
Ciências Biológicas

Rafael Bim Ongaro Pinheiro

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
DE MICROSSATÉLITE RESPECTIVOS À
ESPÉCIE *ASTYANAX LACUSTRIS***



Rio Claro
2018

RAFAEL BIM ONGARO PINHEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES DE
MICROSSATÉLITE RESPECTIVOS À ESPÉCIE *ASTYANAX
LACUSTRIS***

Orientadora: Dra. Prianda Rios Laborda

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Silva Araújo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas

Rio Claro
2018

P654d Pinheiro, Rafael Bim Ongaro
Desenvolvimento de Marcadores de Microsatélite
Respectivos à Espécie *Astyanax lacustris* / Rafael Bim Ongaro
Pinheiro. -- Rio Claro, 2018
30 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura -
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Prianda Rios Laborda
Coorientador: Márcio Silva Araújo

1. Genética de populações. 2. Microsatélite. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

RESUMO

Astyanax lacustris, conhecido popularmente como lambari, é uma espécie de peixe encontrada em rios e lagoas do Pantanal sul-mato-grossense. Microssatélites são regiões do genoma que apresentam alta taxa mutacional e polimorfismo já em níveis populacionais. Este é o tipo de marcador ideal para inferir sobre processos ecológicos e evolutivos em escalas curtas de tempo. O objetivo deste estudo foi desenvolver marcadores microssatélites para futuros trabalhos de genética populacional. Após o isolamento do DNA, foi realizado o procedimento de enriquecimento da biblioteca de microssatélites. Noventa e seis clones foram duplamente sequenciados, e 43 locos marcadores putativos foram identificados, sendo 37 dinucleotídeos e seis tetranucleotídeos. Os motivos dos dinucleotídeos encontrados foram 64% (AC/TG)_N e 21% (AG/TC)_N. Os resultados relativos aos motivos dos microssatélites corroboram os marcadores isolados para as espécies *A. altiparanae* e *A. fasciatus*. Foram desenhados e sintetizados 23 *primers* para a espécie. Até o momento, foram testados cinco *primers*. Todos apresentaram polimorfismo e alto potencial informativo para futuras análises sobre a espécie *A. lacustris*.

Palavras-chave: Baía da Medalha, genética de populações, Pantanal, Rio Miranda

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	5
2.OBJETIVO	8
3.MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1.Material	8
3.2.Métodos	8
4.RESULTADOS	9
5.DISSCUSSÃO	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1.INTRODUÇÃO

O Pantanal apresenta uma área de 140.000km² e é caracterizado por ser uma planície inundável com rios e lagoas perenes. A maior parte dessas lagoas permanecem isoladas dos rios durante a estação seca e conectam-se ao rio mais próximo com o início da estação chuvosa (JUNK *et al.*, 2006). Nesse bioma, muitas espécies de peixe apresentam períodos reprodutivos que coincidem com o verão, justamente quando as chuvas conectam as lagoas aos rios, de forma que os peixes dos rios reproduzem-se nas lagoas da planície alagada.

O lambari *Astyanax lacustris* (Lütken 1875) ocorre no Pantanal sul-mato-grossense, sendo encontrado em lagoas e rios deste bioma (HECKMAN, 1998; SILVA *et al.*, 2010). Cada ambiente apresenta um conjunto de características bióticas e abióticas que os definem. As lagoas são ambientes lênticos, rasos, com muita vegetação aquática. Já os rios são ambientes lóticos que apresentam maior coluna d'água, velocidade e menor presença de vegetação aquática (JUNK *et al.*, 2011).

Costa-Pereira *et al.* (2016) encontraram diferenças morfológicas, durante a estação seca, entre uma população de *A. lacustris* isolada em uma lagoa conhecida como baía da Medalha e a população adjacente do rio Miranda. No rio Miranda, os indivíduos apresentaram a região anterior do corpo relativamente maior, afinando até a região posterior, com um pedúnculo caudal curto. Na baía da Medalha, os indivíduos apresentaram a região anterior do corpo relativamente menor e a região posterior relativamente maior, com um pedúnculo caudal maior. Essas morfologias funcionais distintas influenciam diretamente a performance natatória dos peixes, sendo esperadas em ambientes lóticos e lênticos respectivamente (TOKIC & YUE, 2012; LANGERHANS & REZNICK, 2010). No caso das populações de *A. lacustris* estudadas, as diferenças morfológicas encontradas indicam que essas populações estão adaptadas aos seus respectivos ambientes (LANGERHANS & REZNICK, 2009; LANGERHANS *et al.*, 2004).

Astyanax lacustris reproduz-se durante a estação chuvosa, quando as populações dos rios se deslocam para a planície alagada para se reproduzir (HECKMAN, 1998; SILVA *et al.*, 2010). Supondo ausência de isolamento reprodutivo entre as populações dos rios e das lagoas, as diferenças morfológicas observadas seriam mantidas por seleção natural diversificadora, que se sobreporia ao efeito do

fluxo gênico entre populações. Por outro lado, é possível que essas populações estejam isoladas reprodutivamente por mecanismos de acasalamento preferencial, apesar de se reproduzirem no mesmo ambiente e na mesma época do ano. Uma maneira de testarmos essas hipóteses é quantificando o grau de diferenciação genética entre indivíduos coletados nas lagoas e nos rios.

Entretanto, antes de testar as hipóteses anteriormente citadas, é necessário caracterizar a variabilidade genética das populações de *A. lacustris*. Com a caracterização da frequência alélica, é possível observar como ocorre a estruturação genética entre as populações estudadas (VANHAECKE *et al.*, 2012; YI *et al.*, 2015). Para estudar a diversidade genética entre populações, utilizam-se marcadores moleculares. Uma possibilidade são marcadores de DNA, que fornecem evidências sobre polimorfismos em regiões específicas do genoma dentro das populações (JIANG, 2013). Diversos marcadores moleculares foram desenvolvidos nas últimas décadas, como alozimas, SNPs (*single nucleotide polymorphism*), RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) e microssatélites.

Microssatélites, também denominados a partir do inglês, SSRs (*Simple Sequence Repeats*), são sequências de nucleotídeos repetidas em *tandem* (SELKOE & TOONEN, 2006). Podem variar de apenas um nucleotídeo (mononucleotídeos) até seis (hexanucleotídeos) e são usualmente considerados como marcadores evolutivamente neutros (LI *et al.*, 2002). Microssatélites apresentam alta taxa mutacional, entre 10^{-2} e 10^{-6} mutações por loco/por geração (SCHLOTTERER, 2000) e, por isso, são locos altamente polimórficos já em nível populacional. Seus alelos são variações no número de repetições dos motivos e o padrão de herança é codominante (BORIS *et al.*, 2011). Estas regiões repetitivas são facilmente identificáveis por suas regiões flangeadoras que apresentam baixa taxa mutacional, permanecendo conservadas entre indivíduos da mesma espécie ou até mesmo de espécies filogeneticamente aparentadas (SELKOE & TOONEN, 2006).

Diversas espécies de peixes, como o linguado-japonês (*Paralichthys olivaceus*), a carpa-comum (*Cyprinus carpio*) e representantes da família Salmonidae, por exemplo, a truta-marrom (*Salmo trutta*), a truta-hucho (*Hucho perryi*), o salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) e a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), foram estudadas a partir do uso de microssatélites (SEKINO *et al.*, 2002; DESVIGNES *et al.*, 2001; ANGERS & BERNATCHEZ, 1997).

Em relação ao gênero *Astyanax*, este tipo de marcador já foi utilizado em várias espécies, como *A. fasciatus* (a mesma espécie também é referida por alguns autores como *A. mexicanus*), *A. scabripinnis*, *A. intermedius*, *A. altiparanae*, *A. schubarti*, *A. gitton* e *A. parahybae*, com o intuito de conduzir análises genéticas entre populações, entre espécies ou de auxiliar a revisão taxonômica, a partir do polimorfismo do genoma (STRECKER *et al.*, 2003; PROTAS *et al.*, 2005; VICARI *et al.*, 2010; PANARAM & BOROWSKY, 2005; STRECKER, 2003; KAVALCO *et al.*, 2007; ABEL *et al.*, 2006; BRADIC *et al.*, 2012). Por exemplo, populações da espécie *A. fasciatus* apresentam indivíduos com características anatômicas adaptadas a ambientes de superfície (com luminosidade) e indivíduos com adaptações a ambientes de caverna (ausência de luminosidade). Populações de 11 cavernas e dez de ambiente superficial foram amostradas para a análise do fluxo gênico, diversidade genética, taxa migratória, diversidade alélica e até tamanho de cada população empregando marcadores de microssatélites (BRADIC *et al.*, 2012).

