

AVALIAÇÃO DE MARCADORES RAPD PARA ANÁLISES DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hoplias malabaricus*

RAPD MARKERS ASSESSMENT FOR GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN *Hoplias malabaricus*

Beatriz Faustino Lima¹, Alan Gomes Mendonça², Rafael Maurício Rugeles Gusman³, Dayana Tamiris dos Santos-Catâneo⁴, Carolina Rodrigues da Costa Dória⁵, Rubiani de Cassia Pagotto⁶

1. Acadêmica do curso de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Molecular "Prof.Dr.Bernardo Beiguelman", Universidade Federal de Rondônia. beatrizfaustinolima04@gmail.com
2. Mestrando em Gestão e Regulação de Recurso Hídrico – Prof.Água, Laboratório de Limnologia e Microbiologia, Universidade Federal de Rondônia. agm.engambiental@gmail.com
3. Bacharel em Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Molecular "Prof.Dr.Bernardo Beiguelman", Universidade Federal de Rondônia rafaelmauricio6@hotmail.com
4. Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Laboratório de Ictiologia e Pesca, Universidade Federal de Rondônia daybritto65@gmail.com
5. Doutora em Desenvolvimento Sustentável do Trópico Úmido, Docente da Universidade Federal de Rondônia, Laboratório de Ictiologia e Pesca. carolinarcdoria@unir.br
6. Doutora em Ciências Biológicas, Docente da Universidade Federal de Rondônia, Laboratório de Genética Molecular "Prof.Dr.Bernardo Beiguelman". rubiani@unir.br

*Autor correspondente: beatrizfaustinolima04@gmail.com

RESUMO

Trabalhos recentes sugerem que a espécie *Hoplias malabaricus*, da família Erythrinidae seja um complexo de espécies. Assim, objetivou-se investigar a viabilidade do uso de marcadores RAPD-PCR na determinação da variabilidade genética de *H. malabaricus* em três igarapés da bacia do rio Madeira. Foram coletados 15 espécimes de 3 igarapés diferentes da bacia, cujos DNA genômico foram amplificados utilizando 12 sequências RAPD, das quais foram determinadas a porcentagem de polimorfismo, similaridade e distância genética entre os espécimes, bem como os valores de PIC e Heterozigosidade. Foi possível observar um alto grau de polimorfismo (95% dos loci) e a divisão das amostras em quatro subgrupos, condizentes com os locais de coletas. Os dados obtidos sugerem que os iniciadores OPB5, OPB7, OPB9 e OPB10 podem ser úteis no estudo da diversidade genética entre populações de *H. malabaricus*.

Palavras-chave: Traíra. Diversidade genética. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Recent studies suggest that *H. malabaricus* species, from the Erythrinidae family is a complex of species. Thus, the objective was to investigate the feasibility of using RAPD-PCR markers to determine the genetic variability of *H. malabaricus* in three streams in the Madeira River basin. 15 specimens from 3 different streams of the basin were collected, whose genomic DNA was amplified using 12 RAPD sequences, from which the percentage of polymorphism, similarity and genetic distance between the specimens, as well as the PIC and Heterozygosity values were determined. It was possible to observe a high degree of polymorphism (95% of the loci) and the division of the samples into four subgroups, consistent with the collection sites. The data obtained suggest that the primers OPB5, OPB7, OPB9 and OPB10 may be useful in the study of genetic diversity among populations of *H. malabaricus*.

Keywords: Trahiras. Genetic diversity. Genetic polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

O Rio Madeira é afluente do rio Amazonas, e possui aproximadamente cerca de 1.450 km de extensão, corta a porção sudoeste e noroeste dos estados do Amazonas e Rondônia e é formado em território boliviano e peruano, sendo o mais longo tributário da bacia amazônica [1, 2]. Além de apresentar grande extensão, a bacia deste rio abriga grande riqueza que se equipara ao número de espécies conhecidas para toda a Europa, Oceania e Rússia juntas, contemplando cerca de 20% das espécies conhecidas no continente americano [3].

Dentre a diversidade ictiofaunística da bacia deste rio encontra-se a família Erythrinidae. Esta família pertence à ordem Characiformes, e é representada por três gêneros: *Erythrinus Scopoli*, 1777, *Hoplerythrinus Gill*, 1896, e *Hoplias Gill*, 1903, sendo todos eles endêmicos da América do Sul [4,5]. Essa família é encontrada em diferentes tipos de habitats, desde córregos a rios de diferentes tamanhos, lagos, lagoas, reservatórios e regiões de cachoeira, ambientes nos quais predam outros peixes [6]. Dentro deste táxon, *Hoplias malabaricus* é a espécie mais difundida [7].

