

Aquicultura no Brasil: Novas Perspectivas

Volume 1

**Aspectos Biológicos, Fisiológicos e Sanitários de
Organismos Aquáticos**



O livro "Aquicultura no Brasil – Novas
Perspectivas" faz parte das ações do:



Financiado por:

Edital: 081/2013-L1 - Processo número: 487639/2013-8

CNPq: 472054/2013-9



Ministério da
Educação

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Ministério do
Desenvolvimento Agrário

Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação

Ministério da
Pecuária e Agricultura



Marcos Tavares-Dias
Embrapa Amapá (Macapá, AP)

Wagner dos Santos Mariano
Universidade Federal de Tocantins (Araguaína, TO)
(Organizadores)

Aquicultura no Brasil: novas Perspectivas

Volume 1
Aspectos Biológicos, Fisiológicos e Sanitários de
Organismos Aquáticos



Copyright © dos autores

Todos os direitos garantidos. Qualquer parte desta obra pode ser reproduzida, transmitida ou arquivada desde que levados em conta os direitos dos autores.

Marcos Tavares-Dias; Wagner dos Santos Mariano [Orgs.]

Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. [Vol. 1]. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. 429p.

ISBN. 978-85-7993-271-7

1. Aquicultura. 2. Organismos aquáticos cultiváveis. 3. Tecnologia de pescados. 4. Autores. I. Título.

CDD - 590

Capa: Hélio Márcio Pajeú

Ilustrações da capa: Andréa Franklin Queiroz Alves

Editores: Pedro Amaro de Moura Brito & João Rodrigo de Moura Brito

Conselho Científico da Pedro & João Editores:

Augusto Ponzio (Bari/Itália); João Wanderley Geraldi (Unicamp/Brasil); Nair F. Gurgel do Amaral (UNIR/Brasil); Maria Isabel de Moura (UFSCar/Brasil); Maria da Piedade Resende da Costa (UFSCar/Brasil); Rogério Drago (UFES/Brasil).



Pedro & João Editores
www.pedroejoaoeditores.com.br
13568-878 - São Carlos - SP
2015

CAPÍTULO 4

MARCADORES MOLECULARES E SUAS APLICAÇÕES NA AQUICULTURA

Fábio Mendonça Diniz¹

INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial e o conseqüente aumento da demanda por alimentos de alto valor protéico têm contribuído para que a aquicultura se torne o setor alimentício de maior crescimento em diversos países. Os pescados tais como peixes, crustáceos e moluscos, representam hoje 17% do consumo global de proteína. A aquicultura, por sua vez, contribui com cerca de 41% da produção total de pescado, ou cerca de 63,6 milhões de toneladas de peixe e crustáceos anualmente, segundo o Subcomitê de Comércio Pesqueiro da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. A Fao estima que a produção aquícola deve alcançar cerca de 70 milhões de toneladas em 2013, o que representa 44% da produção total de peixes e 49% do pescado para consumo humano direto (Fao, 2012).

Ressalta-se também que a criação de organismos aquáticos sob condições controladas tem representado também um importante papel na geração de novos empregos e renda na economia rural no Brasil, uma vez que o país apresenta grande disponibilidade de recursos naturais e forte possibilidade de utilização da aquicultura por produtores familiares.

No Brasil, os principais organismos aquáticos cultivados são os peixes de água doce tais como tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), carpas (*Cyprinus* spp.) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), além do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus*

Diniz. Marcadores moleculares e suas aplicações na aquicultura. In: Tavares-Dias, M. & Mariano, W.S. (Org.). Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. São Carlos, Editora Pedro & João, 2015.

vannamei) e mexilhão (*Perna perna*). O cultivo do bijupirá (*Rachycentron canadum*) e pirarucu (*Arapaima gigas*) mostra-se promissor na aquicultura industrial; porém, esses apresentam ainda alguns problemas na produção de alevinos (Resende et al., 2008).

Os avanços na biologia molecular nas últimas três décadas, principalmente com o surgimento de novas ferramentas moleculares, têm sinalizado a possibilidade de um grande aumento da produção aquícola no mundo. Neste contexto, com o uso de marcadores moleculares tornou possível observar e explorar a variação genética (por exemplo, polimorfismo) no genoma inteiro, entre indivíduos. Dessa forma, seu uso tem proporcionado à aquicultura moderna informações valiosas para numerosos aspectos da prática aquícola como a identificação de sexo em espécies que não apresentam dimorfismo sexual fenotípico aparente, estudos de parentesco, identificação e discriminação genética de estoques sob cultivo, caracterização genética para preservação da diversidade e variabilidade, e o melhoramento genético da espécie aquícola para produção de organismos de melhor performance (Figura 1) dentre tantas outras aplicações (Ferguson, 1994; Liu & Cordes, 2004). Uma outra aplicação importante dos marcadores moleculares na aquicultura é a construção de mapas de ligação genética de alta resolução para espécies aquícolas. O uso dos marcadores moleculares na aquicultura tem também aberto novas oportunidades para o aumento da produção aquícola e melhor qualidade dos organismos cultivados (Figura 1), tais como qualidade da carne e resistência às doenças (Altunok, 2012).

Neste capítulo, as características de três marcadores moleculares baseados na reação de polimerase em cadeia (PCR), do mais amplamente usado até o de uso mais promissor, juntamente com suas características e aplicações são apresentadas, tendo em vista sua utilidade na aquicultura.

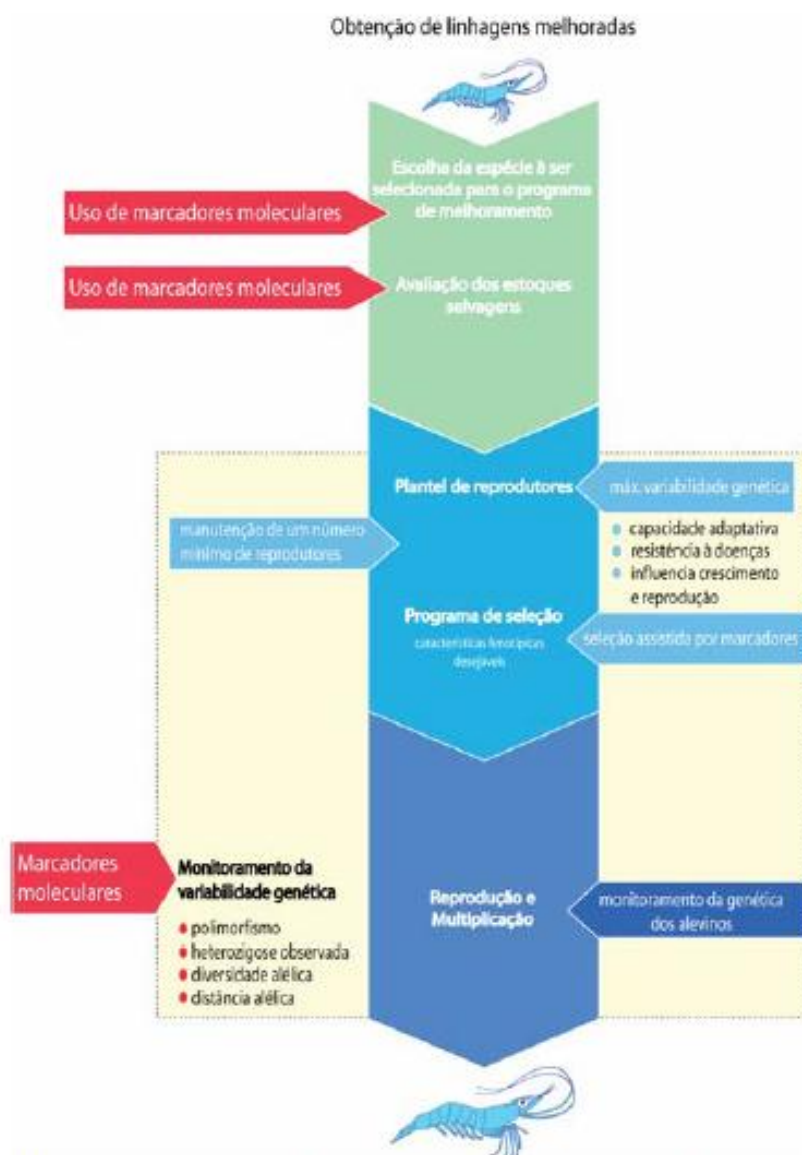


Figura 1. Uso de marcadores moleculares para obtenção de linhagens melhorada.

MARCADORES MOLECULARES E SEUS PRINCÍPIOS

Um marcador molecular pode ser definido como uma variação específica no DNA, entre indivíduos, associada a uma determinada característica (Avise, 1994; Deb et al. 2012). Essa variação genética ocorre ao nível da seqüência de DNA por meio de (i) mutações pontuais ou substituição de bases nucleotídicas, (ii) indels (inserção ou deleção) de pequenos trechos na sequencia do DNA do organismo estudado, e (iii) recombinação e rearranjos genômicos (Figura 2). Entre os muitos tipos de marcadores moleculares

existentes, amplamente descritos na literatura, três mostram-se particularmente úteis à genética aplicada à aquicultura: microssatélites de DNA (STRs), o polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), e o polimorfismo de etiquetas de sequências expressas (ESTPs).

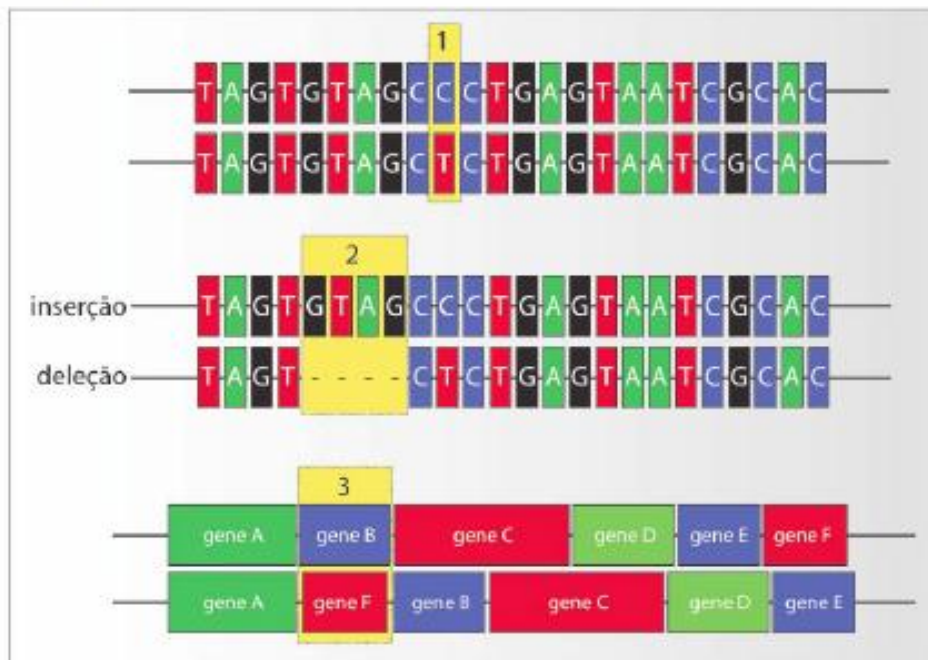


Figura 2. Representação gráfica da variação genética ao nível da sequência de DNA: (1) mutações pontuais ou substituição de bases nucleotídicas, (2) indels (inserção ou deleção) de pequenos trechos na sequência do DNA do organismo estudado, e (3) recombinação e rearranjos genômicos.

MARCADORES BASEADOS NA REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Microssatélites de DNA

Microssatélites são sequências nucleotídicas simples repetidas em blocos e distribuídas de maneira homogênea ao longo de todo o genoma de vertebrados e invertebrados, cujo número de unidades repetitivas é variável (Figura 3). As repetições em cada bloco são curtas, de 2 a 5 nucleotídeos, e por esta razão, por vezes, podem ser denominados de *Short Tandem Repeats* (STR). Estes marcadores, em geral, representam *loci* seletivamente neutros, são co-dominantes e altamente polimórficos (variáveis) em plantas,

animais e microorganismos, podendo detectar elevado nível de diversidade genética ou alélica (McCouch et al., 1997; Goldstein e Schlötterer, 1999). Cada região genômica que apresente estes blocos com repetições simples, por exemplo (CA/GT)_n, (GCT/CGA)_n, (GATA/CTAT)_n, constitui-se em um *locus*, provavelmente altamente variável entre indivíduos de uma mesma espécie, uma vez que a região apresenta uma alta taxa de mutação. Diferentes alelos podem se apresentar entre indivíduos, desde que exista polimorfismo naquele *locus* estudado. Portanto, microssatélites de DNA são marcadores multialélicos e altamente informativos por acumular com facilidade variações no número de repetições (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Os *loci* de microssatélites exibem frequentemente níveis elevados de variação dentro e entre populações. O polimorfismo em microssatélites foi inicialmente demonstrado por Tautz (1989) e Weber & May (1989). Marcadores microssatélites são desenvolvidos utilizando diferentes estratégias, a mais comum através da construção de biblioteca genômica enriquecida para regiões de repetições de interesse (Zane et al., 2002; Diniz et al., 2004). *Primers* são posteriormente desenhados nas regiões que flanqueiam os microssatélites, regiões estas altamente conservadas e não repetitivas (Figura 3), tornando-se possível caracterizar o número de repetições naquele *locus*.

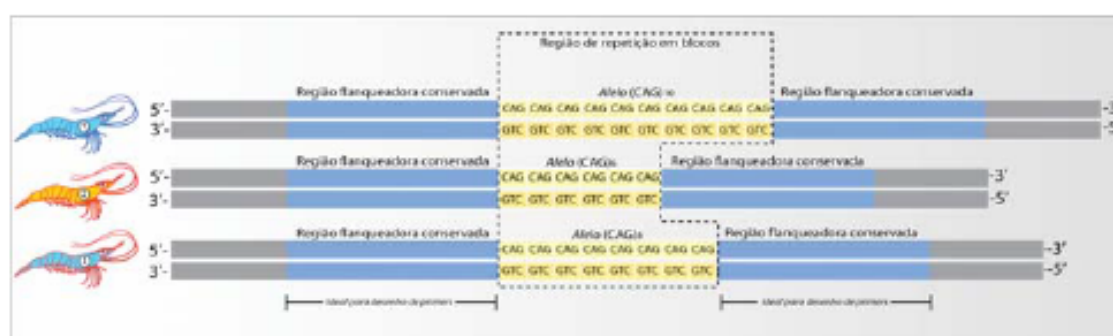


Figura 3. Representação de regiões de repetição apresentando seu caráter multialélico em um *locus* microssatélite do tipo trinucleotídeo.

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é então usada para amplificação dos *loci* de microssatélites usados como marcadores em

uma espécie, a partir quantidades muito pequenas de DNA (<100 ng). Após a PCR os alelos são separados e seu tamanho medido em pares de base através de um gel de poliacrilamida, com pelo aparecimento de uma ou duas bandas (Figura 4). A genotipagem dos microssatélites pode ser também realizada em analisadores de DNA (por exemplo, sequenciadores) de uma maneira muito menos laboriosa.

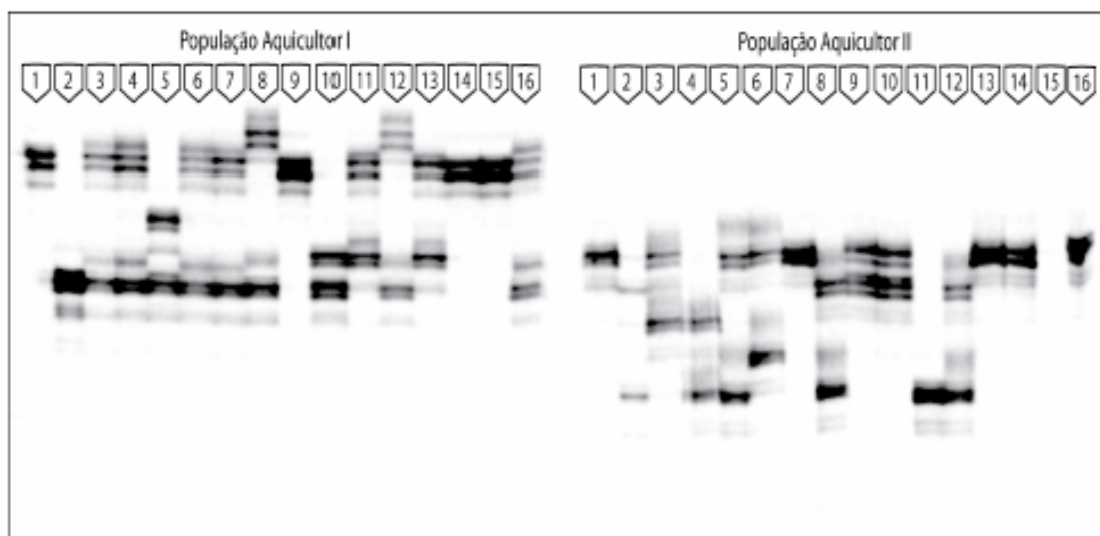


Figura 4. Revelação de microssatélites em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata.

Vantagens e desvantagens técnicas

São inúmeras as vantagens apresentadas por microssatélites, dentre elas ressalta-se o caráter de codominância destes marcadores (indivíduo heterozigoto pode ser distinto de um indivíduo homozigoto), sua hipervariabilidade e alto polimorfismo, alto conteúdo informativo, sua abundância no genoma de eucariotos, uniformidade no seu modo de evolução e alta taxa de mutação quando comparado com outras regiões gênicas.

Talvez a maior desvantagem que marcadores microssatélites apresentem é a necessidade de isolamento destas sequencias repetitivas no genoma da espécie de interesse, sendo necessário a construção de biblioteca genômicas enriquecidas para sequencias repetitivas específicas e posterior desenho de *primers* nas regiões que as flanqueiam (Matioli & Passos-Bueno, 2001; