



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES GENÉTICOS DO TIPO  
MICROSSATÉLITES PARA O PIRÁ-BRASÍLIA (*Simpsonichthys  
boitonei*), UMA ESPÉCIE DE PEIXE ANUAL ENDÊMICA DO  
DISTRITO FEDERAL**

Júlia Araújo Martins

Orientador: Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

BRASÍLIA – DF

DEZEMBRO/2019



**JÚLIA ARAÚJO MARTINS**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES GENÉTICOS DO TIPO  
MICROSSATÉLITES PARA O PIRÁ-BRASÍLIA (*Simpsonichthys  
boitonei*), UMA ESPÉCIE DE PEIXE ANUAL ENDÊMICA DO  
DISTRITO FEDERAL**

Trabalho de conclusão de  
curso de graduação em Medicina  
Veterinária apresentado junto à  
Faculdade de Agronomia e  
Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

BRASÍLIA – DF

DEZEMBRO/2019

Martins, Júlia Araújo

Desenvolvimento de marcadores genéticos do tipo microssatélite para o Pirá-Brasília (*Simpsonichthys boitonei*), uma espécie de peixe anual endêmica do Distrito Federal. / Júlia Araújo Martins; orientação de Fernando Pacheco Rodrigues. – Brasília, 2019.

31p.: il.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

Nome do Autor: Júlia Araújo Martins

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Desenvolvimento de marcadores genéticos do tipo microssatélite para o Pirá-Brasília (*Simpsonichthys boitonei*), uma espécie de peixe anual endêmica do Distrito Federal.

Ano: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias deste trabalho e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte deste trabalho pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Júlia A. Martins

---

Júlia Araújo Martins

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: MARTINS, Júlia Araújo

Título: Desenvolvimento de marcadores genéticos do tipo microssatélite para o Pirá-Brasília (*Simpsonichthys boitoni*), uma espécie de peixe anual endêmica do Distrito Federal.

Trabalho de conclusão do curso  
de graduação em Medicina Veterinária  
apresentado junto à Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília

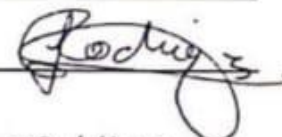
Aprovado em 12/12/2019

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

Instituição: IB / UNB

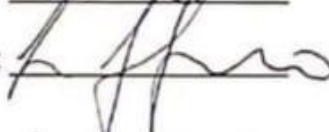
Julgamento: APROVADA

Assinatura: 

Profa. Dra. Lilian Gimenes Giugliano

Instituição: IB / UNB


Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

Dr. Pedro de Podestá Uchôa Aquino

Instituição: IB / UnB / Zoo

Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os amigos que me acompanharam em cada momento dessa graduação. Com vocês ao meu lado, cada desafio se tornou mais fácil e os bons momentos se tornaram muito melhores. Vocês foram importantes em cada conquista e, sem dúvidas, sem vocês nada disso seria possível. Levo vocês comigo em cada passo futuro.

Ao meu orientador Fernando, que aceitou me orientar e ofereceu seu tempo para me ajudar sempre que precisei. Esses meses de estágio e da confecção desse trabalho me ensinaram coisas muito além da graduação e sou eternamente grata por ter tido essa oportunidade.

À Marcela, que me ensinou tudo o que usei na prática. Por todos os dias que passamos no laboratório, e por ter dedicado seu tempo ao meu trabalho, ter tido muita paciência e atenção, sou muito grata. Ganhei não só conhecimento, mas também uma amiga que levarei no coração.

Aos meus pais, que me direcionaram em cada caminho da minha vida. Até me faltam palavras para descrever o quanto são importantes pra mim. Sei que sempre posso contar com vocês e tenho muita sorte de compartilharmos essa vida.

À Mía, que sempre foi a minha companhia em todas as horas de estudo. Por todas as vezes que pensei em desistir e você estava deitada ali do meu lado ou pisando no meu teclado e escrevendo textos próprios no meio dos meus estudos. Se segui na veterinária foi também por todo o meu amor por você.

A todos vocês, muito obrigada.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Biodiversidade .....	1
1.2. Diversidade genética .....	3
1.3. Marcadores genéticos: microssatélites .....	5
1.4. Peixes anuais (Killifishes) .....	7
1.5. Pirá-Brasília .....	9
2. ISOLAMENTO DE LOCOS MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE <i>S. boitonei</i> .....	10
3. AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO ENCONTRADO NOS MARCADORES MICROSSATÉLITES ISOLADOS PARA <i>S. boitonei</i> .....	15
3.1. Introdução .....	15
3.2. Material e métodos.....	15
3.3. Resultados .....	18
3.4. Discussão e conclusões.....	21
4. REFERÊNCIAS .....	24

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – Resumo dos resultados obtidos em cada etapa de desenvolvimento dos *primers* para a amplificação de locos microssatélites em *S. boitonei* ..... 13

TABELA 1 – Conjuntos multiplexes obtidos para a amplificação de 18 locos microssatélites isolados para *S. boitonei* ..... 14

TABELA 2 – Caracterização dos 13 locos microssatélites isolados para *S. boitonei* em 8 indivíduos da espécie ..... 19

TABELA 3 – Alelos encontrados nas diferentes localidades analisadas ..... 20

## RESUMO

O Pirá-Brasília (*Simponichthys boitonei*) é um peixe anual da família dos rivulídeos, endêmico do Distrito Federal, encontrado apenas em algumas poças d'água que se formam durante o período de chuvas no bioma Cerrado. Com o objetivo de avaliar a diversidade genética existente nessa espécie, seu DNA genômico foi sequenciado usando o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e locos microssatélites foram identificados. Do conjunto de locos encontrados, 18 foram selecionados e 13 foram efetivamente utilizados para a análise de 10 indivíduos de duas populações diferentes. A caracterização desses locos foi realizada utilizando 8 indivíduos coletados em um brejo no Córrego Taquara, sendo descritos o número de alelos encontrados, a heterozigosidade observada e esperada, o coeficiente de endogamia, a ocorrência de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e a frequência de alelos nulos. Os resultados obtidos indicam a existência de baixo polimorfismo nos locos analisados, o que é coerente com a estrutura populacional e a biologia reprodutiva do Pirá-Brasília. A análise adicional de 2 indivíduos coletados próximos ao Córrego do Guará sugere a existência de uma diferença na composição genética das duas áreas amostradas, com a presença de diferentes alelos nas duas populações. Os marcadores microssatélites desenvolvidos serão úteis para a avaliação da dinâmica espacial e temporal da diversidade genética encontrada em *S. boitonei*, o que contribuirá para um melhor entendimento sobre a biologia e a história de vida dessa espécie, atualmente criticamente ameaçada de extinção.

**Palavras chaves:** Pirá-Brasília, *Simponichthys boitonei*, rivulídeo, peixe anual, microssatélites, diversidade genética



## ABSTRACT

Pirá-Brasília (*Simponichthys boitonei*) is an annual fish of Rivulidae Family, endemic in Federal District, only found in some puddles formed during rainy season in Cerrado's biome. In order to evaluate the genetic diversity existent in this specie, its genomic DNA was sequenced using the New Generation Sequencing (NGS) methodology and microsatellite loci were identified. From the set of found loci, 18 were selected and 13 were effectively used for the analysis of 10 individuals from two different populations. The characterization of these loci was performed using 8 individuals collected in a swamp, in Taquara Stream, describing the number of alleles found, the observed and expected heterozygosity, the inbreeding coefficient, the occurrence of Hardy-Weinberg equilibrium and the frequency of null alleles. The obtained results indicate the existence of low polymorphism in the analyzed loci, which is consistent with the population structure and reproductive biology of Pirá-Brasília. The additional analysis of 2 individuals collected near the Guará Stream suggests the existence of a difference in the genetic composition of the two sampled areas, with the presence of different alleles in the two populations. The microsatellite markers developed will be useful to evaluate the spatial and temporal dynamics of the genetic diversity found in *S. boitonei*, which will contribute to a better understanding of the biology and the life history of this specie, currently critically endangered.