O gênero *Hoplias* possui grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais e apresenta alta diversidade cariotípica [8]. Sugere-se que *H. malabaricus* compreende um complexo de espécies [9], porém a avaliação é dificultada devido a pequenas variações dos caracteres merísticos e morfométricos dos exemplares da espécie ao longo da área de distribuição [6]. No entanto, informações sobre a genética populacional usando marcadores moleculares para se entender a diferenciação da população e esclarecer a circunscrição das espécies são escassas [9].

A disponibilidade de ferramentas moleculares para estudos genéticos populacionais é de grande importância para avaliar os impactos na viabilidade genética em longo prazo da população [9]. Dentre estas ferramentas destaca-se a técnica com a utilização de RAPD – PCR, que consiste na amplificação de DNA genômico pela PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando iniciadores de sequência arbitrária com 10 nucleotídeos [10]. Quando otimizadas as condições laboratoriais, o uso de marcadores RAPD mostra-se eficiente com grande conveniência para estudos de genética de populações, visto que, a técnica é caracterizada por ser simples, rápida, sensível e permitir o estudo da variabilidade genética sem o conhecimento prévio das sequências de DNA, sendo comumente usada em estudos de pesca [11, 12, 13].

Considerando-se o conhecimento limitado sobre a genética molecular e a importância da caracterização da espécie, o presente trabalho teve por finalidade investigar, utilizando iniciadores RAPD, a variabilidade genética de *H. malabaricus* na bacia do rio Madeira.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Fragmentos de tecido (cerca de 100mg de musculo) de espécimes de *Hoplias malabaricus* (n=15), provenientes de três igarapés localizados na cidade de Porto Velho (RO), a saber: igarapés da UNIR (n=3), Belmont (n=5) e Zona Leste (n=7), que haviam sido previamente coletados, identificados por um taxonomista e depositados nas coleções biológicas da UNIR (autorização ICMBIO Número: 49925-1 de 04/08/2015) para realização de estudos citogenéticos e filogenia, foram separados e tiveram seu DNA genômico extraído pelo método de CTAB 2%, segundo [14] como descrito a seguir:

Um pequeno fragmento de tecido (cerca de 100mg) de musculo, foi cortado e colocado em um tubo criogênico de 2 ml, ao qual foi adicionado 500µl de tampão CTAB e 10µl de proteinase K (100mg/ml) e incubado em banho-maria (60°C) por uma noite ou até dissolver o tecido. Após foi adicionado 300µl de clorofórmio-álcool-isoamílico (25:1), e invertido o tubo por 5 minutos, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo de 1,5 ml, sendo posteriormente adicionados 500µl de isopropanol gelado. A solução foi homogeneizada, por inversão do tubo, por 2 minutos e a seguir incubado a -6°C por 2 horas. Após o tempo de incubação, o tubo foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, o álcool isopropílico descartado, recuperando o precipitado de DNA, ao qual foi adicionado 500µl de álcool 70%. Após o tubo foi novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e descartou-se o álcool; deixando o precipitado secar ao ar em temperatura ambiente. Após a secagem o DNA obtido foi ressuspendido em 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4 e 1mM EDTA pH 8.0) e armazenado a -10°C até o momento das análises.

Para a amplificação do DNA-alvo utilizou-se a técnica de RAPD-PCR em um Termociclador Amplitherm -Tx96plus. As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 12,5 µl utilizando 1µl de DNA genômico com reagentes nas concentrações finais de: 32,5 mM Tris-EDTA-Borato pH8,8, 8 mM (NH₄)₂SO₄, 0,005% Tween 20, 3 mM de MgCl₂, 100 µM de cada deoxinucleotídeos (Invitrogen™), 4µM de oligonucleotídeo iniciador e 1U de *Taq* DNA polimerase (LGC Biotecnologia), nas seguintes etapas de ciclagem de temperaturas: 2 ciclos iniciais de 94°C por 2 minutos, 30°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos,

seguidos por 3 ciclos consecutivos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando com uma etapa de extensão a 72°C por 5 minutos. As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese vertical em gel nativo de poliacrilamida 8% numa velocidade de 8 V/cm de gel, com posterior coloração por nitrato de prata.

As ampliações foram realizadas em duas etapas. A primeira, teve por finalidade verificar a viabilidade de amplificação do DNA genômico da espécie utilizando alguns *iniciadores* descritos nos Kits A, B e D da *OPERON Technology Inc.* (OPA1, OPA2, OPA8, OPA11, OPB1, OPB4, OPB5, OPB7, OPB09, OPB10, OPB11 e OPD11) estocados no laboratório, em freezer -10°C, em concentração de 50uM.

Na segunda etapa, 15 espécimes de *H. malabaricus* tiveram seu DNA genômico amplificados para os quatro iniciadores RAPD que apresentaram melhores resultados na etapa 01, sendo eles OPB05, OPB07, OPB09 e OPB10.

Os produtos de amplificação dos quatro iniciadores foram agrupados em matrizes binárias, onde o 0 (zero) foi atribuído para a ausência de bandas enquanto o 1 (um) caracterizou a presença. Para a construção da matriz utilizou-se o software Pyelph versão 1.4 obtido gratuitamente através do site da empresa SOURCEFORGE (<https://sourceforge.net/projects/pyelph/>). Estes dados foram empregados para a construção de uma matriz de similaridade genética com base no coeficiente de Jaccard. Através desse, construiu-se um dendograma com o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*). Para estas análises utilizou-se o software livre PAST versão 3.25 fornecido pela Universidade de OSLO baseado em [15]. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e a Heterozigosidade foi calculada através de uma ferramenta online, denominada iMEC: *Marker Efficiency Calculator* (<https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>), que é utilizada para analisar a eficiência de marcadores, este software online foi desenvolvido pela empresa GitHub, Inc. [16].

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dos doze sistemas analisados foram selecionados os quatro iniciadores que apresentaram melhor nitidez e número dos fragmentos produzidos (OPB05, OPB07, OPB09 e OPB10) visando avaliar a viabilidade de utilização como marcador genético para *H. malabaricus*. Para estes marcadores encontrou-se bandas bem marcadas, com pesos moleculares característicos

para cada sistema. Adicionalmente também foi possível observar bandas secundárias (amplificação mais fraca) variadas, monomórficas ou polimórficas (Figura 01).

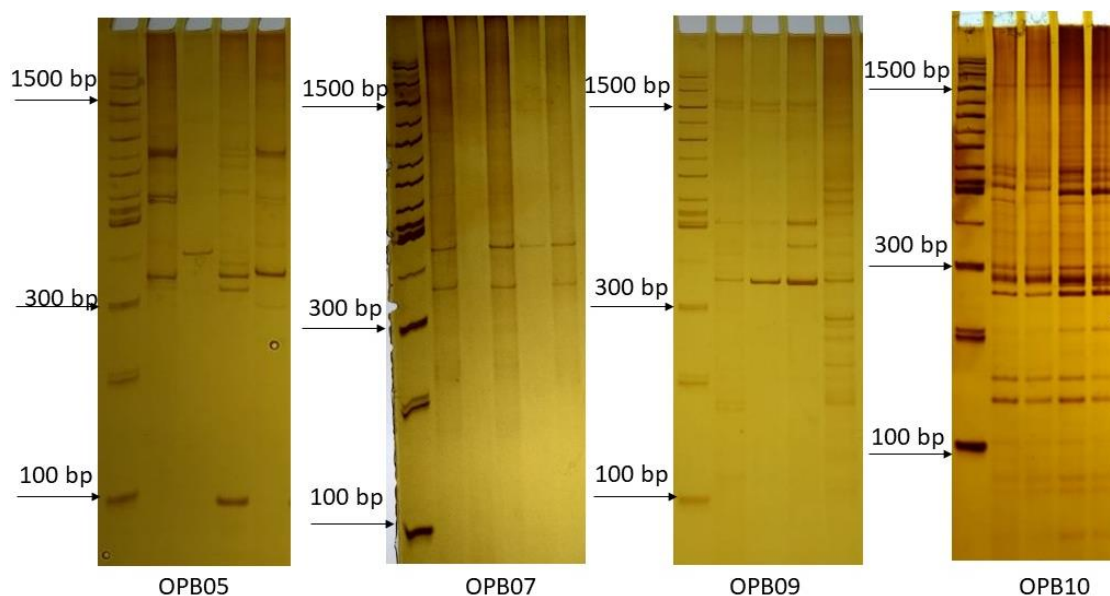


Figura 1. Gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, demonstrando os padrões de corrida dos sistemas RAPD-PCR OPB05, OPB07, OPB09 e OPB10 para a espécie *Hoplias malabaricus*. A primeira amostra de cada gel representa o marcador de peso molecular de 100 pares de base, sendo as bandas de 100pb, 300pb e 1500 pb destacadas pelas setas.

Na Tabela 1, pode-se observar as características descritivas (sequência nucleotídica, número de *loci* amplificados, número de *loci* polimórficos e o tamanho dos fragmentos observados) para cada um dos quatro iniciadores selecionados. Os fragmentos extremos foram obtidos para OPB09, variando de 113pb a 1831pb. Os sistemas OPB05, OPB07 e OPB10 apresentaram tamanho de fragmentos máximos de 1217 pb, 1272 pb e 1733 pb, respectivamente. Um fator para a reprodutibilidade das bandas RAPD é o tamanho dos produtos amplificados, sendo que de forma geral, produtos amplificados com tamanhos acima de 2kb apresentam baixa reprodutibilidade. Geralmente são assinaladas como exibindo uma maior reprodutibilidade aquelas bandas encontradas entre 200 e 1500pb [17].

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos iniciadores, número de loci, número de loci polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para os 15 espécimes de *H. malabaricus*.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos	Nº de loci	Nº de loci polimórficos	Tamanho dos fragmentos (pb)
OPB05	TGCGCCCTTC	17	16	133-1217

OPB07	GGTGACGCAG	11	10	125-1272
OPB09	TGGGGGACTC	25	24	113-1831
OPB10	CTGCTGGGAC	27	26	115-1733
Total	-	80	76	-

Encontrou-se um total de 272 fragmentos distribuídos em 80 *loci* dos quais, 76 foram polimórficos (95%), caracterizando um alto grau de polimorfismo. Não foi descrita na literatura, até o momento, a utilização desses iniciadores para a espécie em estudo. Entretanto, na amplificação com 3 iniciadores (OPA05, OPA09 e OPAC13) descritos para *H. malabaricus*, foi observado um total de 74 *loci* [18], valores semelhantes ao aqui relatado. Os valores totais de *loci* encontrados no presente trabalho estão de acordo com os números obtidos para estimativa da diversidade genética em peixes pela técnica RAPD [19].

Ao analisar os iniciadores separadamente todos apresentaram apenas uma banda monomórfica. As polimórficas representam, respectivamente, 94% (16 *loci*), 90% (10 *loci*), 96% (24 *loci*) e 96% (26 *loci*) para OPB05, OPB07, OPB09 e OPB10. Estes resultados são indicativos que os iniciadores utilizados apresentam um alto número de *loci* polimórficos para os espécimes, visto que, valores superiores a 50% são considerados com alta porcentagem polimórfica [20, 21].

Com os dados de ausência e presença de bandas foi possível analisar a similaridade entre os espécimes através do índice de Jaccard e gerar um dendograma, como observados nas figuras 2 e 3.

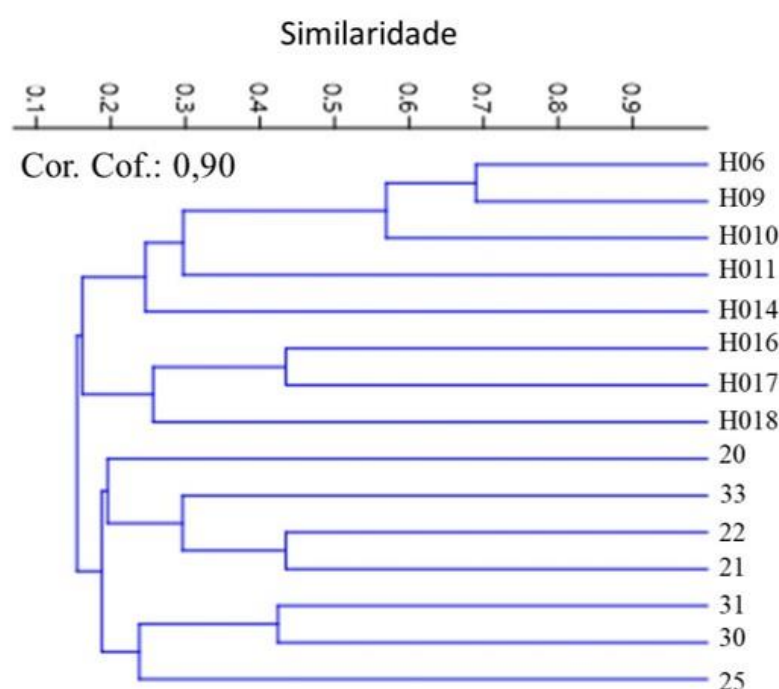


Figura 2. Dendograma de similaridade de Jaccard para todos os iniciadores RAPD-PCR analisados em 15 espécimes de *Hoplias malabaricus* provenientes de igarapés da bacia do rio Madeira (RO).