Em outro caso, microssatélites foram utilizados para determinar a evolução do albinismo em 29 populações cavernícolas de *A. mexicanus*. Foram isolados 600 microssatélites e seus respectivos primers foram sintetizados para obter um mapa de ligação gênica para investigar o albinismo. Por meio desta ferramenta, inferiu-se que o albinismo evoluiu, independentemente, em duas populações cavernícolas diferentes por processos diferentes no mesmo gene (PROTAS *et al.*, 2005).

Devido às características listadas, microssatélites são os marcadores genéticos ideais para serem utilizados em trabalhos de estruturação genética populacional e fluxo gênico. Até o presente momento, não foram isolados marcadores microssatélites para *A. lacustris*. No entanto, a utilização dos microssatélites é mais fácil e informativa quando os marcadores são espécie-específicos, o que torna necessário o desenvolvimento destes marcadores para a espécie em questão (SELKOE & TOONEN, 2006).

O presente Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) é parte de um projeto financiado pela FAPESP acerca da variação genética e morfológica da espécie *Astyanax lacustris*, coordenado pelo co-orientador do presente TCC, Dr. Márcio Silva Araújo. O projeto como um todo visa investigar a variação morfológica e genética de populações oriundas de seis lagoas ao longo do rio Miranda. Os marcadores desenvolvidos no presente TCC serão utilizados posteriormente na análise genética das populações de *A. lacustris*.

2.OBJETIVO

O objetivo do presente TCC é o isolamento/desenvolvimento de marcadores microssatélites para a espécie de peixe *Astyanax lacustris*, por meio da construção de uma biblioteca enriquecida, desenho de *primers* para potenciais locos e avaliação preliminar do polimorfismo em indivíduos de duas populações naturais.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1.Material

Os peixes utilizados no presente projeto estavam disponíveis em coleção. Portanto, nenhum animal foi sacrificado para este trabalho. Os indivíduos de *A. lacustris* (n=44) foram coletados na Baía da Medalha (19°34'34" S; 57°00'46" W) em maio de 2017 (estação seca). Os peixes foram identificados com base na chave de identificação proposta por Britski, (2007). Recentemente, *A. lacustris* passou a ser sinonímia para *Astyanax asuncionensis* (LUCENA & SOARES, 2016). Os indivíduos foram armazenados em álcool absoluto.

3.2.Métodos

Pequenas quantidades de músculo foram usadas para a extração do DNA pelo protocolo *salting out* (SUNNUCKS & HALES, 1996; ALJANABI & MARTINEZ, 1997). Foi construída uma biblioteca enriquecida em microssatélites segundo as especificações descritas em Billotte *et al.*, (1999). O método é baseado na digestão do DNA genômico pela enzima *Afa* I (antiga *Rsa* I) que origina fragmentos de terminações abruptas que são ligados a adaptadores 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' e 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'. Posteriormente, estes fragmentos foram hibridizados com sondas biotina contendo microssatélites sintéticos dos tipos (TG)_N e (TC)_N e subsequentemente recuperados por partículas ligadas a streptavidina magnetizadas (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles). Os fragmentos selecionados são ligados ao vetor plasmidial pGEM-T Vector System, introduzidos via eletroporação em células de *E. coli* competentes (XL1-Blue) para a clonagem do inserto. O vetor possibilita a seleção de colônias recombinantes pelo método azul e branco.

Após o sequenciamento dos clones, os microssatélites foram identificados com a ferramenta SSRIT (TEMNYKH, *et al.*, 2001). Foram considerados dinucleotídeos com 7 ou mais repetições, trinucleotídeos com 5 ou mais repetições, e tetranucleotídeos e pentanucleotídeos com 3 ou mais repetições. Os *primers* para amplificação via PCR (*polymerase chain reaction*) foram desenhados com o *software* PRIMER3 (UNTERGASSER *et al.*, 2012). Após esta etapa, foram verificados a viabilidade de amplificação e o polimorfismo dos locos selecionados anteriormente e realizada a genotipagem na amostra populacional seguindo a estratégia utilizada em Laborda *et al.* (2009). O cálculo das estatísticas de sumário, como número de alelos/loco e heterozigosidades observada e esperada, serão feitos com o *software* GENEPOP (ROUSSET, 2008).

4.RESULTADOS

Foram realizados quatorze lotes de extração, com média de 12 amostras por lote, para isolar o DNA genômico de *A. lacustris* com o intuito de atingir a qualidade e a quantidade necessária para iniciar a construção da biblioteca enriquecida. Após cada extração, foi realizada uma verificação do resultado por meio de uma eletroforese contendo o DNA extraído em um gel de agarose 1%. Três *marcadores* de DNA (λ 50ng/ μ L, λ 100 ng/ μ L e λ 150 ng/ μ L) foram os parâmetros para inferir a massa das amostras de DNA isolado de *A. lacustris* (Figura 1).

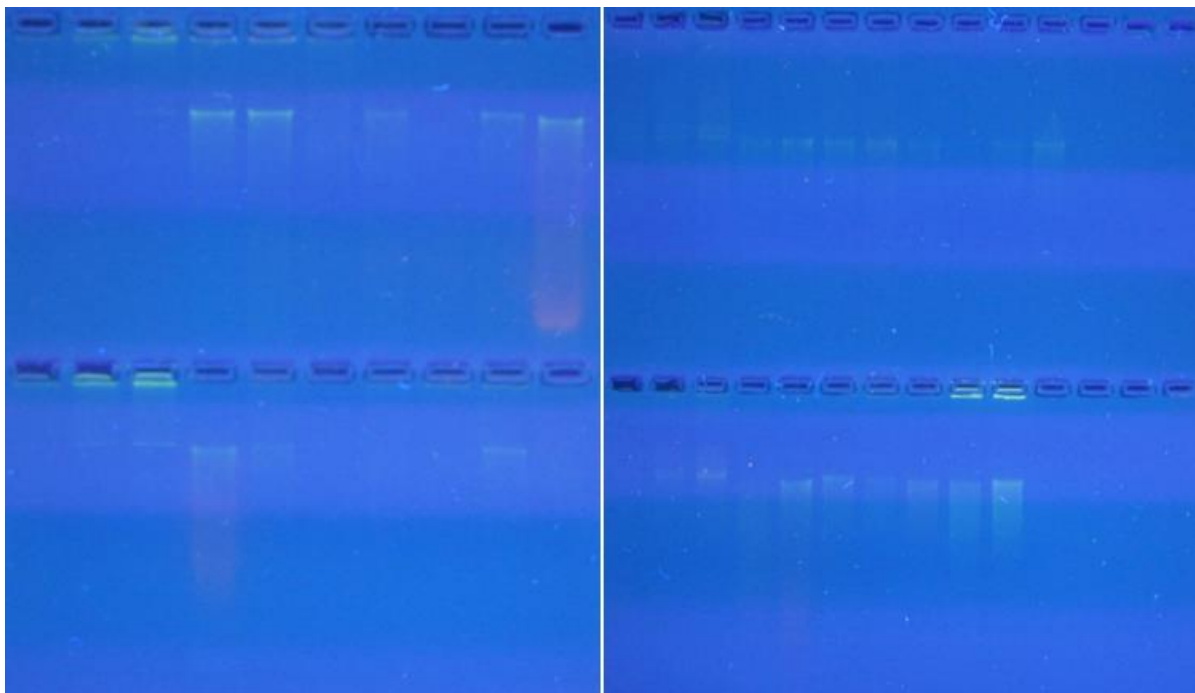


Figura 1. Quantificação das amostras de DNA genômico de *Astyanax lacustris*. Géis 1% agarose TAE 1X, 100V por 1,5 h. Em ambas as fileiras, os primeiros três poços contêm os marcadores de peso molecular (λ 50ng/ μ L, λ 100 ng/ μ L e λ 150 ng/ μ L, respectivamente), demais poços contêm amostras de *A. lacustris*.