**Key words:** Pirá-Brasília, *Simponichthys boitonei*, rivulidae, annual fish, microsatellites, genetical diversity

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Biodiversidade

A biodiversidade se refere a variação nos vários níveis biológicos, como de ecossistemas, espécies e populações, assim como a diversidade genética existente dentro delas (FRANKHAM *et al.*, 2008). Em 1992, MAY afirmou que havia cerca de 1,4 milhões de espécies descritas e estimava-se que o número poderia ser o dobro pela quantidade de insetos não descritos. Não temos conhecimento exato da quantidade de espécies que existe no mundo, porque alguns seres como fungos, bactérias, ácaros e alguns insetos pequenos, por exemplo, são difíceis de estudar (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

Segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), genes, espécies e ecossistemas são os três níveis primários de biodiversidade e é controverso qual nível merece prioridade nas tentativas de conservação (BOWEN, 1999). O ser humano tem interesse em conservar a biodiversidade porque ela fornece os recursos que usa para sobreviver, pelo prazer de conviver com outros seres vivos, além de questões éticas (FRANKHAM *et al.*, 2008). Porém, o homem é uma grande ameaça à biodiversidade, diretamente pela caça (MARTIN & KLEIN, 1984) e, indiretamente, pelas queimadas e desmatamentos. Por mais que a extinção seja um processo natural, estima-se que quase todas as extinções atuais de espécies tenham relação com a atividade humana (RAUP & STANLEY, 1978). PRIMACK & RODRIGUES (2001) afirmam que as maiores causas atualmente da extinção de espécies são a destruição, fragmentação e degradação de habitats, superexploração, introdução de espécies exóticas e o aumento da ocorrência de doenças. Esses problemas são causados pelo aumento no uso dos recursos naturais pelas populações humanas em crescimento e aceleram a trajetória das espécies em direção à extinção, pois a maioria delas enfrentam dois ou mais desses problemas ao longo da vida. (GROOMBRIDGE, 1992).

A fragmentação de habitat acontece quando uma grande área contínua é reduzida ou dividida em dois ou mais fragmentos e pode ocorrer pela urbanização, com a construção de cidades, estradas, campos e fazendas

(WILCOVE *et al.*, 1986; SHAFER, 1990; PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Ela pode limitar o potencial de dispersão e colonização de uma espécie, fazendo com que, muitas vezes, um fragmento não seja recolonizado após o desaparecimento da população original (LOVEJOY *et al.*, 1986; BIERREGAARD *et al.*, 1992). Os ambientes fragmentados também favorecem a disseminação de doenças pelo fato de a redução do habitat aumentar o contato entre os animais, além de ocorrer a diminuição dos recursos naturais pela competição, que faz com que eles fiquem desnutridos e mais susceptíveis a enfermidades (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

Diversas espécies foram transportadas pra fora de seu hábitat natural pelo homem e isso fez com que muitas delas tenham sido introduzidas, intencionalmente ou não, em áreas onde não eram nativas (GROVE & BURDON, 1986; DRAKE *et al.*, 1989; HEDGPETH, 1993). O novo ambiente, na maioria das vezes, não é adequado, e elas acabam não se estabelecendo. Já aquelas que conseguem podem aumentar muito seu tamanho populacional usando os recursos de espécies nativas que já residiam naquele lugar, além de preda-las ou desloca-las por competição (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

As ameaças que causam extinção podem ser classificadas em dois tipos: as ameaças determinísticas e as ameaças estocásticas (CAUGHLEY, 1994). A primeira afeta os habitats diretamente pela destruição, poluição, translocação de espécies e mudança do clima, enquanto a segunda é representada pelas alterações demográficas, genéticas ou ambientais. As alterações genéticas são causadas por mudanças aleatórias e aumento da endogamia (SHAFFER, 1981). A melhor maneira de proteger os seres vivos é preservando seus habitats, pois a perda deles é a maior ameaça à sua sobrevivência (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

## 1.2. Diversidade genética

A diversidade genética se manifesta, não só pela variação fenotípica, mas também de proteínas, enzimas e sequências de DNA de cada organismo, e geralmente é descrita usando heterozigosidade média, polimorfismo e diversidade alélica (FRANKHAM *et al.*, 2002). Apenas as diferenças morfológicas mediam a diversidade dentro de uma espécie, mas, atualmente, os métodos mais utilizados são de detecção baseado em dados moleculares, que, por estudar um maior número de caracteres, são considerados mais vantajosos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; KARP *et al.*, 1996). A diversidade genética representa variações nos genes, que podem causar diferenças em funções comportamentais, bioquímicas e morfológicas, influenciando na taxa de adaptação e, conseqüentemente, na sobrevivência das espécies (FRANKHAM *et al.*, 2002). Dentro de uma espécie, a diversidade genética é afetada pelo comportamento reprodutivo dos indivíduos nas populações (PRIMACK & RODRIGUES, 2001), sendo importante para que as populações se adaptem às mudanças ambientais e evoluam (FRANKHAM *et al.*, 2002).

Mutação, migração e fluxo gênico mantêm continuamente um alto nível de variabilidade genética intrapopulacional em populações naturais (MORAND *et al.*, 2002). A mutação acontece com uma mudança súbita em um alelo ou cromossomo e é a fonte de toda a diversidade genética, porém, pelo fato das taxas mutacionais geralmente serem baixas, ela é uma força evolutiva fraca (FRANKHAM *et al.*, 2002). A força que melhor adapta as populações a seus habitats pelas mudanças evolutivas é a seleção natural, que proporciona mudanças nas frequências alélicas em função de diferentes taxas de sobrevivência e reprodução proporcionada por alguns genótipos (FRANKHAM *et al.*, 2002).

A diversidade genética pode ser reduzida por diversos fatores, entre os quais:

- a) Fragmentação populacional: A fragmentação e o isolamento das populações gerados pela modificação ou perda de habitats reduziu o tamanho populacional de várias espécies ao redor do mundo (ALLENDORF & LUIKART, 2007). A redução populacional faz com que a espécie fique sujeita aos efeitos da deriva genética e da endogamia (ver a seguir, o que pode levar à perda da diversidade genética e à depressão

endogâmica. Seu impacto depende diretamente do fluxo gênico entre os fragmentos, sendo maior quanto mais restrita for a conectividade entre dois fragmentos (FRANKHAM *et al.*, 2002).

- b) Endogamia e depressão endogâmica: A endogamia ocorre com o cruzamento entre indivíduos aparentados e pode ocorrer quando a fragmentação reduz o tamanho populacional (ALLENDORF & LUIKART, 2007). A endogamia tem como consequência a redução da heterozigosidade e aumento da homozigosidade, resultando em diminuição do *fitness* reprodutivo e da sobrevivência (processo conhecido como depressão endogâmica) e, conseqüentemente, aumentando o risco de extinção (FRANKHAM *et al.*, 2002). Para diminuir os efeitos da depressão endogâmica é necessário o cruzamento da população endogâmica com outra não correlacionada (FALCONER & MACKAY, 1996). Em populações pequenas e isoladas a endogamia e o conseqüente aumento do risco de extinção é inevitável (FRANKHAM *et al.*, 2002).
- c) Deriva genética: Em pequenas populações pode ocorrer que alguns alelos, ao acaso, não sejam passados para a próxima geração, causando a perda de alelos e de heterozigosidade (FRANKHAM *et al.*, 2002). A deriva genética é essa mudança aleatória das frequências alélicas por um erro de amostragem, e é um processo estocástico (ALLENDORF & LUIKART, 2007). Essa variação aleatória pode causar a eliminação ou a fixação de alelos, independentemente de seu coeficiente seletivo (ALLENDORF & LUIKART, 2007). Alelos com baixa frequência em uma população pequena têm grande probabilidade de serem perdidos a cada geração, porém esse efeito da deriva genética pode ser equilibrado com a migração de indivíduos entre populações, o que aumenta a variabilidade genética populacional (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Mesmo que o fluxo de migrantes seja pequeno, a introdução de novos indivíduos em uma população já minimiza a perda de variabilidade causada pela deriva genética, o que torna a migração o principal fator preventivo da perda de diversidade genética (LACEY, 1987; PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

Uma população pode ficar em risco pela perda da variabilidade genética porque é o que fornece o potencial adaptativo da espécie (FALCONER & MACKAY, 1996).

A União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) reconhece a diversidade genética como uma das três formas de diversidade com necessidade de conservação, junto com a diversidade de espécies e ecossistemas (MCNEELY *et al.*, 1990). A conservação de espécies ameaçadas e a manutenção de suas populações tem a diversidade genética como uma aliada, pois espécies com baixa variação genética geralmente têm dificuldade em sobreviver a mudanças ambientais durante o processo evolutivo (FRANKHAM, 1995). Os processos evolutivos tem produzido a diversidade genética ao longo de bilhões de anos no nosso planeta, e conserva-la é uma tentativa de proteger o resultado do processo evolutivo ocorrido ao longo de todos esses anos (EISNER *et al.*, 1995).

### 1.3. Marcadores Moleculares Genéticos: Microsatélites

Segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998), os marcadores moleculares genéticos representam o terceiro grupo de marcadores utilizados (após os marcadores morfológicos e isoenzimáticos), e surgiram pela necessidade de detectar o polimorfismo genético diretamente no DNA. Eles têm como definição qualquer fenótipo molecular proveniente de um segmento específico de DNA ou de um gene expresso (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), e são variantes de DNA herdadas geneticamente que diferenciam dois ou mais indivíduos (MILACH, 1998a).

Os marcadores moleculares podem ser usados mesmo sem a realização do seu mapeamento, desde que possam ser seguidos ao longo das gerações, comprovando sua natureza genética (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1988a). Marcadores moleculares de DNA são utilizados para o desenvolvimento de mapas genéticos, testes de pureza genética, estudos de interação genótipo-ambiente, determinação de grupos heterozigóticos, visualização de regiões genômicas que afetam a heterozigosidade, entre outros (RAFALSKI & TINGEY, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH,

1998a, 1998b). A caracterização molecular de uma espécie é utilizada para determinar relação de parentesco, variação genética e analisar populações (LANDERGREN *et al.*, 1980).

Os RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) foram os primeiros marcadores de DNA a ser desenvolvidos e foram uns dos tipos de marcadores mais usados (BOTSTEIN *et al.*, 1980). Eles permitem identificar uma grande quantidade de locos polimórficos, apresentam expressão codominante e podem ser causados por rearranjo de DNA, deriva genética e mudanças de pares de base (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Após ser desenvolvida na década de 80 a PCR (Polymerase Chain Reaction) começou a ser extensamente usada em várias áreas da biologia, e deu uma nova opção ao uso de marcadores moleculares (WHITE *et al.*, 1989). Ela é usada para amplificar sequências específicas de nucleotídeos a partir de uma pequena quantidade de DNA, sintetizando-a *in vitro* com a adição da enzima DNA polimerase e de *primers* específicos ou não, resultando em milhões de cópias idênticas da sequência delimitada (MULLIS & FALOONA, 1987; WHITE *et al.*, 1989). Sua aplicação permitiu o desenvolvimento de vários marcadores novos, entre eles os marcadores AP\_PCR e RAPD, e os microssatélites, entre outros. O AP-PCR (Amplified Polymorphism - Polymerase Chain Reaction) e o RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), desenvolvidos no início dos anos 1990, geravam uma grande quantidade de fragmentos polimórficos de DNA através da utilização de *primers* que não precisavam ser espécie-específicos e que se ligavam ao acaso em diversas regiões do genoma (WELSH & MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990). Essas metodologias representaram um grande avanço no desenvolvimento dos marcadores moleculares pois, por serem baseados na técnica de PCR, podiam ser obtidos utilizando-se pouca quantidade de DNA e sem o uso de enzimas de restrição (DEVOS & GALE, 1992; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites, ou SSR (Simple Sequence Repeats), são importantes ferramentas para estudos genéticos de diversidade, com foco em conservação de espécies (SELKOE & TOONEN, 2006). Eles consistem em repetições em tandem que variam de 1 a 6 nucleotídeos e são encontrados em todos os

eucariotos e procariotos estudados até o momento (TAUTZ, 1989; WEBER & MAY, 1989; ZANE *et al.*, 2002). TAUTZ (1989) os encontrou nos genomas dos eucariotos e, após começarem a ser pesquisados, foram descobertos altos níveis de polimorfismo, que os tornam uma ferramenta molecular bastante eficiente (WEBER, 1990). Eles possibilitam estudos populacionais com um grande número de indivíduos, e fornecerem resultados rápidos e com alta precisão (FERREIRA & GRATTAPLAGIA, 1998; WHITE *et al.*, 1989). Suas características mais importantes são apresentar uma ampla distribuição por todo o genoma e o alto polimorfismo (HAMADA *et al.*, 1982; LITT & LUTY, 1989; MAUDET *et al.*, 2002). Por serem marcadores codominantes, é possível observar ambos os alelos presentes em um loco e a heterozigosidade nas populações (MORAND *et al.*, 2002; COLLEVATTI *et al.*, 2001; HEUERTZ *et al.*, 2001; WHITE *et al.*, 1999). Sua utilização requer que *primers* espécie-específicos sejam desenhados, o que pode ser feito através da construção de bibliotecas genômicas (RODER *et al.*, 1995; RONGWEN *et al.*, 1995; DEVOS *et al.*, 1995) ou, mais recentemente, utilizando-se técnicas de sequenciamento de nova geração (ALLENTOFT *et al.*, 2009).

Os microssatélites são importantes para estudos genéticos focados em conservação por permitirem estimar a relação de parentesco entre indivíduos, analisar a ocorrência de fluxo gênico entre populações, avaliar a diversidade e estrutura genética de populações e espécies, entre outros (SELKOE & TOONEN, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

#### 1.4. Peixes anuais (Killifishes)

Os peixes anuais, ou *killifishes*, como também são conhecidos, pertencem à ordem dos Cyprinodontiformes (MYERS 1952; COSTA, 2013). Eles vivem em habitats temporários, com condições extremamente variáveis e possuem um curto período de vida, apresentando características únicas que são essenciais para sua sobrevivência (BEROIS *et al.*, 2017). Sua principal característica é seu ciclo de vida: se desenvolvem e se reproduzem nas poças e brejos formados durante o período de chuva, sendo seus ovos depositados no substrato, onde permanecem em diapausa durante o período de seca até o período chuvoso do



próximo ano. Durante o período de seca os indivíduos adultos morrem e, com o início das chuvas, os ovos eclodem e liberam suas larvas (COSTA, 2010; RAMOS, 2010; PONZETTO *et al.*, 2016). Os ovos sobrevivem porque permanecem enterrados no substrato, quando o desenvolvimento embrionário fica temporariamente suspenso (WORUMS, 1972). Esse ciclo faz com que as populações dependam das épocas chuvosas, para que as poças se formem novamente e seus ovos eclodam. Consequentemente, a principal ameaça a esses peixes é a perda de habitat, que atualmente é causada na maioria das vezes pelo desmatamento para ocupação agropecuária, urbanização, rodovias e implantação de barragens (ICMBIO, 2013).

No continente americano é encontrada a família Rivulidae, que contém aproximadamente 367 espécies divididas em 38 gêneros, distribuídas do sul da Flórida ao norte da Patagônia (COSTA, 1998; COSTA & BRASIL, 2006; NIELSEN, 2008; PONZETTO *et al.*, 2016). Aproximadamente metade das espécies de rivulídeos são peixes anuais (COSTA, 2010; ESCHMEYER *et al.* 2018). Eles são de pequeno porte, possuindo menos de dez centímetros de comprimento (ICMBIO, 2013). Além da perda de habitat, a sua comercialização como peixes ornamentais também é um risco para esses animais, pois os machos possuem colorações muito valorizadas por aquaristas. O ICMBIO afirma que, de acordo com os critérios adotados pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), 132 espécies de rivulídeos sofrem algum grau de ameaça. Por isso, um plano de ação nacional para a conservação dos rivulídeos ameaçados de extinção foi elaborado pelo ICMBio em 2013, com dois ciclos de ação: o primeiro realizado entre 2013 e 2018 e o segundo com previsão de ocorrer do ano 2020 ao ano 2025.

Por viverem em pequenos habitats isolados, os peixes anuais são um ótimo modelo de estudo de alterações genéticas causadas pelo isolamento populacional, que é geralmente decorrente da fragmentação de habitats. Nessa situação, os efeitos negativos de fenômenos ambientais e genéticos podem colocar as espécies em risco devido à redução das populações (FRANKHAM *et al.*, 2002; FAHRIG, 2003). As pequenas populações estão sujeitas a fatores estocásticos, o que pode levá-las à perda de variabilidade genética causada pelo fenômeno conhecido como deriva genética. Os fatores genéticos, como a deriva

genética e a endogamia, podem aumentar o risco de extinção de uma espécie. (ALLENDORF & LUIKART, 2007). A endogamia, que ocorre quando há acasalamento entre indivíduos aparentados, pode levar a população a apresentar depressão endogâmica. Esta se caracteriza pelo nascimento de menos crias ou por descendentes mais fracos ou estéreis (RALLS *et al.*, 1988). A melhor explicação para essas ocorrências é que ela permite que alelos deletérios herdados de ambos os pais se fixem (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 1987; BARRETT & KOHN, 1991).

*Simpsonichthys* é considerado um dos gêneros mais diversificados entre os *killifishes*, com cerca de 53 espécies descritas (RAMOS, 2010). A espécie *S. boitonei*, que é encontrado somente do Distrito Federal, está ameaçada de extinção segundo os critérios da IUCN (MMA, 2008; ICMBIO, 2013).

#### 1.5. Pirá-Brasília (*Simpsonichthys boitonei*)

O Pirá-Brasília (*Simpsonichthys boitonei*) foi descrito por Carvalho em 1959 a partir de amostras (cinco machos e duas fêmeas) coletadas durante a construção de Brasília, em uma área de alagamento próxima ao córrego Riacho Fundo, onde se encontra atualmente o Jardim Zoológico de Brasília. É um peixe da família dos rivulídeos, endêmico do Distrito Federal que, por viver em poças temporárias, é considerado um peixe anual (COSTA, 2002; SHIBATTA, 2005). Ele possui uma dieta baseada em algas, mini crustáceos e insetos (SHIBATTA & ROCHA, 2001).

Esse peixe está em risco de extinção por ser encontrado somente no Distrito Federal e sofrer as consequências de desmatamentos e poluição do seu habitat, além de seu uso como peixe ornamental (COSTA, 2002). Por causa desses danos ao seu ambiente natural, SHIBATTA (2005) afirma que ele provavelmente já esteja extinto onde foi encontrado pela primeira vez, na área que faz parte atualmente do Zoológico de Brasília.

## 2. ISOLAMENTO DE LOCOS MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE *S. boitonei*

Até recentemente, o isolamento de locos microssatélites para espécies não-modelos só era possível por metodologias laboratoriais bastante trabalhosas. Entre as técnicas mais utilizadas para esse fim, estava o desenvolvimento de bibliotecas genômicas enriquecidas com microssatélites, envolvendo a clonagem de DNA, construção de bibliotecas genômicas e *screening* dos clones obtidos através do sequenciamento de Sanger. Além de ser um processo trabalhoso e demorado, o número de locos obtidos por essa metodologia costuma ser relativamente baixo (tipicamente algumas poucas dezenas), o que faz com que o custo-benefício seja muito baixo. Este cenário começou a mudar em 2009, quando as metodologias de sequenciamento de nova geração (Next-Generation Sequencing – NGS) começaram a ser utilizadas para a identificação das sequências microssatélites em espécies não-modelos (ALLENTOFT et al., 2009). Logo após esse primeiro artigo, outros trabalhos foram publicados mostrando a eficiência desta nova metodologia e a grande redução de custo (duas a cinco vezes menos) e de tempo quando comparado com as metodologias tradicionalmente utilizadas (ABDELKRIM et al., 2009; CASTOE et al., 2010; CSENCISCS et al., 2010). Além disso, uma outra vantagem se destaca: através do sequenciamento de nova geração é possível identificar de centenas a milhares de locos microssatélites.

Para a identificação de locos microssatélites em *S. boitonei* foi utilizada a metodologia NGS implementada com o equipamento Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, California, USA), conforme os passos descritos abaixo:

### a) Extração do DNA genômico e quantificação

Para a obtenção de DNA de alta qualidade, necessário para a realização da metodologia NGS, uma amostra de tecido de um indivíduo de *S. boitonei*, coletado na Reserva Ecológica do IBGE em 2016 foi utilizada. Após a coleta, a amostra foi armazenada em um tubo de polipropileno de 2,0 mL contendo álcool absoluto e mantida em freezer -20°C até o seu processamento em laboratório. A extração foi realizada utilizando o kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit

(Qiagen ®), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, a qualidade do DNA obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. Uma vez avaliada, a qualidade do DNA extraído e sua quantificação foram avaliadas utilizando o fluorímetro Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific).

#### b) Construção da biblioteca Illumina e sequenciamento genômico

A preparação da biblioteca genômica e seu sequenciamento foram realizadas pela empresa GenOne Biotechnologies ([www.genone.com.br](http://www.genone.com.br)), utilizando 1,0µg do DNA extraído durante a preparação da amostra. A biblioteca para sequenciamento foi gerada usando o kit Truseq Nano DNA HT (Illumina USA) seguindo as recomendações do fabricante. Resumindo, o DNA genômico foi fragmentado em tamanhos aproximados de 500pb, cujas extremidades foram reparadas, fosforiladas e adeniladas, sendo posteriormente ligados à adaptadores para o sequenciamento Illumina e amplificados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Finalmente, os produtos de PCR foram purificados, analisados quanto à distribuição dos tamanhos dos fragmentos e quantificados por PCR em tempo real. Após a certificação da qualidade do material obtido, a biblioteca foi submetida ao sequenciamento de nova geração no sequenciador Illumina HiSeq 2500, onde foram geradas as sequências utilizadas nas análises seguintes.

#### c) Resultados do sequenciamento NGS

No total, foram obtidas 1.976.962 sequências. Após filtragem dos dados brutos para retirada das sequências contendo N>10% (N representa uma base que não pode ser determinada), sequências contendo adaptadores e sequências com baixa qualidade, foram obtidas 1.325.553 (67,05%) sequências limpas e prontas para uso.

Cada fragmento de DNA utilizado na construção da biblioteca foi sequenciado a partir de ambas as extremidades (*paired-end sequencing*),

gerando sequências de aproximadamente 250pb que, nos passos seguintes, foram unidas para gerar uma sequência de aproximadamente 500pb.

d) Identificação das regiões microssatélites e desenvolvimento de *primers* para amplificação dos locos encontrados

Para a identificação das regiões microssatélites e desenvolvimento de *primers* para a amplificação dos locos selecionados utilizamos o *pipeline* desenvolvido por GRIFFITHS *et al.* (2016), baseado na ferramenta de bioinformática Galaxy. O pacote desenvolvido por esses autores pode ser acessado *on-line* no endereço web <http://palfinder.ls.manchester.ne.uk>.

Esse pacote foi desenvolvido especificamente para o desenvolvimento de microssatélites a partir de dados brutos gerados pelo sistema Illumina, e incorpora uma série de softwares já existentes e um novo *script* para filtragem dos dados. Durante o processamento das sequências é possível avaliar suas qualidades, retirar os adaptadores inseridos durante a confecção da biblioteca genômica, isolar as sequências contendo microssatélites, desenhar *primers* para todos os locos encontrados (usando o software Primer3), filtrar *primers* e locos inadequados (remoção de repetições microssatélites imperfeitas ou interrompidas, remoção de locos os quais a sequência do *primer* ocorre em mais de um *read*, remoção dos locos os quais não é possível desenhar *primers*) e filtrar os *primers* e locos após a montagem dos pares de *reads*.

Ao analisar os dados usando todos os filtros disponíveis, foram encontradas 59.096 regiões contendo microssatélites no conjunto de sequências geradas pela técnica de NGS. Após a filtragem desses dados, restaram 1.732 regiões microssatélites, das quais 5 possuíam como *motif* (número de bases no motivo de repetição) pentanucleotídeos, 137 tetranucleotídeos, 229 trinucleotídeos e 1361 dinucleotídeos. Após a montagem (*assembly*) dos *contigs*, foram obtidos 221 locos os quais possibilitaram o desenvolvimento de *primers* para sua amplificação via PCR. Desses locos, 1 era composto por um pentanucleotídeo, 23 por tetranucleotídeos, 35 por trinucleotídeos e 162 por dinucleotídeos. Essas informações estão apresentadas na Quadro 1.

QUADRO 1 - Resumo dos resultados obtidos em cada etapa de desenvolvimento dos *primers* para a amplificação de locos microssatélites em *S. boitonei*

Total de microssatélites encontrados	59.096
Total de locos microssatélites após aplicação dos parâmetros de filtragem	1.732
Total de locos microssatélites, com <i>primers</i> desenhados, após montagem dos <i>reads</i>	221
Quantidade de locos microssatélites para cada um dos <i>motifs</i> selecionados	1 pentanucleotídeo 23 tetranucleotídeos 35 trinucleotídeos 162 dinucleotídeos

e) Seleção dos locos microssatélites para estabelecimento de PCRs multiplex

Do conjunto de 221 locos de microssatélites obtidos ao final do processo descrito acima, foram selecionados 18 locos (1 pentanucleotídeo, 8 tetranucleotídeos e 9 trinucleotídeos) para o início do processo de caracterização e avaliação do polimorfismo encontrado. Eles foram selecionados com base na quantidade de repetições presentes (no. de repetições > 8), distância dos *primers* até o *motif* e ausência de outras sequências repetitivas dentro da sequência analisada. Para a realização de PCRs multiplexes, a metodologia proposta por VARTIA *et al.* (2014) foi utilizada, na qual as PCRs são realizadas com três *primers* (*primer forward* sintetizado com cauda universal, *primer reverse*, e cauda universal marcada com fluoróforo). Foram utilizadas três diferentes caudas universais marcadas com diferentes fluoróforos (Hill: TGACCGGCAGCAAATTG marcada com FAM; Neomycin\_rev: AGGTGAGATGACAGGAGATC marcada com CAL Fluor Orange 560 e M13 (-21): TGTAAAACGACGGCCAGT marcada com NED). Esta metodologia permite, através da combinação de diferentes fluoróforos e tamanho dos marcadores selecionados, a amplificação e genotipagem até 12 locos/amostra simultaneamente, o que torna mais rápido e econômico o processo de caracterização dos locos desenvolvidos e a genotipagem das amostras.

Para o estabelecimento dos conjuntos multiplexes, os 18 locos selecionados foram dispostos em ordem crescente de tamanho. Adotando-se como regra a existência de aproximadamente 50pb (ou mais) entre dois locos para que estes pudessem ser amplificados utilizando a mesma fluorescência, realizamos a combinação dos locos para a amplificação em multiplex utilizando as três caudas/fluorescências descritas anteriormente. Desta forma, foi possível estabelecer 3 conjuntos multiplexes, conforme mostrado na Tabela 1 apresentada abaixo:

TABELA 1 - Conjuntos multiplexes obtidos para a amplificação de 18 locos microssatélites isolados para *S. boitonei*

Loco	Repetição	Tamanho (pb)	Multiplex 1	Multiplex 2	Multiplex 3
Sboi 09	AGG (10)	199	1A		
Sboi 11	TTCCT (10)	201	1B		
Sboi 12	AAT (13)	237		2B	
Sboi 17	TTG (12)	247	1C		
Sboi 03	GACA (25)	248		2C	
Sboi 18	CTT (8)	255			3A
Sboi 14	ATTC (17)	275	1A		
Sboi 05	ATTT (12)	278		2A	
Sboi 10	AGG (8)	280			3B
Sboi 06	TCCA (14)	281	1B		
Sboi 08	AGC (19)	306		2B	
Sboi 01	ATGG (26)	324	1C		
Sboi 04	ATCC (14)	361		2C	
Sboi 13	AGA (8)	362			3C
Sboi 07	ATT (10)	368	1A		
Sboi 16	ATT (17)	373		2A	
Sboi 02	TAGA (10)	379	1B		
Sboi 15	ATGG (13)	381		2B	

A= Cauda Hill (marcada com FAM), B = Cauda Neomycin\_rev (marcada com Cal Flúor Orange 560) e C = Cauda M13(-21) (marcada com NED), pb = pares de base.

Após a definição dos conjuntos multiplexes os *primers* foram sintetizados pela empresa Exxtend ([www.exxtend.com.br](http://www.exxtend.com.br)) e, após eluição em laboratório, foram utilizados para a amplificação e caracterização dos locos estudados, conforme apresentado a seguir no capítulo 3.

### 3. AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO ENCONTRADO NOS MARCADORES MICROSSATÉLITES ISOLADOS PARA *S. boitonei*

#### 3.1. Introdução

A caracterização do polimorfismo existente nos locos microssatélites é um passo fundamental para a avaliação de novos marcadores moleculares desenvolvidos para uma determinada espécie. Durante essa caracterização normalmente são avaliados a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados, o número de alelos encontrados, a heterozigosidade observada e esperada, a ocorrência de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, a frequência de alelos nulos, entre outros. Essa caracterização permite uma avaliação mais precisa dos marcadores desenvolvidos, fornecendo parâmetros que poderão ser utilizados posteriormente para a seleção daqueles mais adequados para a realização de estudos populacionais que visem a avaliação da diversidade e estrutura genética da espécie de interesse, análises de parentesco e testes de paternidade, entre outros. Nesse capítulo, a avaliação do polimorfismo genético encontrado nos marcadores microssatélites isolados para *S. boitonei*, uma espécie de peixe anual endêmico do Distrito Federal, será apresentada. Conforme descrito no capítulo anterior, um total de 18 locos foram selecionados para essa caracterização, visando formar um conjunto de marcadores que permitam avaliar a diversidade e estrutura genética nessa espécie, que atualmente encontra-se sob forte risco de extinção.

#### 3.2. Material e métodos

##### a) Obtenção das amostras e extração do DNA

Para a caracterização do polimorfismo genético encontrado nos marcadores microssatélites isolados de *S. boitonei*, foi utilizado um total de 10 amostras obtidas de indivíduos coletados em duas localidades: 8 amostras coletadas em brejos ao longo do Córrego Taquara, localizado na Reserva Ecológica do IBGE e 2 amostras coletadas em um brejo às margens do córrego Guará, localizado



na Reserva Ecológica do Guará. Essas amostras, coletadas em junho de 2014 (amostras da RE do IBGE) e fevereiro de 2016 (amostras na RE do Guará), consistiam em pedaços de tecido muscular ou guelras armazenadas em tubos de polipropileno de 2 mL contendo álcool absoluto e mantidos em freezer até a extração do DNA.

A extração do DNA das amostras foi realizada utilizando-se um kit de extração da Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração o DNA foi quantificado por espectrofotometria e diluído em água Milli-Q contendo aproximadamente 25 ng/ $\mu$ L.

#### b) Amplificação e genotipagem dos marcadores microssatélites

Normalmente, antes de se realizar uma PCR multiplex, os locos microssatélites selecionados são amplificados individualmente para a padronização das reações de amplificação e avaliação da distribuição dos tamanhos dos alelos encontrados em cada loco. Entretanto, por uma questão de tempo, e cientes de que utilizamos condições bastante restritivas durante a confecção dos *primers* desenvolvidos para a amplificação dos marcadores isolados, optamos neste trabalho por realizar a amplificação dos locos estudados diretamente por reações multiplexes. Dessa forma, os 18 locos utilizados foram agrupados em 3 conjuntos multiplex: Multiplex 1, contendo oito locos (Sboi 01, Sboi 02, Sboi 06, Sboi 09, Sboi 07, Sboi 11, Sboi 14, Sboi 17); Multiplex 2, contendo sete locos (Sboi 03, Sboi 04, Sboi 05, Sboi 08, Sboi 12, Sboi 15, Sboi 16); e Multiplex 3, contendo três locos (Sboi 10, Sboi 13, Sboi 18) (para mais detalhes, ver Capítulo 2).

As PCRs multiplex foram realizadas utilizando o kit de PCR multiplex da Qiagen (Qiagen Multiplex PCR Kit) em um volume final de 15  $\mu$ L contendo 35,5 ng de DNA, 1x Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), 0,05  $\mu$ M de cada *primer* forward modificado com a cauda apropriada, 0,2  $\mu$ M de cada *primer* reverse, 0,2  $\mu$ M de *primer* universal marcado com fluoróforo para cada *primer* forward modificado com a respectiva cauda universal. Controles negativos (sem DNA) foram incluídos para monitorar a possível ocorrência de contaminação. As PCRs multiplex foram realizadas em duas etapas, sendo: 95°C por 15 minutos seguido

por 30 ciclos a 94°C por 30s, 56°C por 90s e 72°C por 60s, seguidos de 8 ciclos de 94°C por 30s, 53°C por 90s e 72°C por 60s, e finalmente 72°C por 30 minutos. O sucesso e a qualidade da amplificação foram avaliados através de uma eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. Posteriormente, as amostras foram preparadas para genotipagem. Para isso, uma solução foi preparada contendo 2,0 µL de produto do PCR multiplex, 7,6 µL de formamida e 0,4 µL do marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems), a qual foi desnaturada à 95°C por 5 minutos e analisada em eletroforese capilar no sequenciador ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados foram analisados utilizando o software GENEIOUS 6.1.6, através do qual o tamanho dos alelos encontrados para cada um dos locos foi avaliado.

#### c) Análise dos dados

Diversos softwares foram utilizados para caracterizar os locos microssatélites e a diversidade genética neles encontrada. O software FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995) foi utilizado para testar a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos analisados, determinar o número de alelos ( $N_A$ ), estimar a riqueza alélica ( $R_A$ ), o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) e seu o nível de significância estatística. O software Genepop (ROUSSET, 2008) foi utilizado para calcular a heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ), e testar a ocorrência de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). O programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004) foi utilizado para avaliar a ocorrência de alelos nulos, *allele dropout* e erros de genotipagem, enquanto que a frequência de alelos nulos ( $r$ ) foi estimada com o programa FreeNa (CHAPUIS & ESTOUP, 2007) pelo algoritmo EM de DEMPSTER *et al.* (1977). Os valores de significância ( $p$ ) foram ajustados para múltiplos testes utilizando a correção de Bonferroni (RICE, 1989).

### 3.3. Resultados

Dos 18 locos utilizados nas reações multiplex, 2 (Sboi 05 e Sboi 07) não apresentaram nenhum produto de amplificação após a PCR, enquanto que para outros 3 locos (Sboi 10, Sboi 11 e Sboi 16) foi possível determinar o genótipo de apenas um indivíduo. Desta forma, esses cinco locos foram descartados, resultando na análise final de 13 locos.

O teste de desequilíbrio de ligação não foi significativo para nenhuma das comparações realizadas, indicando a segregação independente dos locos avaliados. Para caracterizar a diversidade encontrada nesses 13 locos utilizamos apenas as oito amostras oriundas da Reserva Ecológica do IBGE, já que a inclusão das duas amostras da Reserva Ecológica do Guará, por apresentarem composição genética distinta daquelas encontradas no IBGE (ver Tabela 4 abaixo), ocasionou a distorção dos resultados referentes à avaliação de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e estimativas da frequência de alelos nulos. A análise realizada com o software Micro-Checker indicou a possível ocorrência de alelos nulos apenas para o loco Sboi 01, sendo a frequência de alelos nulos estimada para esse loco igual a 0,235. Apesar do loco Sboi 09 não apresentar indicativo da presença de alelos nulos com a análise no programa Micro-Checker, a estimativa de sua frequência com o software FreeNa forneceu um resultado relativamente alto, igual à 0,224. Os resultados obtidos durante a caracterização desses locos são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Caracterização dos 13 locos microssatélites isolados para *S. boitonei* em 8 indivíduos da espécie

Loco	Variação no tamanho dos alelos (pb)	No. de Alelos	$H_o$	$H_e$	Valor de P EHW	$F_{IS}$	Valor de P $F_{IS}$	$r$
Sboi 01	344-352	3	0,250	0,675	0,042	0,646	0,015	0,235
Sboi 02	387	1	0,000	0,000	-	-	-	0,001
Sboi 03	252	1	0,000	0,000	-	-	-	0,001
Sboi 04	445-461	5	0,625	0,792	0,442	0,222	0,219	0,034
Sboi 06	301	1	0,000	0,000	-	-	-	0,001
Sboi 08	321-327	2	0,250	0,233	1,000	0,077	1,000	0,000
Sboi 09	220-226	2	0,000	0,233	0,067	1,000	0,073	0,224
Sboi 12	258-264	2	0,625	0,525	1,000	0,207	0,900	0,000
Sboi 13	371	1	0,000	0,000	-	-	-	0,001
Sboi 14	239-275	2	0,125	0,125	-	0,000	1,000	0,000
Sboi 15	421-425	2	0,250	0,233	1,000	0,077	1,000	0,000
Sboi 17	265-271	2	0,500	0,500	1,000	0,000	0,792	0,000
Sboi 18	297-327	6	0,875	0,767	1,000	0,153	0,927	0,000
Média		2,31	0,269	0,314	0,646	0,152	0,089	0,038

$H_o$ : heterozigiosidade observada;  $H_e$ : heterozigiosidade esperada;  $F_{IS}$ : coeficiente de endogamia; EHW: Equilíbrio Hardy-Weinberg;  $r$ : frequência de alelos nulos. Nível de significância estatística após correção de Bonferroni ( $\alpha \leq 0.00385$ ).

O total de alelos encontrados nos 13 locos avaliados, utilizando apenas as oito amostras da Reserva Biológica do IBGE, foi igual à 30, fornecendo um número médio de alelos por loco igual à 2,31 (Tabela 2). Ao avaliar os alelos presentes nas duas amostras oriundas da Reserva Ecológica do Guará, não utilizadas para a caracterização dos locos microssatélites, apresentada na Tabela 3, foi verificada a presença de 13 alelos adicionais, distintos dos alelos encontrados nas amostras do IBGE. Analisadas em conjunto, o número de alelos encontrados nas duas áreas é igual à 43, fornecendo um número médio de alelos por loco igual à 3,31 (Tabela 3).

TABELA 3 – Alelos encontrados nas diferentes localidades analisadas

<b>Loco</b>	<b>Alelos encontrados na análise de 8 amostras do IBGE</b>	<b>Alelos encontrados na análise de 2 amostras do Guará</b>	<b>Número de alelos encontrados na análise das 10 amostras em conjunto</b>
Sboi 01	3 (344 <sup>+</sup> , 348 e 352 <sup>+</sup> )	1 (348)	3
Sboi 02	1 (387)	2 (387 e 411*)	2
Sboi 03	1 (252 <sup>+</sup> )	2 (288* e 300*)	3
Sboi 04	5 (445 <sup>+</sup> , 449 <sup>+</sup> , 453 <sup>+</sup> , 457 <sup>+</sup> , 461 <sup>+</sup> )	1 (373*)	6
Sboi 06	1 (301)	2 (301 e 309*)	2
Sboi 08	2 (321 <sup>+</sup> e 327 <sup>+</sup> )	1 (318*)	3
Sboi 09	2 (220 <sup>+</sup> e 226 <sup>+</sup> )	1 (214*)	3
Sboi 12	2 (258 e 264 <sup>+</sup> )	2 (258 e 261*)	3
Sboi 13	1 (371)	1 (371)	1
Sboi 14	2 (239 <sup>+</sup> e 275 <sup>+</sup> )	2 (235* e 291*)	4
Sboi 15	2 (421 <sup>+</sup> e 425 <sup>+</sup> )	1 (401*)	3
Sboi 17	2 (265 e 271 <sup>+</sup> )	1 (265)	2
Sboi 18	6 (297 <sup>+</sup> , 306 <sup>+</sup> , 309 <sup>+</sup> , 312 <sup>+</sup> , 318 <sup>+</sup> , e 327 <sup>+</sup> )	2 (303* e 321*)	8
<b>Média</b>	<b>2,31</b>	<b>1,46</b>	<b>3,31</b>

+ = alelos presentes apenas nas amostras do IBGE (24 alelos); \* = alelos presentes apenas nas amostras do Guará (13 alelos)

Do total de 43 alelos encontrados, foi verificado que 24 alelos estão presentes apenas nas amostras da Reserva Ecológica do IBGE (n = 8 indivíduos), 13 alelos estão presentes apenas nas amostras da Reserva Ecológica do Guará (n = 2 indivíduos), e 6 alelos são comuns às duas áreas amostradas (Tabela 3).

### 3.4. Discussão e Conclusões

As análises apresentadas acima ainda são preliminares, feitas para a caracterização da diversidade genética encontrada nos marcadores microssatélites desenvolvidos para o peixe *Simpsonichthys boitonei*. Os resultados indicam a existência de baixo polimorfismo nos locos analisados, com número médio de alelos por população variando entre 2,31 e 3,31, dependendo do conjunto de amostras incluídas nas análises.

A caracterização geral dos locos estudados foi realizada utilizando apenas as amostras obtidas na Reserva Ecológica do IBGE. Para esse conjunto de amostras ( $n = 8$ ), foi verificado que apenas os locos Sboi 04 e Sboi 18 apresentaram uma quantidade de alelos que pode ser considerada mediana para marcadores microssatélites, com 5 e 6 alelos respectivamente. Os demais locos apresentaram baixo polimorfismo, possuindo entre 1 e 3 alelos (quatro locos apresentaram apenas 1 alelo, seis locos apresentaram 2 alelos, e um loco apresentou 3 alelos). O baixo polimorfismo encontrado nos locos analisados resultou no baixo número médio de alelos (2,31), assim como baixos valores de heterozigosidade observada ( $H_o = 0,269$ ) e esperada ( $H_E = 0,314$ ). Após a correção de Bonferroni, nenhum dos locos apresentou desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo observado, entretanto, uma frequência de alelos nulos ( $r$ ) estimada em 0,23 e 0,22 para os locos Sboi 01 e Sboi 09, respectivamente. O coeficiente de endogamia médio apresentou um valor que pode ser considerado mediano/baixo ( $F_{IS} = 0,152$ ), não significativo estatisticamente.

Poucos trabalhos utilizando marcadores microssatélites foram realizados até o momento com outras espécies de *killifishes* (Ordem Cyprinodontiformes). GUERRERO-JIMENEZ *et al.* (2017), estudando cinco populações Andinas de morfoespécies pertencentes ao gênero *Orestias*, com oito locos microssatélites, encontrou que o número médio de alelos por população variou entre 5 e 9,3 (em nosso trabalho = 2,3), enquanto que o valor de  $F_{IS}$  variou entre -0,04 e 0,10 (em nosso trabalho = 0,15). Já PAPPALARDO *et al.* (2015), analisando cinco locos microssatélites em cinco populações de duas espécies mediterrâneas, encontrou resultados mais próximos aos nossos: para *Aphanius fasciatus* o número médio de alelos por população variou entre 2,6 e 4,2, enquanto que o

valor de  $F_{IS}$  variou entre 0 e 0,08; já para *Aphanius iberus* o número médio de alelos por população variou entre 1,66 e 2,33 e o  $F_{IS}$  variou entre 0 e 0,14. Como comparação, citamos aqui o artigo de DANANCHER *et al.* 2008, que estudou o peixe *Zingel asper*, uma espécie europeia pertencente à Família Percidae, Ordem Perciformes (portanto não é um *killifish*), endêmica da bacia do rio Ródano na França e na Suíça. Essa é uma das espécies europeias de peixe mais ameaçada, que corre risco de extinção devido à destruição e poluição do habitat. Apesar de ameaçada, a avaliação genética com cinco locos microsatélites de cinco localidades amostradas revelou um número médio de alelos por localidade variando entre 8 e 11,6, e um valor de  $F_{IS}$  variando entre -0,001 e 0,04, valores bem diferentes daqueles encontrados em nosso trabalho e nos artigos de GUERRERO-JIMENEZ *et al.* 2017 e PAPPALARDO *et al.* 2015 apresentados acima.

Apenas 2 amostras da Reserva Ecológica do Guará foram analisadas, o que impede uma avaliação mais precisa da diversidade genética encontrada nessa localidade. Entretanto, a análise comparativa dos alelos encontrados nessa população com àqueles encontrados na Reserva Ecológica do IBGE revela informações importantes quanto à diversidade encontrada na espécie como um todo e quanto à distribuição dessa diversidade entre as suas populações. Nas duas amostras da Reserva Ecológica do Guará analisadas foi encontrado, para o conjunto de 13 locos avaliados, um total de 19 alelos (contra 30 alelos encontrados nas oito amostras do IBGE), sendo que 13 dos 19 alelos observados foram encontrados apenas nessa localidade. Por outro lado, dos 30 alelos encontrados na área do IBGE, apenas 6 também estavam presentes nas amostras do Guará. Dos 13 locos analisados nas duas amostras, 7 apresentaram um único alelo (sendo que em 4 locos o alelo observado não foi encontrado na população do IBGE), e 6 apresentaram 2 alelos. Apesar da limitação imposta pela pequena quantidade de amostras analisadas, os dados encontrados sugerem a existência de uma diferença na composição genética das duas áreas amostrada, com a fixação de diferentes alelos nas duas populações.

Os resultados aqui apresentados são coerentes com a estrutura populacional e a biologia reprodutiva do Pirá-brasília. Como já descrito no capítulo 1, essa espécie apresenta ciclo de vida anual, e suas populações estão

restritas à pequenas áreas alagadas que se formam durante o período chuvoso. Atualmente, apenas as populações encontradas na Reserva Ecológica do Guará e na Reserva Ecológica do IBGE são conhecidas. Além do fato dessas áreas alagadas onde a espécie vive abrigarem um número reduzido de indivíduos, sua distribuição atual é disjunta, estando as duas áreas isoladas uma da outra devido à ocupação humana no território do Distrito Federal. Populações isoladas e com número de indivíduos reduzido são muito susceptíveis aos efeitos da deriva genética, fenômeno no qual a flutuação aleatória das frequências alélicas pode levar à fixação ou perda de alelos, reduzindo assim a diversidade genética tanto em termos de número de alelos como em heterozigosidade. É provável que a baixa diversidade encontrada nos locos microssatélites analisados nesse trabalho seja fruto desse processo, que levaria também à fixação de diferentes alelos nas duas áreas estudadas. Entretanto, para uma avaliação precisa da diversidade e estrutura genética encontrada nessa espécie é necessário a análise de um número maior de amostras das diferentes áreas. Além disso, a análise de amostras obtidas na mesma área em anos consecutivos pode revelar dados importantes sobre a dinâmica da diversidade genética encontrada nas suas populações, frente às características reprodutivas observadas na espécie.

Apesar de ser uma análise inicial, os dados apresentados neste trabalho são extremamente relevantes, e mostram o potencial dos marcadores microssatélites aqui desenvolvidos para a realização de estudos genéticos populacionais que permitam uma melhor compreensão da história de vida das espécies de peixes anuais, em particular de *S. boitoni*.



#### 4. REFERÊNCIAS

ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. 2007. **Conservation and the Genetics of Populations**. Blackwell Publishing Ltda.

ALLENTOFT, M.; SCHUSTER, S.C.; HOLDAWAY, R.N.; HALE, M.L.; MCLAY E.; OSKAM, C.; GILBERT, M.T.P.; SPENCER, P.; WILLERSLEY, E.; BUNCE, M. 2009. **Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data**. *BioTechniques*, p.195–200.

BARRETT, S.C.H.; KOHN, J.R. 1991. **Genetic and evolutionary consequences of small population sizes in plants: Implications for conservation**. In: Falk, D.A. and Holsinger, K.A., Eds., *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, New York, p.3-30.

BEROIS, N.; GARCIA, G.; DE SÁ, R. O. 2017. **A global community effort to decipher the unique biology of annual killifish**. *Developmental Dynamics*, p.807-811.

BIERREGAARD, R.O.; JR., T.E.; LOVEJOY, V.; KAPOS, A.A.; DOS SANTOS; HUTCHINGS, R.W. 1992. **The biological dynamics of tropical rainforest fragments**. *Bioscience*, p.859-866

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. 1980. **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms**. *American Journal of Human Genetics*, v.32, p.314-331.

BOWEN, B. W. 1999. **Preserving genes, species or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy**. *Molecular Ecology*.

CASTOE, T.A.; POOLE, A.W.; GU, W.; KONING, A.P.J.; DAZA, J.M.; SMITH, E.N.; POLLOCK, D. 2010. **Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence**. *Molecular Ecology Resources*, p.341–347.

CAUGHLEY, G. 1994. **Directions in conservation biology**. *Journal of Animal Ecology*, p.215-244

CHAPUIS, M.P.; ESTOUP, A. 2007. **Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation**. *Mol Biol Evol* **24**: p.621–631.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. 1987. **Inbreeding depression and its evolutionary consequences**. *Annual Review of Ecology and Systematics*, p.237– 268.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. 2001. **High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species**. *Heredity*, V.86, n.1, p.60-67.

COSTA, W.J.E.M. 2002. **Peixes anuais brasileiros: diversidade e conservação**. Curitiba, Editora da Universidade Federal do Paraná, p.238.

COSTA, W.J.E.M. 2013. **Historical biogeography of aplocheiloid killifishes (Teleostei: Cyprinodontiformes)**. *Vertebrate Zoology*, 63: p.139-154.

COSTA, W.J.E.M. 2010. **Historical biogeography of cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal-vicariance analysis**. *Journal of Biogeography*, 37: p.1995-2004.

COSTA, W.J.E.M. 1998. **Phylogeny and classification of the Cyprinodontiformes (Euteleostei: Atherinomorpha): a reappraisal**. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Eds) **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, p.537-560.

COSTA, W.J.E.M.; BRASIL, G.C. 2006. **Redescription of *Simpsonichthys boitonei* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae), a rare seasonal killifish from the central Brazilian plateau**. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 17: p.221-224.

CSENCICS, D.; BRODBECK, S.; HOLDREGGER, R. 2010. **Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology**. *Journal of Heredity*, 101, p.789–793.

DANANCHER, D.; IZQUIERDO, J.I.; GARCIA-VAZQUEZ, E. 2007. **Microsatellite analysis of relatedness structure in young of the year of the endangered *Zingel asper* (Percidae) and implications for conservation**. *Freshwater Biology*, v. 53, p.546-557.

DEMPSTER, A.; LAIRD, N.; RUBIN, D. 1977. **Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm.** Journal of the Royal Society.B, 39, p.1-38.

DEVOS, K.M.; BRYAN, G.J.; COLLINS, A.J.; STEPHENSON, P; GALE, M.D. 1995. **Application of two microsatellite sequences in wheat storage protein as molecular markers.** Theoretical and Applied Genetics, v.90247-90252.

DEVOS, K.M.; GALE, M.D. 1992. **The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat.** Theoretical and Applied Genetics, v.84, p.567-572.

DRAKE, J.A, et al. (eds.). 1989. **Biological Invasions: A Global Perspective.** SCOPE Report No. 37. John Wiley, New York.

EISNER, T.; LUBCHENCO, J.; WILSON, E.O.; WILCOVE, D.S.; BEAN, M.J. 1995. **Building a scientifically sound policy for protecting endangered species.** Science 268: p.1231-1233.

ESCHMEYER, W.N.; FRICKE, R.; VAN DER LAAN, R. (eds). **Catalogo f Fishes: genera, species, references.** Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Versão eletrônica acessada em 25/11/2019.

FAHRIG, L. 2003. **Effects of habitat fragmentation on biodiversity.** *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 34: p.487-515.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. 1996. **Introduction to Quantitative Genetics**, 4th edn. Longman Science and Technology, Harlow, UK.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética.** 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. 2002. **Introduction to conservation genetics.** Cambridge University Press, 1st ed, p.640.

GOUDET, J. 2001. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).** Lausanne University, Lausanne, Switzerland.

GRIFFITHS, S.M.; FOX, G.; BRIGGS, P.J.; DONALDSON, I.J.; HOOD, S.; RICHARDSON, P.; LEAVER, G.W.; TRUELOVE, N.; PREZIOSI, R.F. 2016. **A Galaxy-based bioinformatics pipeline for optimized, streamlined microsatellite development from Illumina next-generation sequencing data.**

Conservation Genetics Resources, 8, p.481-486.

GROOMBRIDGE, B. (ed.). 1992. **Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources**. Compiled by the World Conservation Monitoring Center, Cambridge, U.K. Chapman and Hall, London.

GROVE, R.H.; BURDON, J.J. eds. 1986. **Ecology of Biological Invasions** Cambridge: Cambridge University Press.

GUERRERO-JIMÉNEZ, C. J.; PEÑA, F.; MORALES, P.; MÉNDEZ, M.; SALLABERRY, M.; VILA, I.; POULIN, E. 2017. **Pattern of genetic differentiation of an incipient speciation process: the case of high Andean killifish *Orestias***. PLoS ONE, v. 12, n. 2, e:0170380, p.19.

HAMADA, H.; PETRINO, M.C.; TAKUGANA, T. 1982. **A novel repeated element with Z-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes**. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, v.79, p.6465-6469.

HEDGPETH, J.W. 1993. **Foreign invaders**. Science 261: p.34-35

HEUERTZ, M.; HAUSMAN, J.F.; TSVETKOV, I.; FRASCARIA-LACOSTE, N.; VEKEMANS, X. 2001. **Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.)**. Molecular Ecology, V.10, n.7, p.1615- 1623.

ICMBIO. **Sumário executivo do plano de ação nacional para a conservação dos peixes rivulídeos ameaçados de extinção, 2013**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docsplanodeacao/panrivulideos/sumario-executivo-rivulideos.pdf>

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. 1996. **Molecular techniques in the assessment of botanical diversity**. Annals of Botany, V.78, n.2, p.143-149.

LACEY, R.C. 1987. **Loss of genetic diversity from managed populations: Interacting effects of drift, mutation, immigration, selection and population subdivision**. Conservation Biology 1: p.143-158

LANDEGREN, U.; KAISER, R.; CASKEY, C.T.; HOOD, L. **DNA diagnostics. Molecular techniques and automation**. 1980. Science, v.242, p.229-237.

LITT, M.; LUTY, J.A. 1989. **A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle action gene**. American Journal of Human Genetics, v.44, p.398-401.

LOVEJOY, T.E. et al. 1986. **Edge and other effects of isolation on Amazon forest fragments**. In SOULÉ, M.E. (ed.), *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*, p.257- 285. Sinauer Associated, Sunderland, MA.

MARTIN, P.S.; KLEIN, R.G. (eds.). 1984. **Quaternary Extinctions: A Prehistoric Revolution**. University of Arizona Press, Tucson.

MAUDET, C.; MILLER, C.; BASSANO, B.; BREITENMOSER-WÜRSTEN, C.; GAUTHIER, D.; OBEXER-RUFF, G.; MICHALLET, J.; TABERLET, P.; LUIKART, G. 2002. **Microsatellite DNA and recent statictical methods in wildlife conservation management: aplications in Alpine ibex [*Capra ibex (ibex)*]**. *Molecular Ecology*, V.11, n.3, p.421-436.

MAY, R.M. 1992. **How many species inhabit the Earth?** *Scientific American* 267: p.42-48

MCNEELY, J.A. et al. 1990. **Conserving the World's Biological Diversity**, IUCN, World Resources Institute, CI, WWF-US, the World Bank, Gland, Swizerland and Washington D.C.

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

MILACH, S.C.K. 1998a. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS.

MMA. 2008. **Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção, v. 2**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente.

MORAND, M.E.; BRACHET, S.; ROSSIGNOL, P.; DUFOUR, J.; FRASCARIA-LACOSTE, N. 2002. **A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations**. *Molecular Ecology*, V.11, n.3, p.377-385.

MULLIS, K.; FALOONA, F. 1987. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction**. *Methods in Enzymology*, v.55, p.335-350.

MYERS, G.S. 1952. **Annual fishes**. *Aquarium J*, 23: p.125-141.

NIELSEN, D.T.B. 2008. ***Simpsonichthys e Nematolebias***. São Paulo: Editora Cabral, p.234.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. 2006. **Origin, evolution and genome distribution of microsatellites.** *Genetics and Molecular Biology*, V.29, n.2, p.294- 307.

PAPPALARDO, A.; GONZALEZ, E. G.; TIGANO, C.; DOADRIO, I.; FERRITO, V. 2015. **Comparative pattern of genetic structure in two Mediterranean killifishes *Apanius fasciatus* and *Aphanius iberus* inferred from both mitochondrial and nuclear data.** *Journal of Fish Biology*, v. 87, p.69-87.

PONZETTO, J. M.; BRITZKE, R.; NIELSEN, D.T.B.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; ALVES, A.L. 2016. **Phylogenetic relationships of *Simpsonichthys* subgenera (Cyprinodontiformes, Rivulidae), including a proposal for a new genus.** *Zoologica Scripta*, 45: p.394-406.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES E. 2001. **Biologia da Conservação.**

RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1993. **Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites, and machines.** *Trends in Genetics*, v.9, p.275-280.

RALLS, K; BALLOU, J.D.; TEMPLETON, A. 1988. ***Conserv. Biol.* 2.**

RAMOS, H.A.C. 2010. **Modelos qualitativos para investigar o ciclo de vida e a influência de atividades antrópicas sobre os biotopes de Pirá-Brasília – *Simpsonichthys boitonei* – em Brasília, DF.** Dissertação de Mestrado, UnB.

RAUP, D.M.; STANLEY, S.M. 1978. **Principles of Paleontology**, 2nd ed. W. H. Freeman, San Francisco.

RICE, W.R. 1989. **Analyzing tables of statistical test.** *Evolution*, 43, p.223-225.

RODER, M.S.; PLASCHKE, J.; KONIG, S.U.; BORNER, A.; SORRELS, M.A.; TANSKLEY, S.D.; GANAL, M.W. 1995. **Abundance variability and chromosomal location of microsatellites in wheat.** *Molecular and General Genetics*, v.246, p.327-333.

RONGWEN, J.; AKKAYA, M.S.; BHAGWATT, A.A.; LAVI, U; CREGAN, P.B. 1995. **The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification.** *Theoretical and Applied Genetics*, v.90, p.43-48.

ROUSSET, F. 2008. **Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux**. *Molecular Ecology Resources*, 8, p.103-106.

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. 2006. **Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers**. *Ecology Letters*, V.9, n.5, p.615-629.

SHAFER, C.L. 1990. **Nature Reserves: Island Theory and Conservation Practice**. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.

SHAFFER, M.L. 1981. **Minimum population sizes for species conservation**. *BioScience* 31: p.131-134.

SHIBATTA, O.A. 2005. **Reprodução do pirá-brasília, *Simpsonichthys boitonei* Carvalho (Cyprinodontiformes, Rivulidae), e caracterização de seu habitat na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Brasília, Distrito Federal, Brasil**. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22: 1146-1151.

SHIBATTA, O.A.; ROCHA, A.J.A. 2001. **Alimentação em machos e fêmeas do pirá-brasília, *Simpsonichthys boitonei* Carvalho (Cyprinodontiformes, Rivulidae)**. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18: p.381-385.

TAUTZ, D. 1989. **Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers**. *Nucleic Acids Research*, V.17, n.16, p.6463-6471.

VAN OOSTERHOUT, C. *et al.* 2004. **Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data**. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, n. 3, p.535-538.

VARTIA, S.; COLLINS, P.C.; CROSS, T.F.; FITZGERALD, R.D.; GAUTHIER, D.T.; MCGINNITY, P.; MIRIMIN, L.; CARLSSON, J. 2014. **Multiplexing with three-primer PCR for rapid and economical microsatellite validation**. *Hereditas*, 151, p.43-54.

WEBER, J. L.; MAY, P.E. 1989. **Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction**. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, v.44, p.388-396.

WEBER, J.L. 1990. **Human DNA polymorphisms and methods of analysis**. *Current Opinion in Biotechnology*, V.1, n.2, p.166-171.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. 1990. **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers**. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.7213-7218.

WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. 1999. **Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc.** *Molecular Ecology*, V.8, n.11, p.1899-1909.

WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. 1989. **The polymerase chain reaction**. *Trends in Genetics*, v.5, p.185-189.

WILCOVE, D.S.; MCOLLON, C.H.; DOBSON, A.P. 1986. **Habitat fragmentation in the temperate zone**. In SOULÉ, M.E. (ed.), *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*, p.237-256. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers**. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535.

WOURMS, J.P. 1972. **The developmental Biology of annual fishes III. Pre-embryonic and embryonic diapause variable duration in the eggs of annual fishes**. *Journal of Experimental Zoology*, Hoboken, 182: p.389-414.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. 2002. **Strategies for microsatellite isolation: a review**. *Molecular Ecology*, V.11, n.1, p.1-16.