

SEQUÊNCIAS DE GENE MITOCONDRIAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES ANIMAIS

MITOCHONDRIAL GENE SEQUENCES FOR IDENTIFICATION OF ANIMAL SPECIES

SECUENCIAS DEL GEN MITOCONDRIAL PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ANIMALES

OLIVEIRA, JOYCE AZAMBUJA DE^{1*} Mestranda., CRISPIM, BRUNO DO AMARAL³ MSc., MARTINS, NAYARA MORENO¹ Mestranda., SILVA, ALESSANDRA OLIVEIRA DA¹ Mestranda., DOURADO, PRISCILA LEOCÁDIA ROSA² Mestranda., ROCHA, MONYQUE PALAGANO DA² Mestranda., GRISOLIA, ALEXÉIA BARUFATTI³ Dr.

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Dourados - MS, 79804-970. ² Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Dourados - MS, 79804-970. ³ Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Dourados - MS, 79804-970.

* Correspondência: joyce_azambuja@hotmail.com

Recibido: 22-07-2013; Aceptado: 18-11-2013.

Resumo

Marcadores moleculares baseados em DNA mitocondrial (mtDNA) possuem um padrão de herança materna podendo ser utilizados na avaliação de relações filogenéticas e taxonômicas. O diagnóstico de similaridade entre seres vivos pode ser realizado pela análise genômica do RNA ribossômico 16S (16S rRNA). O objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade de marcador molecular na região 16S rRNA para identificação de diferentes espécies de animais e determinar o grau de similaridade genética entre estes indivíduos. Para isso, extraiu-se o DNA de 13 animais, sendo 5 ovinos, 4 bovinos e 4 peixes, em seguida as amostras foram amplificadas, purificadas e sequenciadas. As análises das sequências foram realizadas nos programas MEGA 5.10 e BLAST. As análises das sequências no GenBank[®] demonstraram que os animais pertenciam as espécies de *Ovis aries* (ovino), *Bos taurus* (bovino), *Prochilodus lineatus* (curimba), *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado), *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) e *Leporinus obtusidens* (piauí). A distância genética entre os diferentes grupos animais foi de 0,10 bovinos/ovinos, 0,66 bovinos/peixes e de 0,65 ovinos/peixes. A construção da árvore filogenética permitiu determinar duas classes distintas sendo Mammalia, contendo as subfamílias: Bovinae e Caprinae, e Actinopterygii contendo as ordens: Caraciforme (curimba e piauí) e Siluriforme (pintado e cachara). A tecnologia de marcadores moleculares de mtDNA demonstrou a possibilidade

da sua utilização como ferramenta na identificação e diferenciação de espécies auxiliando o trabalho de taxonomistas. Assim, o sequenciamento parcial da região do gene 16S rRNA foi suficiente para a identificação de ovinos, bovinos e diferentes espécies de peixes com base na similaridade do gene no programa BLAST.

Palavras-chave: 16S rRNA, seqüenciamento, linhagem materna, DNA mitocondrial

Resumen

Marcadores moleculares basados en el ADN mitocondrial (ADNmt) tienen herencia materna y se pueden utilizar para evaluar relaciones filogenéticas y taxonómicas. El diagnóstico de similitud en los seres vivos se puede lograr mediante análisis genómico del ARN ribosomal 16S (16S rARN). El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de marcador molecular en el 16S rARN como una metodología para la identificación de las diferentes especies de animales y determinar el grado de similitud genética entre estos individuos. Para ello, el ADN se extrajo a partir de 13 animales, 5 ovinos, 4 bovinos y 4 peces, a continuación se amplificaron, se purificaron y se secuenciaron las muestras. Los análisis de las secuencias se realizaron en los programas MEGA 5.10 y BLAST. Las secuencias identificadas en GenBank[®] mostraron que los animales pertenecían a las especies *Ovis aries* (ovino), *Bos taurus* (bovino), *Prochilodus lineatus* (curimba), *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado), *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) y *Leporinus obtusidens* (piau). La distancia genética entre los diferentes grupos de animales fue de 0,10 bovinos/ovinos, 0,66 bovinos/peces y 0,65 ovinos/peces. La construcción del árbol filogenético ha determinado dos clases distintas siendo Mammalia, que contiene las subfamilias: Bovinae y Caprinae, y Actinopterygii que contiene los órdenes: Caraciforme (curimba y piau) y Siluriforme (pintado y cachara). La tecnología de los marcadores moleculares del ADNmt demostró la posibilidad de utilizarla como herramienta en la identificación y diferenciación de las especies asistiendo a la obra de los taxonomistas. Por lo tanto, la secuenciación parcial de la región del gen 16S rARN fue suficiente para la identificación de ovinos, bovinos y diferentes especies de peces sobre la base de la similitud del gen en programa BLAST.