Seguindo a próxima etapa, deu-se o início à construção da biblioteca enriquecida de microssatélites. O DNA genômico foi digerido e posteriormente checado por um novo gel de agarose 1%, dessa forma verificou-se a digestão do DNA. Os fragmentos digeridos foram ligados aos adaptadores já citados anteriormente, hibridizados com sondas de biotina ligadas a SSRs sintéticos dos tipos (TG)_N e (TC)_N e recuperados por magnetismo. Em sequência, os fragmentos foram inseridos em vetor plasmidial e inoculados em células de *E. coli* competentes para transformação, como especificado anteriormente. Foram isolados 384 clones. Os insertos de 96 clones foram amplificados por meio de PCR de cultura para verificar o sucesso da transformação (Figura 2). Após esta etapa, os mesmos 96 clones foram duplamente sequenciados (*primer T7 promoter* para *forward*, e *primer SP6*, para *reverse*). Quando ambas as sequências de cada clone apresentaram tamanho suficiente, foi originada uma sequência consenso entre as duas. Em casos que não foi possível gerar o consenso, as sequências *forward* e *reverse* foram utilizadas separadamente para verificar a presença de regiões microssatélites. Exemplos de *loci* microssatélites identificados estão na figura 3.

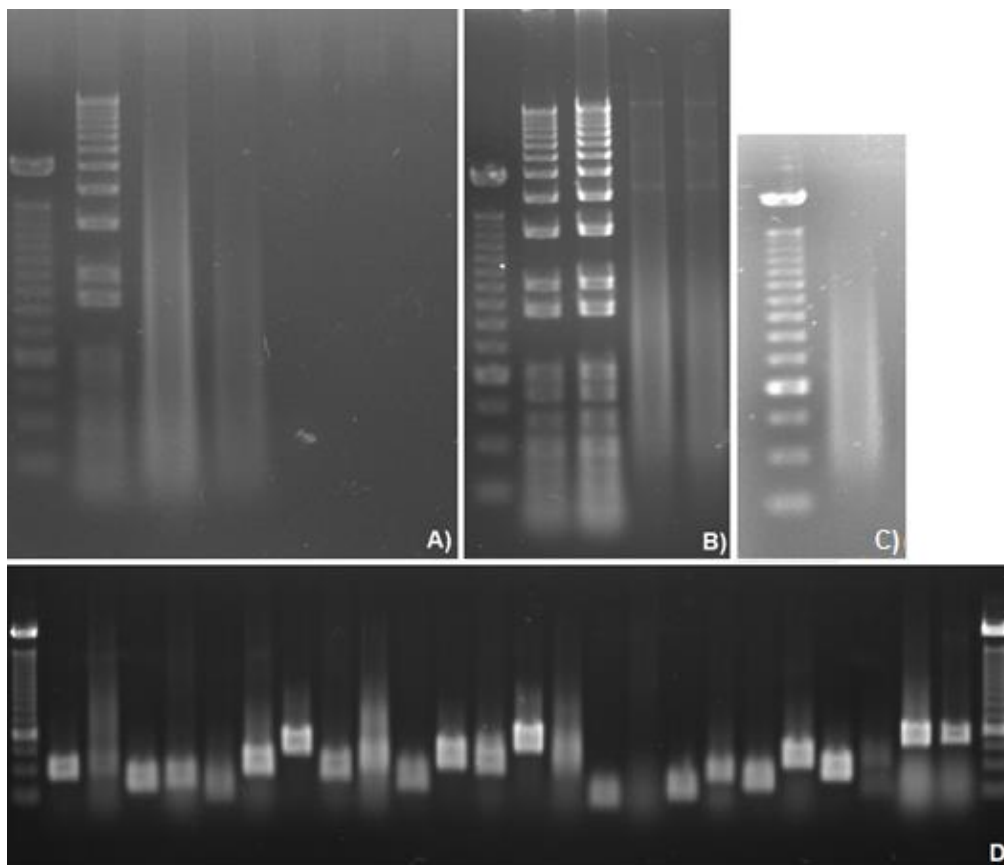


Figura 2. Etapas da construção da biblioteca enriquecida em SSRs para *A. lacustris*. **A)** Digestão de diferentes alíquotas de DNA genômico (gel 1% TAE 1X, 70V por 1:30min; *ladders* 250 bp e 1Kb). **B)** Pre-amplificação dos fragmentos digeridos (gel 1% TAE 1X, 110V por 1:50min; *ladders* 250 bp e 1Kb). **C)** Amplificação dos fragmentos após enriquecimento (gel 1% TAE 1X, 70V por 1:40min; *ladder* 250 bp). **D)** Amplificação dos insertos, respectivos aos primeiros 24 clones (gel 1% TAE 1X, 100V por 45min; *ladder* 250 bp).

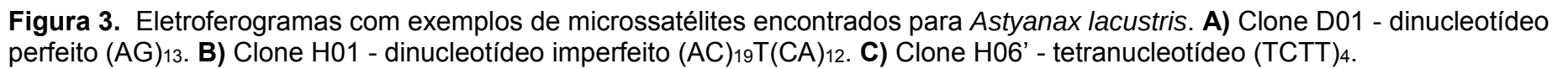


Figura 3. Eletroferogramas com exemplos de microssatélites encontrados para *Astyanax lacustris*. **A)** Clone D01 - dinucleotídeo perfeito (AG)₁₃. **B)** Clone H01 - dinucleotídeo imperfeito (AC)₁₉T(CA)₁₂. **C)** Clone H06' - tetranucleotídeo (TCTT)₄.

Dentre os clones foram identificados 43 microssatélites, sendo 37 dinucleotídeos e 6 tetranucleotídeos. Após verificação das posições de início e fim de cada SSR, alguns *loci* adjacentes foram considerados como um único *locus*, originando microssatélites denominados interrompidos, quando uma sequência de bases está entre inserida entre os motivos, ou imperfeitos, quando apenas uma base não correspondente está inserida entre o motivos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Isto ocorreu para os clones D01 (motivo GT), clone H01 (motivo AC), clone D03 (motivo AG) e clone C06 (motivo AC) (Tabela 1).

Tabela 1. Microssatélites presentes nas sequências únicas ou consensos originados a partir dos 96 clones sequenciados.

Nome da sequência	Motivo	No. de Repetições	Início do SSR	Fim do SSR	Tamanho da sequência
SSR (clone C01)	CA	32	111	174	210
SSR (clone D01)	AG	13	266	291	464
SSR (clone D01)	GT	17	422	456	464
SSR (clone H01)	AC	31	284	346	514
SSR (clone A02)	AC	10	168	187	302
SSR (clone D03)	GA	29	42	100	293
SSR (clone E03)	CA	25	375	424	508
SSR (clone G03)	GT	20	700	739	739
SSR (clone cons. A04eA10)	CA	8	115	130	712
SSR (clone cons. A04eA10)	AG	7	595	608	712
SSR (clone B04)	AC	25	301	350	401
SSR (clone cons. C04eC10)	TAGA	33	296	427	733
SSR (clone G04)	GT	22	395	438	439
SSR (clone A05)	AC	26	110	161	409
SSR (clone A05)	TG	8	240	255	409
SSR (clone A05)	AC	7	379	392	409

