE, C. N.; NUNZIATA, S. O. et al. 32 species validation of a new Illumina paired-end approach for the development of microsatellites. **PLoS ONE**, Lund, v.8, n.11, p.1-11, 2013.

LI, Q.; PARK, C.; KOBAYASHI, T.; KIJIMA, A. Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. **Marine Biotechnology**, v.3, p.331-338, 2013.

LUO, W.; NIE, Z.; ZHAN, F.; WEI, J.; WANG, W.; GAO, Z. Rapid Development of Microsatellite Markers for the Endangered Fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) Using Next Generation Sequencing and Cross-Species Amplification. **International Journal of Molecular Science**, v.13, p.14946-14955, 2012.

MARINHO, R. S. de A.; SOUZA, J. E. R. T. de; SILVA, A. S.; RIBEIRO, L. L. Biodiversidade de peixes do semi-árido paraibano. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. Suplemento Especial, n. 1, 2006.

MARTINS, W. S.; LUCAS, D. C. S.; NEVES, K. F. S.; BERTIOLI, D. J. WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development. **Bioinformatics**, v.3, n.6, p.282-283, 2009.

MARDINI, C. V.; MARDINI, L. B. L. F. Observações sobre a viola na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros, RS. In: IX Encontro brasileiro de Ictiologia, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá - PR., 1992, p. 191.

MATIOLI, S. R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. In: _____. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202 p.

MEGA D. F; BEMVENUTTI, M. A. Guia didático sobre alguns peixes da Lagoa Mangueira, RS. **Rev. Eletrônica Caderno de Ecologia Aquática**, v. 1, n. 2, 2006.

MEGLÉCZ, E.; NÈVE, G.; BIFFIN, E.; GARDNER, M. G. Breakdown of Phylogenetic Signal: A Survey of Microsatellite Densities in 454 Shotgun Sequences from 154 Non Model Eukaryote Species. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

MELO, D. C. et al. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 220-224, 2008.

MELO, D. C. et al. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 87-93, 2006.

MENEZES, N. A. Padrões de distribuição da biodiversidade da Mata Atlântica do Sul e Sudeste brasileiro: peixes de água doce. In: **Conservation International do Brasil, Fundação Biodiversitas, Fundação S.O.S Mata Atlântica & Fundação André Tosello, Workshop sobre padrões de Biodiversidade da Mata Atlântica do Sudeste e Sul do Brasil**. Campinas, 1996.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, p. 14-17, 1998.

MOYLE, P. B.; LEIDY, R. A. Loss of biodiversity in aquatic ecosystems: evidence from fish faunas. In: FIELDER, P. L., JAIN, S. K. (eds.). **Conservation Biology: The Theory and Practice of Nature Conservation, Preservation, and Management**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.127-169.

NASCIMENTO, F. L. et al. Distribuição Espacial do Tucunaré, *Cichla sp.* (Pisces, Cichlidae), peixe amazônico introduzido no Pantanal, Brasil. **Boletim 24 de Pesquisa e Desenvolvimento**. Corumbá: Embrapa Pantanal, n. 24, p. 15, 2001.

NEFF, B. D. et al. Microsatellite Multiplexing in Fish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 129, p. 585-593. 2000.

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, n. 2, p. 294-307. 2006.

PETREIRE JR., M. et al. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). In: HART, P. J. B.; PICHER, T. J. (eds.). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 14, p. 403-414. 2004.

PETRY, A. C.; SCHULZ, U. H. Ritmo de alimentação de juvenis de *Loricariichthys anus* (Siluriformes, Loricaridae) da Lagoa dos Quadros, RS, Brasil. **Iheringia, Sér. Zoologia**, v. 89, p. 171-176, 2000.

POVH, J. A. et al. Monitoramento da variabilidade genética de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, do programa de aumento de estoque do rio Paranapanema. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1191-1195, 2009.

QUEROL, M. V. M. et al. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio Uruguai médio, Sul do Brasil. **Lheringia, Sér. Zool.**, v. 92, n. 3, p. 79-84, 2002.

RESENDE, E. K. et al. Melhoramento genéticos em peixes – uma revolução na aquicultura do Brasil. **Embrapa Pantanal**. ADM – Artigo de Divulgação na Mídia, n. 130, 4 p, 2008. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM130>> Acesso em: 01 jun. 2013.

RESENDE, E. K.; HILSDORF, A. W. S.; MARQUES, D. K. S. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. **Embrapa Pantanal**. Corumbá, MS. p. 43. 2006.

RODRIGUES, M. D. N. et al. Development of microsatellite markers for use in breeding catfish, *Rhamdia* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 400-411. 2015.

ROSSO, J. J.; MABRAGANA, E.; GONZALEZ CASTRO, M.; DIAZ DE ASTARLOA, J. M. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, p. 999-1011, 2012.

ROUCHKA, E. C. Database of exact tandem repeats in the Zebrafish genome. **BMC Genomics**, v. 11, n. 347, p. 1-11, 2010.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETS, S; MISENER, S. **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, USA. 2000.

RYCHLIK, W. Selection of primer for polymerase chain reaction. In: WHITE, B.A. **Methods in molecular biology**. Humana press, Totowa, NJ, USA. 1993.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 74, p. 5463–5467, 1977.

SANTOS, J. **Apropriação das áreas de pesca e uso dos recursos pesqueiros da Lagoa Mangueira por pescadores artesanais**. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

SILVANO, R. A. M.; BEGOSSI, A. Seasonal dynamics of the fishery at the Piracicaba River (Brazil). **Fisheries Research**, n. 51, p. 69-86, 2001.

STUDART, M. T. **Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP**. 2001. 73 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

SUZUKI, H. et al. Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in Loricariid catfishes of the Paraná River, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 57, p. 791-807, 2000.

TAVARES, R. A. et al. Utilization of microsatellite markers to form families of *Odontesthes bonariensis* in a genetic breeding program. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 1263-1267, 2011.

TAVARES, R. A.; PIEDRAS, S. R. N.; NUNES, M. D.; ALMEIDA, D. B.; MOREIRA, C. G. A.; FERNANDES, J. M.; FREITAS, S. F.; MOREIRA, H. L. M.; POUHEY, J. L. O. F.; DIONELLO, N. J. L. Identificação de loci microssatélites com potencial de amplificação na espécie de Peixe-Rei (*Odontesthes humensis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1941-1945, 2014.

TEIXEIRA DE MELLO, F.; VIDAL, N.; GONZALEZ-BERGONZONI, I.; IGLESIAS, C. Length-weight relationships of eight fish species from the lower section of the Uruguay River (Río Negro, Uruguay). **Journal of Applied Ichthyology**, v.25, p.128-129, 2009.

TROCA, D. F. A.; VIEIRA, J. P. Potencial invasor dos peixes não nativos cultivados na região costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 38, n. 2, p.109-120, 2012.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: an overview. In:
MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S.
Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs, p. 1-
12. 1998