Palabras clave: 16S rARN, secuenciación, linaje materno, ADN mitocondrial.

Abstract

Molecular markers based on mitochondrial DNA (mtDNA) have maternal inheritance and may be used to evaluate phylogenetic and taxonomic issues. The similarity diagnosis of living beings can be performed by genomic analysis of the 16S ribosomal RNA (16S rRNA). The aim of this study was to evaluate the molecular marker in 16S rRNA gene potential to identify different animal species and determine the degree of genetic similarity among individuals. DNA was extracted from 13 animals being 5 sheep, 4 cattle and 4 fish and the

samples were amplified, purified and sequenced. The analysis were made with MEGA 5.10 and BLAST programs. The sequences identified on GenBank® showed that the animals belonged to the *Ovis aries* (sheep), *Bos taurus* (cattle), *Prochilodus lineatus* (curimba), *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado), *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) and *Leporinus obtusidens* (piau) species. The genetic distance between the different animal groups was 0,10 cattle/sheep, 0,66 cattle/fish and 0,65 sheep/fish. The construction of the phylogenetic tree has determined two different classes being Mammalia containing the subfamillies: Bovinae and Caprinae, and Actinopterygii containing the orders: Caraciforme (curimba and piau) and Siluriforme (pintado and cachara). The mtDNA molecular markers technology demonstrated the possibility of using it as a tool for species identification and differentiation thereby assisting the work of taxonomists. Thus, the partial sequencing of the 16S rRNA gene was sufficient for the identification of sheep, cattle and different species of fish based on the similarity of that gene in BLAST.

Key words: 16S rRNA, sequencing, maternal lineage, mitochondrial DNA

Introdução

Marcadores moleculares baseados em DNA mitocondrial (mtDNA) possuem apenas herança materna, ao contrário dos nucleares que possuem herança biparental. De acordo com OLSON *et al.* (2009) por à herança materna estar altamente conservada em muitos dos genes localizados no genoma mitocondrial, estes marcadores, muitas vezes podem ser usados para resolver as relações que medem períodos de tempo muito longos e são relevantes quando se considera questões de filogenia e importância taxonômica.

Segundo SILVA *et al.* (2012), nas últimas décadas as técnicas de biologia molecular vêm ganhando espaço nos estudos de identificação molecular e, com os seus últimos avanços é possível comparar sequências de nucleotídeos do DNA, principalmente em regiões codificadoras de genes específicos, considerada conservada entre as espécies em estudo (CHUEIRE *et al.*, 2003), podendo usar esta informação nos estudos de identificação de espécies.

O gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI ou Cox1), constituído por um curto segmento de 648 pares de bases, foi proposto para identificação molecular em nível de espécie (HEBERT *et al.*, 2003a; 2003b). O estudo dessa região do mtDNA, também denominado de DNA barcoding, utiliza sequências parciais de DNA do gene Cox1 e permite identificar e designar espécimes desconhecidos e espécies previamente descritas; e, facilitar a descoberta e o diagnóstico de novas espécies, auxiliando a desvendar a diversidade (BOLZAN, 2011).

Outro marcador molecular bastante conhecido e utilizado é o citocromo b que é a subunidade catalítica central da ubiquinol citocromo c reductase, uma enzima que está presente na cadeia respiratória da mitocôndria e na cadeia respiratória do ciclo foto-redox de muitas bactérias (MEYER, 1994), todos os organismos eucariotos necessitam desta classe de enzima redox, e conseqüentemente do citocromo b para a conversão de energia (ORREGO, 2012). Seu uso se justifica pela presença de regiões conservadas e variáveis, as quais contem sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos, sendo considerado excelente marcador molecular, amplamente utilizado como ferramenta em filogenias moleculares (ORREGO, 2012).

O diagnostico de similaridade dos seres vivos pode ser realizado pela análise genômica do RNA ribossômico 16S (16S rRNA) (Fig. 1). A comparação do 16S rRNA entre dois grupos que se originaram de um mesmo ramo evolutivo permite avaliar quantas mudanças ocorreram desde a separação. Esse fato possibilita a construção de uma árvore em que o comprimento do ramo é proporcional ao número de mudanças sofridas, chamada de árvore filogenética universal (DAMINELI E DAMINELI, 2007).

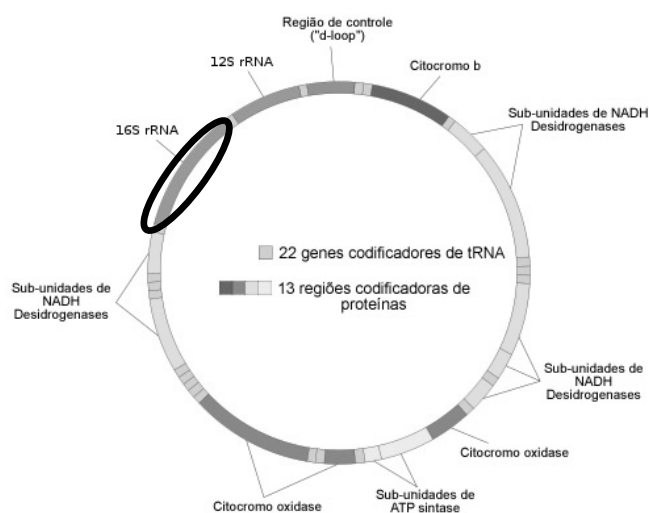


Figura 1. Esquema do genoma mitocondrial, em destaque a região 16S. (adaptado de <http://www.infoescola.com/genetica/dna-mitocondrial/>)

Neste contexto, objetivou-se neste trabalho avaliar a potencialidade da região 16S rRNA para identificação de diferentes espécies animais e determinar o grau de similaridade genética entre os indivíduos estudados.

Material e métodos

Animais: Um total de 13 animais de espécies diferentes foram utilizados sendo 5 ovinos, 4 bovinos e 4 peixes. As amostras de sangue e nadadeiras foram obtidas em banco de material biológico do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal, Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (FCA/UFGD).

Extração do DNA: As extrações de DNA foram realizadas por meio dos protocolos descritos abaixo:

Extração de DNA de sangue (bovinos e ovinos): Aliquotou-se 300 μL do material biológico em um microtubo de polipropileno de 2 mL e acrescentados 3 μL de proteinase K (20 mg/mL) e 500 μL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 20%, homogeneizados em *vortex* e incubados a 60°C em banho-maria por 1 hora e 30 minutos. Após realizada a incubação, foi adicionado 800 μL de clorofórmio nos microtubos e agitados vigorosamente em *vortex* até completa homogeneização; em seguida, foi acrescentado 350 μL de solução de precipitação protéica e homogeneizados novamente em *vortex*. Os microtubos com a solução foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos para que a fase aquosa pudesse ser retirada e transferida para outro microtubo. Adicionou-se 1 mL de etanol 100% gelado e logo em seguida, homogeneizado por inversão até a formação de precipitado (entre 30 e 60 segundos). Posteriormente, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos e após centrifugação desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1 mL de etanol 70%, em seguida, centrifugou-se novamente por dois minutos, e desprezou-se o sobrenadante. Após esta etapa o microtubo foi invertido para a secagem do sedimento (10 a 15 minutos), logo após, adicionou-se 100 μL de TE pH 8,7 com RNase (10 μg por mL de amostra), homogeneizou-se lentamente (1 μL de RNase para cada 1000 μL de TE) e por último o material foi incubado a 37°C por 1 hora e posteriormente, armazenados em freezer a -20 °C.