SSR (clone cons. B05eB11)	GA	19	41	78	287
SSR (clone cons. B05eB11)	CA	12	150	173	287
SSR (clone C05)	TG	11	256	277	352
SSR (clone cons. F05eF11)	CA	19	12	49	420
SSR (clone cons. F05eF11)	CT	12	217	240	420
SSR (clone cons. F05eF11)	ATTG	3	383	394	420
SSR (clone cons. B06eB12)	GAGG	3	158	169	457
SSR (clone C06)	CA	66	199	333	344
SSR (clone cons. A01eA07')	AAAC	3	305	316	742
SSR (clone cons. G01eG07')	TG	22	510	553	800
SSR (clone D09')	TG	9	453	470	564
SSR (clone D09')	TG	10	489	508	564
SSR (clone D09')	TG	10	515	534	564
SSR (clone G09')	AC	19	167	204	399
SSR (clone A04')	AC	7	392	405	412
SSR (clone cons. B04eB10')	CT	16	350	381	553
SSR (clone cons. D04eD10')	AG	8	927	942	1084
SSR (clone cons. D04eD10')	CAAA	3	317	328	1084
SSR (clone cons. F04eF10')	AG	17	236	269	584

SSR (clone cons. G04eG10')	AC	9	189	206	1001
SSR (clone A05')	AC	7	392	405	412
SSR (clone E11')	CT	14	445	472	472
SSR (clone F05')	AC	36	293	364	461
SSR (clone G05')	AC	16	348	379	499
SSR (clone G05')	AC	10	419	438	499
SSR (clone A06')	AC	10	532	551	816
SSR (clone A06')	TCTT	4	622	637	816

Setenta e três por cento dos 37 microsatélites com motivos dinucleotídeos apresentaram 10 ou mais repetições (Figura 4). O número de repetições entre eles variou de 7 a 66, com uma média de 17 repetições. Analisando apenas os motivos (AC/TG), a média de repetições foi de 18. Para os motivos (AG/TC), observou-se a média de 13. Sessenta quatro por cento de todos os SSRs são dinucleotídeos com motivo (AC/TG) e 21% são dinucleotídeos com motivo (AG/TC). Trinucleotídeos não foram identificados. Microsatélites com motivos tetranucleotídeos representaram aproximadamente 15% do total (Figura 5). Entre eles, 4 *loci* apresentaram 3 repetições, 1 apresentou 4 repetições e 1 apresentou 33 repetições.

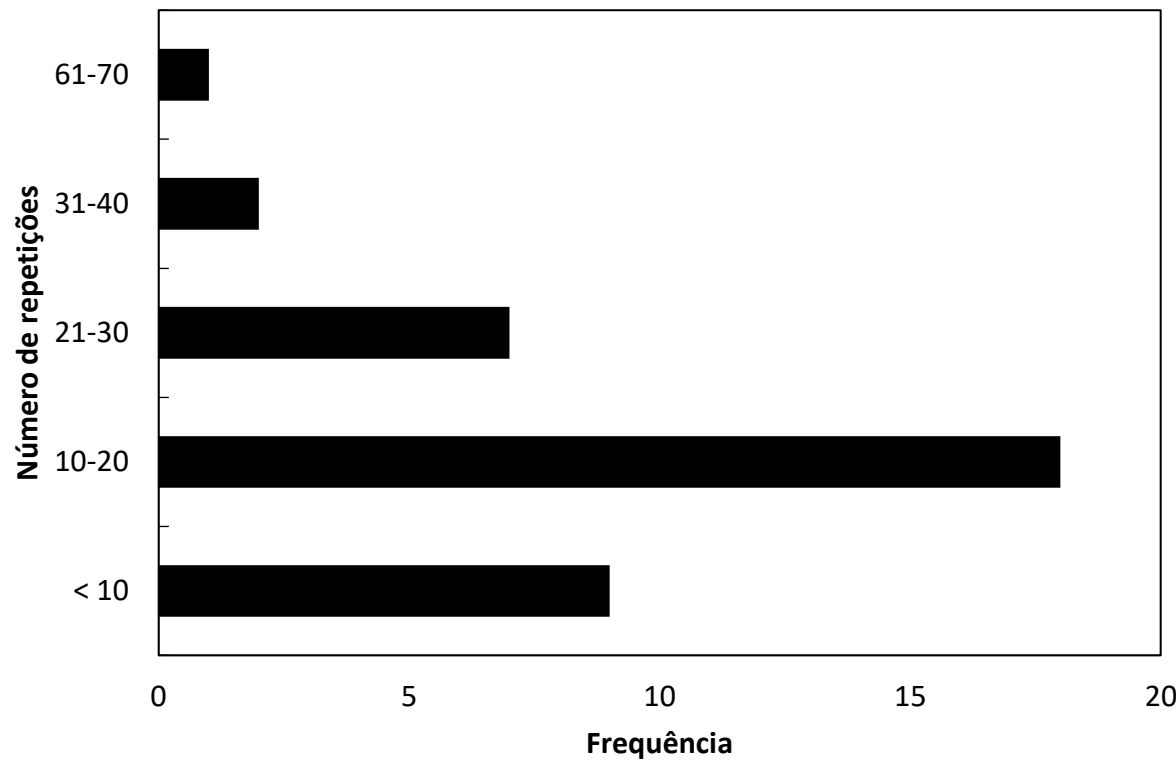


Figura 4. Faixas de distribuição dos tamanhos (em número de repetições) dos Microsatélites com motivos dinucleotídeos encontrados para *A. lacustris*.

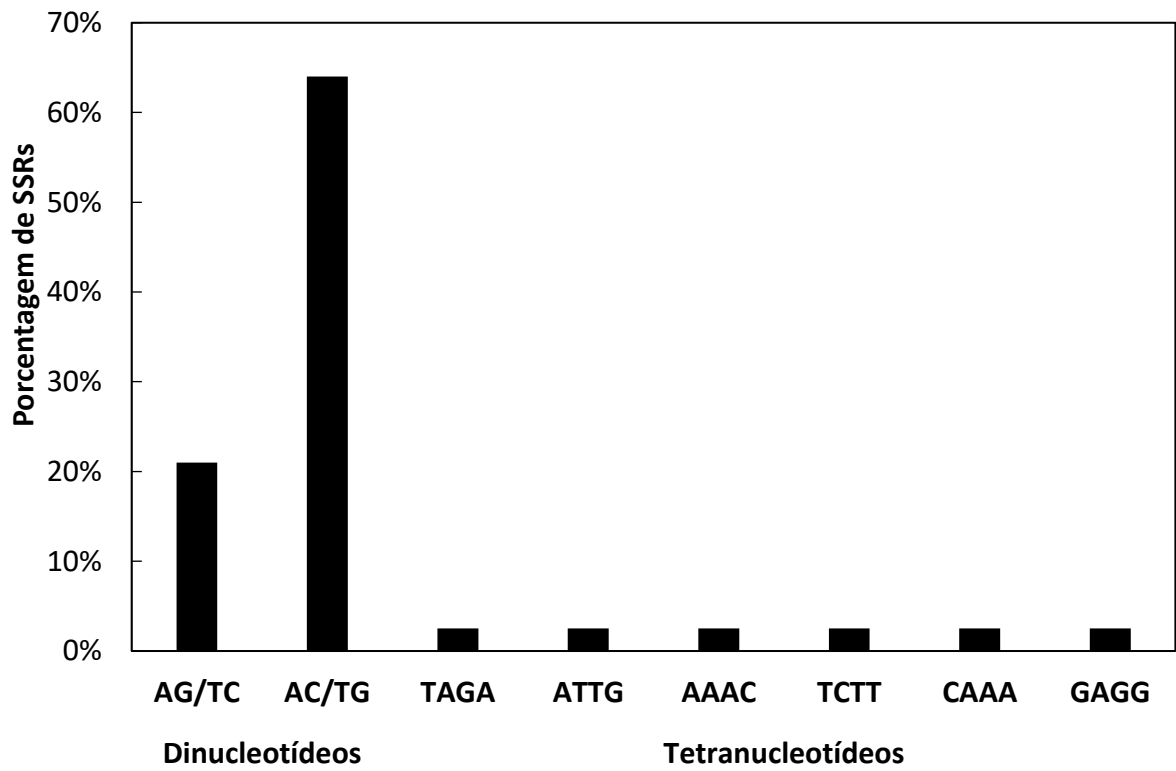


Figura 5. Porcentagens dos motivos dos 43 microsatélites encontrados para *A. lacustris*.

Para a síntese dos *primers*, os microssatélites foram selecionados segundo critérios estabelecidos. Os microssatélites foram escolhidos quanto ao tamanho do produto e quanto à presença de sítio de restrição da enzima *Afa I*. Foi preferível a síntese de *primers* para microssatélites dinucleotídeos. Pela comparação dos indivíduos de *A. lacustris* com as informações genéticas das espécies depositadas no GenBank/NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), foram preferíveis os microssatélites que apresentaram similaridade com alguma espécie de peixe entre os primeiros cinco *hits* do BLAST e com *e-value* inferior a $10e-6$.

Foram desenhados 23 pares de *primers* nas regiões flangeadores dos *loci* microssatélites selecionados (Tabela 2). Dezenove microssatélites com motivos dinucleotídeos e 4 microssatélites tetranucleotídeos satisfizeram os critérios estabelecidos acima e foram escolhidos para síntese dos *primers*. Do total obtido, 5 *loci* selecionados possuem microssatélites imperfeitos sendo: *Ast_lac_ssr03* (AC)₁₉T(CA)₁₂, *Ast_lac_ssr05* (GA)₁₃A(AG)₁₆, *Ast_lac_ssr14* (TG)₂₂C(GT)₄, *Ast_lac_ssr15* (CA)₁₉T(AC)₄, e *Ast_lac_ssr22* (CA)₄T(AC)₁₀. Três *loci* apresentam microssatélites interrompidos sendo: *Ast_lac_ssr08* (AC)₂₆N_N(CA)₁₂, *Ast_lac_ssr12* (CA)₁₀AATA(AC)₅₆ e *Ast_lac_ssr21* (AC)₁₆N₄₀(AC)₁₀.

O DNA genômico de 16 indivíduos de *A. lacustris* foi extraído utilizando, também, o protocolo *salting out*. Os *loci* foram amplificados utilizando reações de polimerase em cadeia (PCR) seguindo o protocolo 'Touchdown' PCR (DON et al., 1991). Após esta etapa foram, realizados géis de agarose 3% para observar a utilidade de aplicação dos *loci* como marcadores moleculares. Após amplificação de todos os 23 *loci*, observou-se o padrão não desejado de mais de uma banda de DNA, o que indica a presença de regiões que não correspondentes à região alvo contendo os SSRs (Figura 6). Desta maneira, os resultados indicaram que ainda seriam necessárias otimizações antes de seu uso eficaz.

Para testes posteriores, os *loci* *Ast_lac_ssr02*, *Ast_lac_ssr11*, *Ast_lac_ssr13*, *Ast_lac_ssr22* e *Ast_lac_ssr23* foram selecionados. No primeiro teste, foi utilizada a enzima *Taq* polimerase de produção caseira e no teste apenas com os 5 *loci* acima mencionados, a enzima foi substituída por uma alíquota de comercial. O resultado foram amplificações específicas, com os tamanhos de produto esperados, evidenciando a superação desta dificuldade. É possível notar a diferença entre a amplificação do *locus* *Ast_lac_ssr02*, usado como experimento controle, utilizando

Taq polimerase caseira (à esquerda do *ladder*) e *Taq* polimerase comercial (à direita do *ladder*) na parte superior da figura 7.

As próximas etapas serão a re-amplificação dos 18 *loci* restantes e a quantificação do polimorfismos por meio da genotipagem dos marcadores em géis de acrilamida.

Tabela 2. Características dos *loci* microssatélites desenvolvidos para *Astyanax lacustris*.

Nome	Sequência F 5'-> 3'	Sequência R 5'-> 3'	Tamanho do produto	SSR
<i>Ast_lac_ssr01</i>	ATAGTAACCGTGTGCCGTGTC	CCAATAGCTCATCACAGACAGC	160	(CA) ₃₂
<i>Ast_lac_ssr02</i>	GCAGCAGCTTCTCCAGGTAT	TTTGCCACAGTGTTGTTGT	182	(AG) ₁₃
<i>Ast_lac_ssr03</i>	GGGAGTGGAAGAAGCAGTCA	GTGGACTTGAACAAAGGACGA	211	(AC) ₁₉ T(CA) ₁₂
<i>Ast_lac_ssr04</i>	TGCCTCAATTTTGCTCTTGA	CCTGTGGTGGCTGTATGTGT	156	(AC) ₁₀
<i>Ast_lac_ssr05</i>	GTGTGTCACAGATGACAGTGGA	CACCGACTCTCCGTCTCTCT	168	(GA) ₁₃ A(AG) ₁₆
<i>Ast_lac_ssr06</i>	CTCACTGTCCTCCACTGCTG	CTGGCCAAACACTGGCTAAT	135	(AC) ₂₅
<i>Ast_lac_ssr07</i>	CGATTTTGGGGAATAAACA	TGCAACATCACTTGTGTCCA	286	(TAGA) ₃₃
<i>Ast_lac_ssr08</i>	TTTTCTCATGACTGCTCCA	GAGACGGTGTGTGATGTGGT	186	(AC) ₂₆ N _N (CA) ₁₂
<i>Ast_lac_ssr09</i>	TACATCAGCAGCCGGAGTC	AAACGGCTTCACCTGTCACT	250	(GA) ₁₉
<i>Ast_lac_ssr10</i>	TCCAGCTGCTGTTAGTGGTG	CCAGATTCCCCAGTTTAGCA	202	(CT) ₁₂
<i>Ast_lac_ssr11</i>	GCTCTACTGGTCTTCATCAC	GATAGACAGATAACCCTACAAC	156	(ATTG) ₃
<i>Ast_lac_ssr12</i>	GATGCAGCAATTCTACAAGG	CTCACGTAAATGTGTGTGTGT	220	(CA) ₁₀ AATA(AC) ₅₆
<i>Ast_lac_ssr13</i>	CCTCCACAGCAAAACAATCA	TTGTTTGCCACGTATTTCCA	232	(AAAC) ₃
<i>Ast_lac_ssr14</i>	TGGTTTATGGTTGCAAGGTG	AGGAGGTGGAGGAGAAGAGC	208	(TG) ₂₂ C(GT) ₄
<i>Ast_lac_ssr15</i>	TGTAGGTTGTTGGGAGGACA	TCCAAAGGTTTCCATAGTGTC	240	(CA) ₁₉ T(AC) ₄
<i>Ast_lac_ssr16</i>	TGTGAGTGCGTTTGTGTGAG	TGTAGTGGTCCCAGGCTTTC	219	(CT) ₁₆
<i>Ast_lac_ssr17</i>	CAGGGAAAGAGAGTAGGAAACA	TGTCTGAAACAACAGCACACA	143	(AG) ₈
<i>Ast_lac_ssr18</i>	CCATGCTGCGTCAGTTTAGA	CATTCGCTCTCACCTTCTCC	140	(AG) ₁₇

<i>Ast_lac_ssr19</i>	TCCATGGTTGCATTAGTAGGC	TTTGAGTGACCTTGGCAGTG	149	(AC) ₉
<i>Ast_lac_ssr20</i>	CAATAAAAATGCCTGCCTCA	GATGTGCGATGGATATGATTG	233	(AC) ₃₆
<i>Ast_lac_ssr21</i>	CCGTCGTTGATTCCTCTGTT	GCGATGGTGAAAAGTGTGTG	239	(AC) ₁₆ N ₄₀ (AC) ₁₀
<i>Ast_lac_ssr22</i>	GCAATGCTGAGAGCCTGAAT	AGGAGGACAAGAGGGTTGGT	122	(CA) ₄ T(AC) ₁₀
<i>Ast_lac_ssr23</i>	GACGCAGGGAGGAATACAAC	GCACTCTGTTTGGGACCAGT	142	(TCTT) ₄

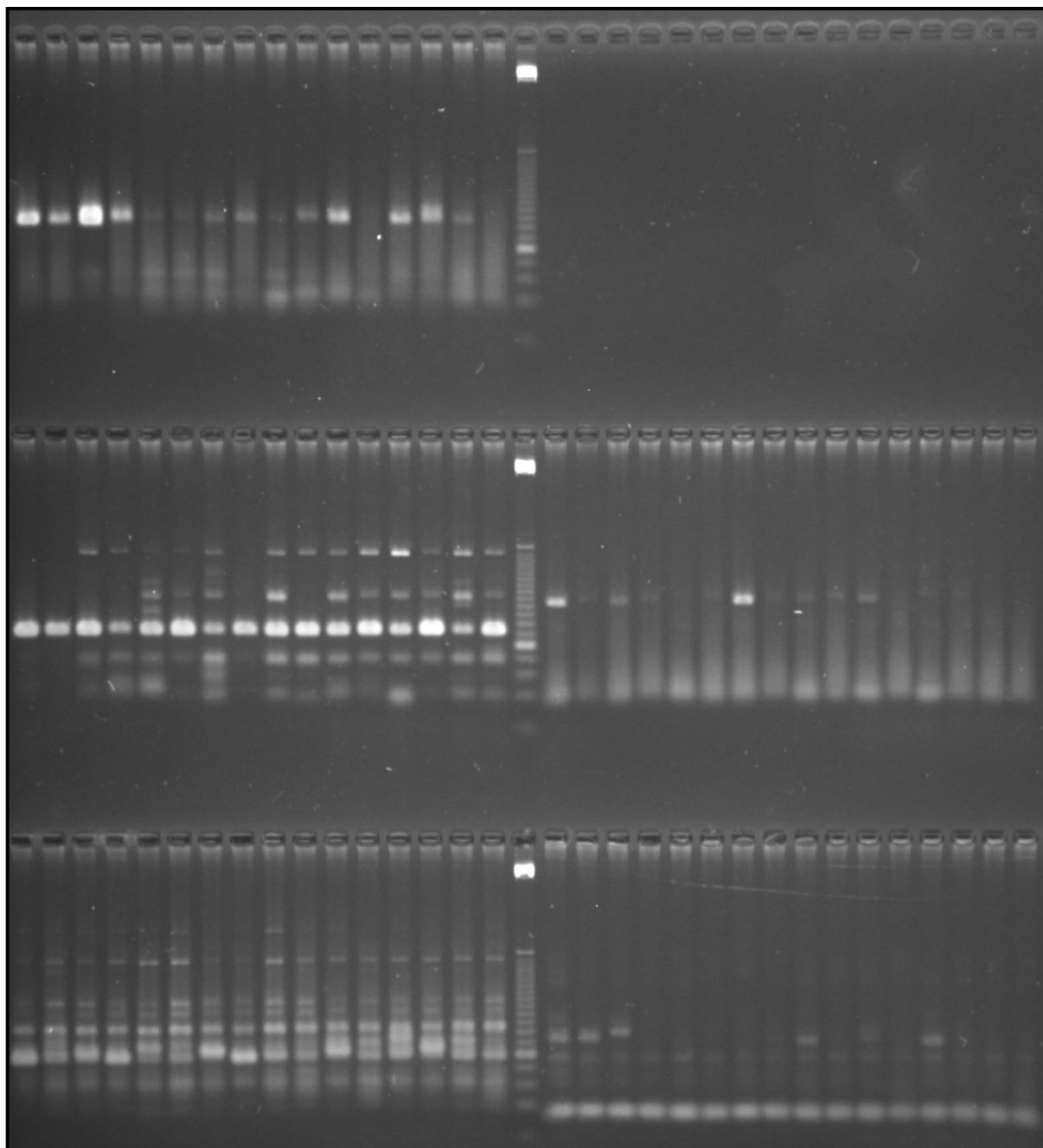


Figura 6. Primeira avaliação das amplificações de 5 marcadores SSR de *Astyanax lacustris*. Loci: superior esquerda - *Ast_lac_ssr02*, centro esquerda - *Ast_lac_ssr11*, centro direita - *Ast_lac_ssr13*, inferior esquerda - *Ast_lac_ssr22*, inferior direita - *Ast_lac_ssr23*. Gel 3% TBE 0,5X, 170V por 1 hora; ladder 25 bp.

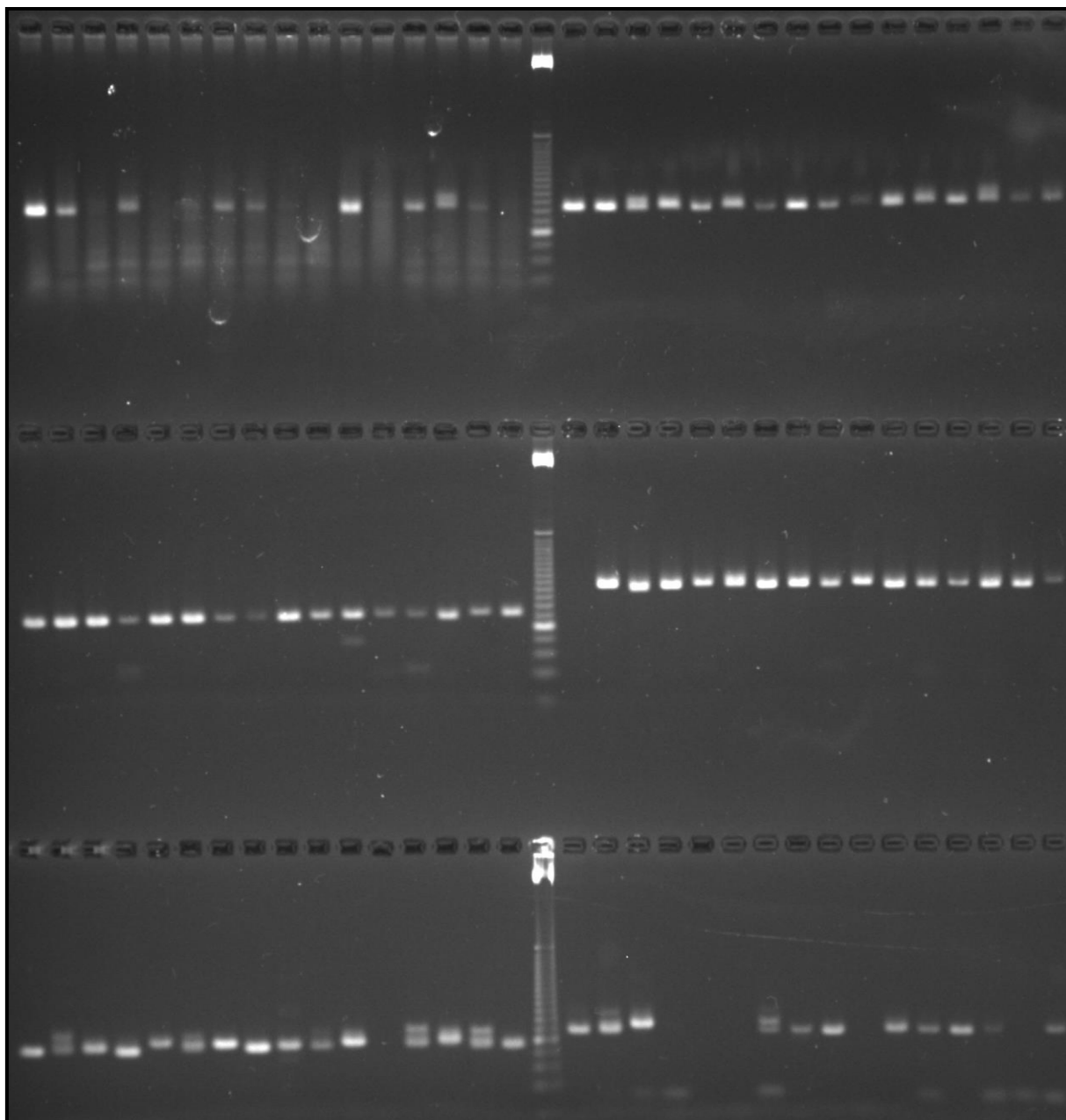


Figura 7. Segunda avaliação das amplificações de 5 marcadores SSR de *Astyanax lacustris*. Loci: superior esquerda [controle] - *Ast_lac_ssr02* com reagentes do primeiro teste, superior direita - *Ast_lac_ssr02* com novos reagentes, centro esquerda - *Ast_lac_ssr11*, centro direita - *Ast_lac_ssr13*, inferior esquerda - *Ast_lac_ssr22*, inferior direita - *Ast_lac_ssr23*). Gel 3% TBE 0,5X, 170V por 1 hora; ladder 25 bp. Gel 3% TBE 0,5X, 170V por 1 hora; ladder 25 bp.