	25	33	31	30	22	21	20	H06	H09	H010	H011	H014	H016	H017	H018
25	1														
33	0,143	1													
31	0,290	0,333	1												
30	0,186	0,182	0,424	1											
22	0,222	0,28	0,290	0,244	1										
21	0,1	0,313	0,160	0,081	0,435	1									
20	0,2	0,2	0,182	0,121	0,200	0,188	1								
H06	0,070	0,172	0,135	0,325	0,179	0,129	0,067	1							
H09	0,093	0,129	0,075	0,350	0,119	0,059	0,065	0,690	1						
H010	0,087	0,188	0,179	0,390	0,220	0,147	0,059	0,625	0,514	1					
H011	0,103	0,240	0,219	0,163	0,303	0,143	0,160	0,324	0,243	0,324	1				
H014	0,1	0,235	0,160	0,143	0,222	0,158	0,056	0,207	0,200	0,300	0,28	1			
H016	0,094	0,211	0,107	0,135	0,167	0,143	0,050	0,233	0,188	0,206	0,214	0,2	1		
H017	0,167	0,154	0,188	0,167	0,200	0,107	0,077	0,189	0,154	0,171	0,281	0,107	0,435	1	
H018	0,103	0,176	0,167	0,083	0,231	0,167	0,125	0,097	0,061	0,086	0,192	0,05	0,15	0,364	1

Figura 3. Valores de similaridade entre os espécimes de *Hoplias malabaricus* provenientes de igarapés da bacia do rio Madeira (RO) para todos os iniciadores RAPD-PCR analisados.

Os dados obtidos indicam a divisão dos 15 espécimes em quatro subgrupos. O primeiro é constituído de espécimes coletados no Igarapé Belmont (H06, H09, H010, H011 e H014). O espécime H06 apresenta maior similaridade com o H09 (0,69) e H010 (0,63). Os menores valores encontrados dentro deste grupo está entre H06 e H014 (0,20), bem como entre este e H09 (0,20), indicando variação intraespecífica entre os espécimes deste igarapé.

O segundo subgrupo é composto pelos espécimes coletados no Igarapé Unir (H016, H017 e H018). O maior valor encontrado para similaridade é observado entre H016 e H017 (0,44) seguido de H017 e H018 (0,36). O menor valor está entre H016 e H018 (0,15), sendo possível observar uma variação dentro da população.

Os indivíduos do Igarapé Zona Leste apresentaram uma alta variação intraespecífica, visto que é dividido em dois subgrupos. O menor valor de similaridade encontrado entre eles é observado entre os espécimes 25 e 30 (0,186) enquanto o maior é entre o 22 e 21 (0,435).

O dendograma construído utilizando os marcadores apresentou uma correlação cofenética de 0,90, indicando um alto grau de concordância com a matriz de similaridade, uma vez que, quanto mais próximo da unidade maior a relação entre eles. [22]. Para as análises de similaridade considerou-se como alto, valores superiores a 0,5 [23].

Na figura 4 encontra-se as análises de similaridade e construção de dendograma para os quatro iniciadores avaliados separadamente. Tais marcadores apresentaram correlação cofenética maior ou igual a 0,90. OPB05 apresentou amplificação para todos os 15 espécimes o que possibilitou discriminar os subgrupos de acordo com o Igarapé coletado. Para este iniciador os espécimes H016 e H017 apresentaram 100% de similaridade, assim como os

espécimes 22 e 21. Já para OPB07 obteve-se amplificação para apenas 7 indivíduos, apresentando similaridade 100% entre 31 e H06, assim como entre H010, H011 e H014.

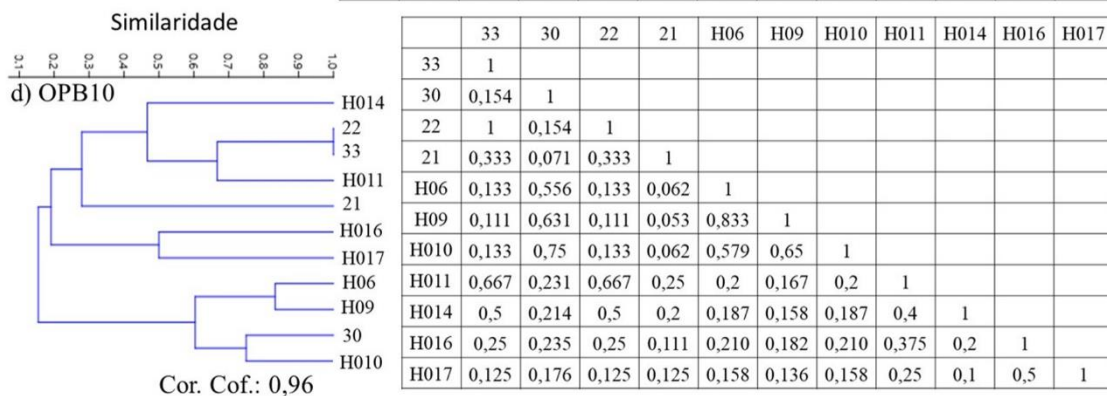
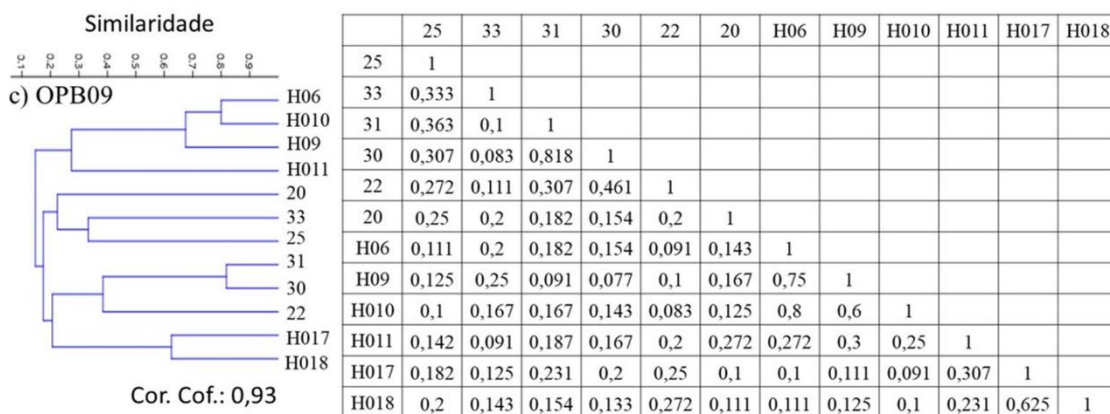
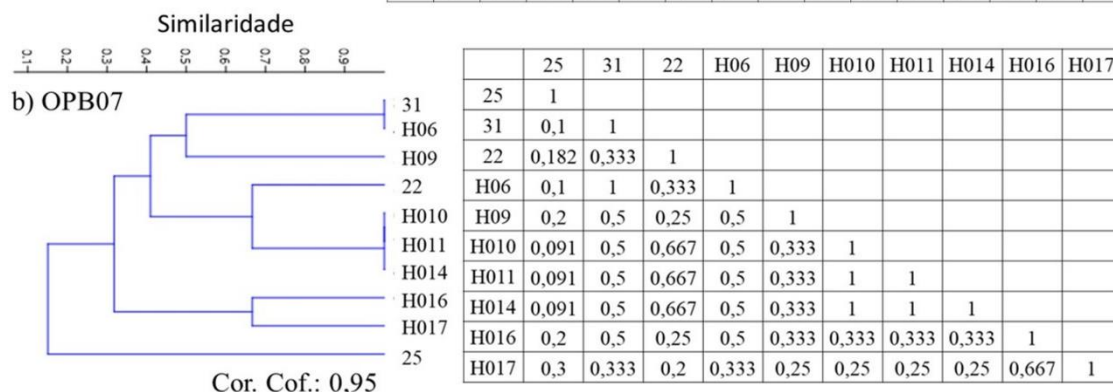
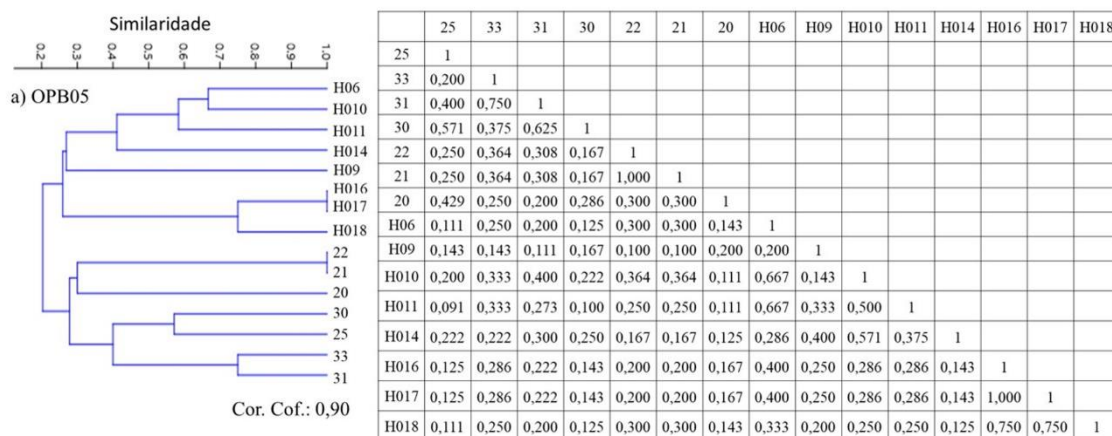