Extração de DNA de nadadeira (peixes): Para a extração do DNA das nadadeiras, foram cortados pequenos fragmentos das mesmas e colocados em microtubos de 1,5 mL, adicionou-se 200 μL de Chelex[®] 5%, e levou-se no termociclador BIORAD modelo *MyCycler[™] thermal cycler* a 95° por 15 minutos. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas por 2 min. e transferiu-se 2 μL do sobrenadante para outro microtubo de 1,5 mL e por fim foram armazenadas em freezer a -20 °C.

Quantificação do DNA: Os dados referentes à quantidade (ng/μL) e qualidade (razão de 260/280 nm) de DNA foram obtidos por meio de nanofotometria com o aparelho NanoPhotometer® (Implen).

Amplificação: As amostras de DNA foram utilizadas para amplificação da região 16S do DNA mitocondrial. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*, em inglês) utilizados foram 16S F (5'ACGCCTGTTTATCAAAAACAT3') e 16S R (5'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3'), como descrito por PALUMBI (1996).

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*, em inglês) foi realizada em um volume final de 25 μL e a mistura para amplificação constituiu-se de: 7,0 μL de água ultra-pura, 1,5 μL de cada *primer* (10 pmoles), 12,5 μL de PCR Master Mix (Thermo Scientific®), 2,5 μL de DNA (10-20ng). As reações de PCR foram realizadas no termociclador BIORAD modelo *MyCycler™ thermal cycler* sendo a desnaturação de 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30s, 57°C por 30s e 72°C por 10s e a extensão final de 72°C por 5 min. Como controle negativo para monitoramento da amplificação da região 16S foi utilizado DNA de *Salmonella ssp.*

Purificação: As amostras amplificadas foram purificadas seguindo o protocolo fenol/clorofórmio, onde: colocou-se 12 μL de produto de PCR amplificado e 12 μL de uma mistura de fenol/clorofórmio (1:1). A solução foi agitada por 1 min em *vortex* e centrifugada à temperatura ambiente por 3 min a 14.000 rpm. A fase aquosa foi recuperada e a ela adicionou-se 250 μL de clorofórmio. As amostras foram agitadas novamente por 1 min em *vortex* e centrifugou-se a temperatura ambiente por 3 min a 14.000 rpm. A fase aquosa foi recuperada e adicionou-se 1/10 do volume (1,2 μL) de acetato de sódio pH 5,2 a 3M e 2,5 vezes do volume (30 μL) de etanol 95%. A solução foi mantida a -20°C *overnight* e então centrifugada a 4°C por 15 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 70% e centrifugou-se a temperatura ambiente por 15 min a 14.000 rpm. O DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuscitado em 30 μL de TE 10:1 (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA pH 8,0).

Sequenciamento: O sequenciamento foi realizado no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho em Jaboticabal, SP.

As placas de sequenciamento foram preparadas adicionando-se uma quantidade de produto amplificado e de água ultra pura, dependendo da concentração do produto de PCR inicial, de modo a se ter uma concentração final de aproximadamente 10 ng/μL. Cada amostra foi adicionada em dois

poços da placa sendo que em um poço foi adicionado o *primer forward* e no outro o *primer reverse*. Em seguida, adicionou-se 3 μL de tampão, 1 μL dos primers (*forward* ou *reverse*, sendo 10 pmoles de cada) e 1 μL de *Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing* (Life Technologies). Essa reação foi levada ao termociclador por 4 horas com o seguinte programa: um ciclo de 96°C por 1 min, 39 ciclos de 96°C por 15 seg, 60°C por 15 seg e 60°C por 4 min.

Em seguida, foi feito o protocolo de lavagem das reações adicionando-se 80 μL de isopropanol 75% e selou-se com selo de alumínio. As placas foram deixadas por 15 min dentro da centrífuga para decantação e depois centrifugou-se por 30 min a 20°C, 4.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μL de etanol 70% e selou-se com selo de alumínio novamente e foi centrifugado por 10 min a 20°C, 4.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se esses mesmos passos mais uma vez. Foi feito spin invertido onde se colocou um pedaço de papel absorvente embaixo da placa invertida na centrífuga e realizou-se o spin por 20 seg na aceleração e desaceleração 1.

As placas foram colocadas na estufa para secar por 5 min e depois seladas para o sequenciamento. Adicionou-se 10 μL de formamida e levou-se ao termociclador por 5 min nas mesmas condições acima mencionadas. As placas foram colocadas no sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems) onde o sequenciamento durou em torno de 2 horas e 30 min.

Análise dos dados: O alinhamento das sequências, bem como os cálculos de distância genética e o dendograma foram esquematizados no programa MEGA 5.10 (TAMURA *et al.* 2011). Em seguida as sequências foram conferidas no GenBank[®] utilizando o programa BLAST (BENSON *et al.* 2012).

Resultados

Os protocolos utilizados para extração do DNA demonstraram eficácia, pois a quantidade e razão média de DNA das amostras obtidas por meio de espectrofotometria foi de 44,09 ng/ μL e 1,62, respectivamente.

Fragmentos de aproximadamente 650 pares de bases (pb) foram obtidos da PCR, conforme o esperado, exceto para o DNA de *Salmonella* ssp que foi utilizado como controle negativo. Esse resultado pode ser visualizado por meio da eletroforese em gel de agarose 2% (Fig. 2).

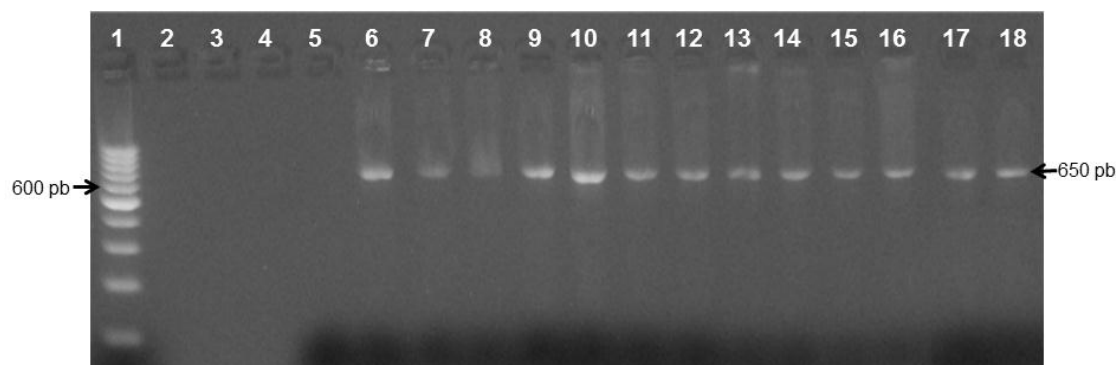


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR do gene 16S mitocondrial. Linha 1: marcador de peso molecular de 100pb; Linhas 2 a 5: amostras de *Salmonella* ssp.; Linhas 6 a 9: amostras de peixes; Linhas 10 a 13: amostras de bovinos; Linha 14 a 18: amostras de ovinos.

A análise do sequenciamento resultou em seqüências de aproximadamente 490 pb e, como os primers delimitam uma região de 650 pb, conclui-se que foi possível sequenciar 75% da região 16S. As seqüências obtidas foram alinhadas pelo método de Clustal W (LARKIN *et al.*, 2007) (Fig. 3).

As seqüências foram identificadas no GenBank[®] pelo programa BLAST de modo que 5 pertenciam a *Ovis aries*, 4 a *Bos taurus*, e as demais pertenciam às seguintes espécies de peixes: *Prochilodus lineatus* (curimba), *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado), *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) e *Leporinus obtusidens* (piauí).

A distância genética dentro de cada grupo foi de 0,01 para bovinos, 0,02 para ovinos e 0,17 para peixes. Também foi calculada a distância entre os diferentes grupos animais (Tabela 1).

Tabela 1. Matriz de distância entre os diferentes grupos animais

	Bovinos	Ovinos	Peixes
Bovinos			
Ovinos	0,104		
Peixes	0,655	0,654	

A árvore filogenética, construída pelo método de Tamura e Nei (TAMURA E NEI, 1993) desenvolvido especialmente para se trabalhar com DNA mitocondrial, foi apresentada na Figura 3.

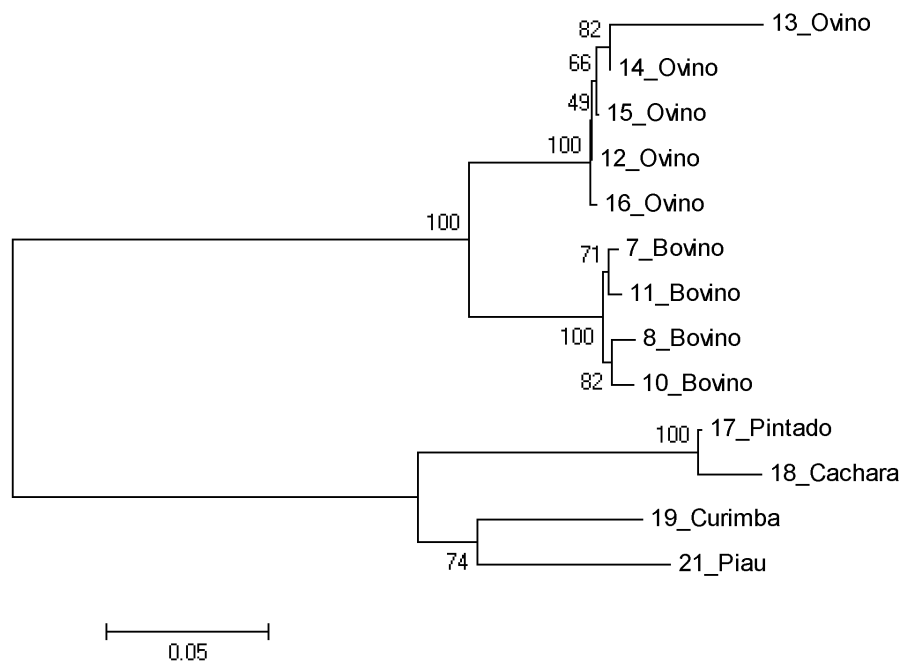


Figura 3. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S rRNA construído pelo método de Tamura-Nei (TAMURA E NEI, 1993). Valores de bootstrap estão indicados na árvore.

Discussão

A extração de DNA implicou em qualidade e quantidade de material suficiente para se realizar as reações de amplificação e, posteriormente, o sequenciamento das amostras (CRISPIM *et al.* 2012) e esse resultado pode ser observado na Figura 2.

SHOUCHE e PATOLE (2000) obtiveram fragmentos de 500 pb após a PCR com os mesmos primers utilizados nesse estudo, porém apenas 250 pb foram lidos com qualidade no sequenciamento portanto, para preencher os vazios, utilizaram primers adicionais obtendo ao final sequências com 450 pb. Já o sequenciamento realizado no presente estudo resultou em sequências com 490 pb em boa qualidade, de uma região de 650 pb do gene 16S rRNA, utilizando apenas os primers já citados, portanto concluiu-se que a qualidade do sequenciamento foi suficiente para se realizar as análises filogenéticas apresentadas.

Na Fig. 3 foi possível identificar a existência de duas classes na árvore filogenética: Mammalia (mamíferos) e Actinopterygii (peixes). Dentro da classe Mammalia foram observadas duas subfamílias: Bovinae e Caprinae, e para a classe Actinopterygii foram observados animais da ordem Caraciforme

(curimba e piau) e Siluriforme (pintado e cachara) sendo os últimos pertencentes ao mesmo gênero.

A identificação das diferentes espécies de peixes no presente estudo demonstrou a possibilidade da utilização da tecnologia de marcadores moleculares de mtDNA como ferramenta adicional para identificação e diferenciação de espécies auxiliando o trabalho de taxonomistas.

Em estudo utilizando o sequenciamento parcial da região 16S rRNA, TOLEDO (2009) conseguiu identificar diferentes estirpes de rizóbios com base na similaridade do gene no BLAST e confirmou a classificação taxonômica das estirpes Semia, recomendadas para inoculação de leguminosas previamente disponíveis na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), elaborada com base em propriedades morfológicas e especificidade hospedeira, para a maior parte das estirpes.

CARVALHO (2008) comprovou em seu estudo de identificação genética, por meio do mesmo marcador utilizado no presente estudo, que híbridos de surubim vêm sendo cultivados em piscicultura no lugar de espécies puras. Assim sendo, a técnica utilizada também pode ter grande importância para a conservação dos estoques naturais, podendo ser aplicada na identificação de fraudes na venda de supostos surubim puros, evitando a utilização de híbridos na formação de estoques genéticos puros.

Segundo GIROTTO *et al.* (2012), por meio do alinhamento de um fragmento de 500pb da região 16S rRNA com sequências disponíveis no GenBank[®] (encontrando 100% de identidade), seu trabalho permitiu a confirmação molecular do hemoplasma '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' ('C. M. haemobos') em bovinos das raças Holandesa e Jersey do Brasil, com alta ocorrência também em gados domésticos e podendo ter impacto significativo na pecuária.

Sendo assim, o sequenciamento parcial da região do gene 16S rRNA foi suficiente para a identificação de ovinos, bovinos e as diferentes espécies de peixes deste trabalho com base na similaridade das sequências para esse mesmo gene no GenBank[®].

Agradecimentos: À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), à Universidade Federal da Grande Dourados e ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho em Jaboticabal, SP.

Referências

BENSON, D.A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; SAYERS, E.W. 2012. GenBank. Nucleic Acids Research 41:36–42.

BOLZAN, A. R. 2011. DNA *barcode* de *Drosophilídeos micófagos pertencentes ao gênero Hirtodrosophila, Mycodrosophila e Zigothrica*. Universidade Federal da Santa Maria. Santa Maria, Brasil.

CARVALHO, D.C. 2008. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). Revista Brasileira de Reprodução Animal 258:215–219.

CHUEIRE, L.M.O.; BANGEL, E.V.; MOSTASSO, F.L.; CAMPO, R.J.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. 2003. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. Revista Brasileira de Ciência do Solo 1027:833–840.

CRISPIM, B.A.; SANTOS, D.B.S.; BANARI, A.C.; SENO, L.O.; GRISOLIA, A.B. 2012. Discriminação alélica em ovinos naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por meio de marcadores microssatélites. Journal of the Selva Andina Research Society 3:3–13.

DAMINELI, A.; DAMINELI, D.S.C. 2007. Origens da vida. Estudos Avançados (USP, Impresso) 21:263–284.

GIROTTO, A.; ZANGIRÓLOMO, A.F.; BOGADO, A.L.G.; SOUZA, A.S.L.; SILVA, G.C.F.; GARCIA, J.L.; VILAS BOAS, L.A.; BIONDO, A.W.; VIDOTTO, O. 2012. Molecular detection and occurrence of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' in dairy cattle of Southern Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 21(3):342–344.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 270:313–322.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWARD, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B) 270:96–99.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P.A.; McWILLIAN, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, L.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947–2948.

MEYER, A. 1994. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends in Ecology & Evolution* 9(8):278–280.

OLSON, Z. H.; WHITTAKER, D. G.; RHODES JR, O. E. 2009. The use of molecular markers in wild sheep research in North America: a review. *Proceeding of the Northern Wild Sheep and Goat Council Biennial Symposium* 16:251–269.

ORREGO, L.E.O. 2012. *Análise filogeográfica de Brachyplatystoma platynemum (Siluriformes: Pimelodidae)*. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, Brasil.

PALUMBI, S.R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. Págs. 205-247 em: Hillis, D.M.; Moritz, C.; Mable, B.K. (eds), *Molecular Systematics*. Sinauer & Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.

SHOUCHE, Y.S.; PATOLE, M.S. 2000. Sequence analysis of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene fragment from seven mosquito species. *Journal of Biosciences* 25(4):361–366.

SILVA, S.A.; KAVALCO, K.F.; PAZZA, R. 2012. Uso do sequenciamento de genes mitocondriais na identificação de files de salmão. *Evolução e Conservação da Biodiversidade* 3(2):64–67.

TAMURA, K.; NEI, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3):512–526.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731–2739.

TOLEDO, B.F.B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E.G.M. 2009. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de seqüenciamento parcial do 16S rRNA. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44(4):384–391.