5.DISCUSSÃO

Microsatélites dinucleotídeos são os mais frequentes no genoma da maioria dos organismos, principalmente em vertebrados e dentre as 4 possibilidades de SSRs dinucleotídeos os de motivo (AC) são os mais frequentes em genomas animais (WANG *et al.*, 1994; TOTH, 2000). As espécies de peixes, como *Fugu rubripes* e *Leporinus obtusidens*, apresentam SSRs dinucleotídeos (34% e 62%, respectivamente) mais frequentes, seguidos por tetranucleotídeos (21% e 15%, respectivamente; EDWARDS *et al.*, 1998; VILLANOVA *et al.*, 2015). Os microsatélites mais abundantes em *A. lacustris* foram os dinucleotídeos correspondendo a 85% correspondendo ao esperado para a frequência de motivos de microsatélites em espécies de peixes.

Os motivos mais frequentemente encontrados foram (AC/TG), com 64% e (AG/TC) com 21%. Esta alta porcentagem de SSRs contendo motivos (AC) corrobora com demais espécies de peixes que tiveram este mesmo tipo de marcador isolado. Por exemplo, 62% de SSRs dinucleotídeos de motivo (AC/TG) e 30% (AG/TC) foram descritos para a espécie de peixe *L. obtusidens* (VILLANOVA *et al.*, 2015). Em algumas espécies, a frequência do motivo (AC/TG) passa dos 90%, como no caso da espécie de tilápia *Oreochromis niloticus*, que apresenta frequência de 96% deste motivo (CARLETON *et al.*, 2002).

Quarenta e quatro por cento de todos os microsatélites apresentarem motivo (AC)_N e 11,5% (AG)_N, totalizando mais da metade de todos os SSRs encontrados. Esta maior frequência de dinucleotídeos e de motivos (AC)_N e (AG)_N condiz com o método de enriquecimento de microsatélites pela hibridização das sondas (TG)_N e sondas (TC)_N (BILLOTTE *et al.*, 1999). Outras espécies de animais que tiveram marcadores microsatélites caracterizados e isolados pelo mesmo método de enriquecimento apresentaram, também, maior frequência de dinucleotídeos e de motivos (AC)_N e (AG)_N, como *Drosophila mediopunctata*, *Siniperca scherzeri* e *Passer domesticus* (GARNIER *et al.*, 2008; LABORDA *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2012).

Levando em consideração apenas os SSRs com motivo mais abundante, (AC/TG), a média do número de repetições encontrados condiz com os demais resultados presentes na bibliografia. *A. lacustris* apresentou a média de 18 repetições, caracterizando como microsatélites grandes em comparação a outras

espécies de animais, como insetos *Apis mellifera* (média de repetições = 12) e *Drosophila melanogaster* (média de repetições = 10) ou mamíferos *Cannis familiaris* (média de repetições = 15) e *Homo sapiens* (média de repetições = 13) (SCHUG et al., 1998). Os resultados encontrados aproximaram-se em comparação a outras espécies de peixes como *Oncorhynchus mykiss* (média de repetições = 26), *O. nerka* (média de repetições = 24), *Salmo salar* (média de repetições = 11), *Gadus morhua* (média de repetições = 30) e *Dicentrarchus labrax* (média de repetições = 26). Além disso, o maior microssatélite encontrado para *A. lacustris* apresentou 66 repetições, próximo do maior SSR encontrado para *O. mykiss* (>60 repetições), *O. nerka* (54 repetições), *G. morhua* (>60 repetições) e *D. labrax* (52 repetições; BROOKER et al., 1996; ESTOUP et al., 1993; GARCIA de LEON et al., 1995; SCRIBNER et al., 1996; SLETTAN et al., 1993).

Duas espécies do gênero *Astyanax*, *A. altiparanae* e *A. fasciatus*, também possuem marcadores microssatélites isolados e caracterizados. Ambas as espécies apresentaram alta frequência de SSRs dinucleotídeos de motivo AC/TG assim como *A. lacustris*. Foram desenvolvidos 18 *primers* para *A. fasciatus* e 25 para *A. altiparanae* e posterior análise demonstrou que 4 e 11 *loci*, respectivamente, apresentaram alto polimorfismo (ZAGANINI et al., 2012; STRECKER, 2003). Os dados sobre as duas espécies deste gênero assemelham-se ao encontrado para *A. lacustris*, tanto na quantidade e tipo de motivo, quanto na quantidade de marcadores obtidos.

Como *A. lacustris* ainda não possui genoma sequenciado, não é possível saber a distribuição genômica exata dos marcadores isolados para a espécie. Para estimar essa distribuição, foi feita uma comparação entre as sequências dos marcadores com as sequências da espécie de lambari *Astyanax mexicanus*, única cujo número básico de cromossomos é semelhante ao de *A. lacustris* e cujo genoma está disponível para comparação no banco de dados do NCBI. Esta análise foi conduzida assumindo a hipótese de sintonia entre *A. lacustris* e *A. mexicanus*. O único intuito foi especular sobre o grau de dispersão dos marcadores isolados. O gênero apresenta grande variação no número diploide entre espécies como $2n = 36$ cromossomos em *A. schubarti* e *A. correntinus*, $2n = 48$ ou $2n = 46$ em *A. fasciatus* (TENORIO et al., 2013; PAZZA et al., 2006). Porém, as espécies *A. mexicanus* e *A. lacustris* apresentam o mesmo número cromossômico, $2n = 50$ (TEIXEIRA et al., 2018; KALVACO & ALMEIDA-TOLEDO, 2007). Treze dos 23 *loci*, apresentaram

sequências similares a *A. mexicanus*. A média de similaridade entre sequências de *A. mexicanus* e *A. lacustris* foi de 93,5%, apresentando confiabilidade na semelhança entre as sequências entre espécies. Todas as sequências dos SSRs estavam presentes em regiões expressas do genoma de *A. mexicanus*. Os 13 primers marcadores identificados nesta análise estão distribuídos em 7 diferentes cromossomos: 3, 7, 9, 18, 20, 21 e 24. É importante ressaltar que esta análise é meramente especulativa, mas indica que a dispersão dos marcadores é aleatória. Este é um aspecto relevante para análises populacionais futuras, onde há a premissa de equilíbrio de ligação entre os marcadores usados para estimativas de diversidade genética.

O último teste de amplificação dos primers *Ast_lac_ssr02*, *Ast_lac_ssr11*, *Ast_lac_ssr13*, *Ast_lac_ssr22* e *Ast_lac_ssr23* indicou, pelo perfil de amplificação desejada, que a dificuldade em otimização foi superada e não deverá haver outros problemas com os demais *loci*. Dessa forma, o desenho e a síntese dos primers foram realizados de forma adequada para a espécie *A. lacustris*. Apesar de que os 16 indivíduos de *A. lacustris* utilizados no teste de amplificação não terem sido genotipados, é possível notar o polimorfismo destes locos pela diferença no tamanho das bandas. Portanto, já é possível adiantar que os marcadores desenvolvidos são informativos e poderão ser aplicados em posteriores análises sobre diversidade genética populacional da espécie *A. lacustris*.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, Luciano D. S. *et al.* Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.3, p.448-452, 2006.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4692-4693, 1997.
- ANGERS, B.; BERNATCHEZ, L. Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 3, p.230-238, 1997.
- BILLOTTE, Norbet *et al.* Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v.54, p.277-288, 1999.
- BRADIC, M. *et al.* Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). **Bmc Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, p.1-17, 2012.
- BRITSKI, H. A. Peixes do Pantanal: Manual de Identificação. **Embrapa**. 2. ed. 2007.
- BROOKER, A. L.; COOK, D.; BENTZEN, P.; WRIGHT, J. M.; DOYLE, R. W. Organization of Microsatellites Differs between Mammals and Cold-water Teleost Fishes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 51 n. 9, p. 1959–1966 1994.
- BORIS, B. *et al.*, Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using Microsatellite genetic Markers. **Revista MVZ Cordoba**, v.16, n.2 p. 2491-2498, 2011.
- CARLETON, K. L. *et al.* Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. **Animal Genetics**, v. 33, n. 2, p.140-144, 2002.
- COSTA-PEREIRA, Raul *et al.* Functional morphology of the tetra fish *Astyanax lacustris* differs between divergent habitats in the Pantanal wetlands. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 2, p.1450-1458, 2016.
- DESVIGNES, J. F. *et al.* Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. **Aquaculture**, v. 194, n. 3-4, p.291-301, 2001.
- DON, R. H. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 14, p. 4008, 1991.
- EDWARDS, Y. J. K. *et al.* The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in

- functional and comparative genomic analyses. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, n. 4, p.843-854, 1998.
- ESTOUP, A.; PRESA, P.; KRIEG F.; VAIMAN, D. GUYOMARD, R. (CT) and (GT) microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). **Heredity**, v. 71, p. 488 - 496, 1993.
- GARCIA de LEON F. J; DALLAS J. F.; CHATAIN B.; CANONNE, M.; VERSINI, J. J.; BONHOMME, F. Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Serranidae). **Molecular Marine Biology and Technology**, v. 4, p. 62–68, 1995.
- GARNIER, S.; DURAND, P.; ARNATHAU, C.; RISTERUCCI, A. M.; ESPARZA-SALAS, R.; CELLIER-HOLZEM, E.; SORCI, G. New polymorphic microsatellite loci in the house sparrow, *Passer domesticus*. **Molecular Ecology Resources**, v. 9 n. 3, p. 1063–1065, 2009.
- HECKMAN, C. W. The Pantanal of Poconé: Biota and Ecology in the Northern Section of the World's Largest Pristine Wetland. **Springer Science & Business Media**, 1998.
- JIANG, G. Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. **Plant Breeding from Laboratories to Fields**, p.46-83, 2013.
- JUNK, W.J.; da CUNHA, C.N.; WANTZEN, K.M.; PETERMAN, P.; STRUSSMANN, C.; MARQUES, M. I.; ADIS, J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, **Aquatic Sciences**, v. 68, p. 278-309, 2006.
- JUNK, W.J.; WANTZEN, K.M.; da CUNHA, C.; da SILVA, C.J. The Pantanal: Ecology, Biodiversity and Sustainable Management of a Large Neotropical Seasonal Wetland. **Sofia: Pensoft**, 2011.
- KAVALCO, K. F. *et al.* Satellite DNA sites in four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.3, p. 529-535, 2007.
- KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. de. Molecular Cytogenetics of Blind Mexican Tetra and Comments on the Karyotypic Characteristics of Genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, v. 4, n. 2, p.103-111, 2007.
- LABORDA, Prianda R. *et al.* *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. **Conservation Genetics Resources**, v. 1, n. 1, p.297-307, 2009.
- LANGERHANS, R.B.; LAYMAN, C.A.; SHOKROLLAHI, A.M.; DEWITT, T.J. Predator-driven phenotypic diversification in *Gambusia affinis*. **Evolution**, v. 58, p. 2305-2318, 2004.
- LANGERHANS, R.B.; REZNICK, D.N. Ecology and evolution of swimming performance in fishes: predicting evolution with biomechanics. **In Fish**

locomotion: an etho-ecologicalperspective (P. Domenici & B.G. Kapoor,eds), p. 200-248, 2009.

- LANGERHANS, B. R.; REZNICK, D. N. Ecology and evolution of swimming performance in fishes: predicting evolution with biomechanics. **Fish locomotion: an eco-ethological perspective**. Science Publishers. p. 200–248, 2010.
- LI, You-chun *et al.* Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p.2453-2465, 2002.
- LUCENA, C. A. S. de; SOARES, H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* "caudal peduncle spot" subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southernBrazil and Uruguay. **Zootaxa** v. 4072, p. 101–125, 2016.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294-307, 2006.
- PANARAM, K.; BOROWSKY, R. Gene Flow and Genetic Variability in Cave and Surface Populations of the Mexican Tetra, *Astyanax mexicanus* (Teleostei: Characidae). **Copeia**, v. 2005, n. 2, p.409-416, 2005.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, n. 3-4, p. 313-319, 2006.
- PROTAS, M. *et al.*, Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. **Nature Genetics**, v. 38, n. 1, p.107-111, 2005.
- ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**. v. 8 p.103-106, 2008.
- SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**. v. 109, p. 365-371, 2000.
- SCHUG, M. D.; WETTERSTRAND, K. A.; GAUDETTE, M. S.; LIM, R. H.; HUTTER, C. M.; AQUADRO, C. F. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 1, p. 57–70, 1998.
- SCRIBNER, K. T.; GUST, J. R.; FIELDS, R. L. Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 53 n. 4, p. 833–841, 1996.

- SELKOE, Kimberly A.; TOONEN, Robert J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters** v. 9, n. 5, p.615-629, 2006.
- SEKINO M, HARA M.; TANIGUCHI N. Genetic diversity within and between hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* assessed by means of microsatellite and mitochondrial DNA sequencing analysis. **Aquaculture** v.213, p.101-122, 2002.
- SILVA, H. Pains da *et al.* Fish communities of the Pantanal wetland in Brazil: evaluating the effects of the upper Paraguay river flood pulse on baía Caiçara fish fauna. **Aquatic Ecology**, v. 44, n. 1, p.275-288, 2010.
- SLETTAN, A.; OLSAKER, I.; LIE, Ø. Isolation and characterization of variable (GT)_n repetitive sequences from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Animal Genetics**, v. 24, n. 3, p. 195–197, 2009.
- STRECKER, U. Polymorphic microsatellites isolated from the cave fish *Astyanax fasciatus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 1, p.150-151, 2003.
- STRECKER, U.; BERNATCHEZ, L.; WILKENS, H. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). **Molecular Ecology**, v. 12, n. 3, p.699-710, 2003.
- SUNNUCKS, P. *et al.* Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic *Sitobion aphids* in Australia. **Genetics**, v. 144, p.747-756. 1996.
- TEIXEIRA, T. K. S. S. *et al.* Comparative cytogenetics of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from the upper Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 1, p.170091-170092, 2018.
- TENORIO, R. C. C. O.; VITORINO, C. A.; SOUZA, I. L.; OLIVEIRA, C.; VENERE, P. C. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes:Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. **Neotropical Ichthyology**. v. 11, n. 3, p. 553-64, 2013.
- TEMNYKH, S. *et al.* Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Research**, v. 11, p. 1441-1452, 2001.
- TOKIC, G.; YUE, D.K. Optimal shape and motion of undulatory swimming organisms. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 279, p. 3065-3074, 2012.
- TOTH, G. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. **Genome Research**, v. 10, n. 7, p.967-981, 2000.
- UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v.40 p.115, 2012.

- VANHAECKE, D. et al. DNA Barcoding and Microsatellites Help Species Delimitation and Hybrid Identification in Endangered Galaxiid Fishes. **Plos One**, v. 7, n. 3, p.32939, 2012.
- VILLANOVA, G. V. et al. Isolation and characterization of 20 polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Leporinus obtusidens* (Characiformes: Anostomidae) using 454 shotgun pyrosequencing. **Journal of Fish Biology**, v. 86, n. 3, p.1209-1217, 2015.
- VICARI, M. R. et al. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p.1094-1116, 2010.
- WANG Z.; WEBER J.L.; ZHONG G.; TANKSLEY S. D. Survey of plantshort tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 1-6, 1994.
- YANG, M.; LIANG, X.-F.; TIAN, C.; GUL, Y.; DOU, Y.; CAO, L.; YU, R. Isolation and characterization of fifteen novel microsatellite loci in golden mandarin fish (*Siniperca scherzeri*) Steindachne. **Conservation Genetics Resources**, n. 4 v. 3, p. 599–601, 2012.
- YI, T.I. et al. Microsatellite analysis of genetic diversity and genetic structure in five consecutive breeding generations of mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 2600-2607, 2015.
- ZAGANINI, R. L.; HASHIMOTO, D. T.; PEREIRA, L. H. G.; OLIVEIRA, C.; MENDONÇA, F. F.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. **Journal of Genetics**, v. 93, p. 24–27, 2012.