Figura 4. Dendograma de Jaccard e dados de similaridade entre os espécimes de *Hoplias malabaricus* provenientes de igarapés da bacia do rio Madeira (RO) para os diferentes iniciadores OPB05, OPB07, OPB09 e OPB10, avaliados separadamente.

O iniciador OPB09 obteve amplificação para 12 espécimes e assim como OPB05 também apresentou os subgrupos conforme a coleta nos igarapés, sendo a maior similaridade encontrada entre os indivíduos H06 e H010. O iniciador OPB10 apresentou amplificação em 11 espécimes, sendo que para este sistema foi possível observar uma similaridade de 100% para os espécimes 22 e 33 e uma similaridade alta entre os indivíduos H06 e H09 (0,83).

Uma hipótese para a diferença intraespecífica é a característica comportamental da espécie, uma vez que, embora esteja descrita nos mais diversos tipos de habitats, preferencialmente habitam águas lânticas [3]. O comportamento sedentário das traíras e o fato de não serem peixes migratórios, ocasiona a formação de pequenas populações isoladas e consequentemente pouco ou nenhum fluxo gênico entre elas [24].

Para as análises com marcador RAPD, frequentemente, calcula-se a heteroziguidade, que é uma medida de variabilidade genética [25] e, o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) para identificar aqueles mais apropriados para o mapeamento genético e análises filogenéticas [26]. Os valores encontrados para este estudo estão presentes na tabela 2.

Tabela 2. Valores de PIC e heteroziguidade para *Hoplias malabaricus* provenientes de três igarapés da bacia do rio Madeira (RO) para os iniciadores RAPD-PCROPB05, OPB07, OPB09 e OPB10.

Iniciadores	Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC)	Heteroziguidade
OPB05	0,30	0,43
OPB07	0,31	0,28
OPB09	0,30	0,32
OPB10	0,29	0,34
MÉDIA	0,29	0,35

Os valores de PIC são analisados segundo [27], cujo valores maiores ou igual a 0,5 são considerados satisfatórios, valores entre 0,25 e 0,50 mediantemente informativos e PIC inferiores a 0,25 são considerados pouco informativos. Os resultados obtidos para os marcadores em estudo foram considerados mediantemente informativos, decorrente do fato dos menores valores de PIC estarem relacionados com as maiores frequências de fragmentos polimórficos [28]. O

maior valor encontrado de PIC e heterozigosidade foi de 0,30 e 0,43, respectivamente, para o iniciador OPB05.

Os valores de PIC e heterozigosidade indicam que tais iniciadores poderão ser úteis no estudo da diversidade genética entre populações de *H. malabaricus*, o que corrobora com as análises de similaridade e distância genética, que apresentou uma divisão em quatro subgrupos entre os espécimes estudados.

CONCLUSÕES

Os dados demonstram a viabilidade da utilização dos iniciadores tipo RAPD, OPB05, OPB07, OPB09 e OPB10, para o estudo da diversidade genética entre populações de *Hoplias malabaricus*, apresentando valores de PIC e heterozigosidade mediantemente informativos e a construção de dendograma que sugere uma variação intraespecífica, possibilitando a separação entre os indivíduos provenientes de diferentes igarapés.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HORBE, A. M. C. et al. Geoquímica das águas do médio e baixo rio Madeira e seus principais tributários - Amazonas - Brasil. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 4, p. 489–504, 2013.
- [2] RAPP P.D.L. 2007. Capítulo 3. Caracterização da área amostrada. p. 35-42. In: Rapp P.D., L.; DEUS, C.P.; HENRIQUES, A.L.; PIMPÃO, D.M.; RIBEIRO, O.M. (orgs.). Biodiversidade do Médio Madeira: Bases científicas para propostas de conservação. INPA: Manaus, 244pp.
- [3] QUEIROZ, L. J. et al. Peixes do rio madeira VOLUME I. v. I, p. 402, 2013.
- [4] BAUMGARTNER, G. et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. Maringá: Eduem, 2012. 203 p.
- [5] MARTINEZ, J. F. et al. Comparative Cytogenetics of *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Agassiz, 1829) (Characiformes, Erythrinidae) Species Complex from Different Brazilian Hydrographic Basins. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 149, n. 3, p. 191–200, 2016.
- [6] QUEIROZ, L. J. DE. Peixes do rio Madeira VII. v. I, p. 354, 2014.
- [7] BERTOLLO, L. A. C. et al. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v. 8, n. 7, p. 603–613, 2000.
- [8] VITORINO, C. D. E. A. O uso de marcadores citogenéticos básicos e moleculares para a caracterização de uma população de *Hoplias malabaricus*. p. 69, 2010.

- [9] GONDIM, S. G. et al. Development of microsatellite markers for *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae). **Genetics and molecular research : GMR**, v. 9, n. 3, p. 1513–1517, 2010.
- [10] LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD : uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 87–92, 2002.
- [11] NUNES, A. M. et al. Caracterização molecular de butiazeiro por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 702–707, 2008.
- [12] WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 18, n. 22, p.6531-6535, 1990. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>.
- [13] AKTER, S. et al. Genetic Characterization of Critically Endangered *Puntius sarana* (Hamilton) and the Exotic *Barbonymus gonionotus* (Bleeker) (Cyprinidae: Cypriniformes) by DNA Fingerprinting. **International Journal Of Biosciences, Agriculture And Technology**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.21-27, jan. 2010.
- [14] DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- [15] CORRÊA, E. M.; POSSIK, P. A. a Análise De Dna Por Eletroforese. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.
- [16] HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T. & RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1–9. Available at: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm Acesso em: 13 set 2019.
- [17] LIU, Z.j et al. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. **Aquaculture**, [s.l.], v. 174, n. 1-2, p.59-68, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(99\)00007-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(99)00007-1).
- [18] DERGAM, J. A. et al. Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçú, Tibagi, and Paraná Rivers. **Genetics And Molecular Biology**, São Paulo, v. 21, n. 4, p.493-496, dez. 1998. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47571998000400015>.
- [19] POVH, J. A. et al. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum**. Animal Sciences, Maringá, v. 27, n. 1, p.1-10, 20 mar. 2005. Universidade Estadual de Maringa. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v27i1.1236>.
- [20] TELLES, M. et al. Marcadores RAPD na Análise da Divergência Genética Entre Raças de Bovinos e Número de Locus Necessários Para a Estabilidade da Divergência Estimada. **Ciência Animal Brasileira**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 87-95, out. 2006. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/269> Acesso em: 15 out 2019.
- [21] BOTREL, Maria Carolina Gaspar et al. Caracterização genética de *Calophyllum* brasileiro Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 5,

p.821-827, out. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-67622006000500016>.

[22] CARVALHO, M.F. et al. Aplicação da análise multivariada em avaliações de divergência genética através de marcadores moleculares dominantes em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.339-346, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722009000300017>.

[23] FERREIRA JÚNIOR, E.V. et al. Composição, diversidade e similaridade florística de uma floresta tropical semidecídua submontana em Marcelândia - MT. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 38, n. 4, p.673-679, dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0044-59672008000400010>.

[24] SANTOS, U. et al. Caracterização E Comparação Citogenética Em População De Hoplias Malabaricus (Pisces , Erythrinidae) No Rio Pará : Bacia Do Alto São Francisco , Mg . **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Coxambu, p. 1–2, 2007.

[25] POWELL, Wayne et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.225-238, 1996. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00564200>.

[26] MENEZES, M. P. C. **Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, ibéricas e canárias**. 2005. 110f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal do Ceará, Areia.

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

[28] GRATIVOL, C.; LIRA-MEDEIROS, C. F.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Rep**, v. 10, p. 547-557. 2010.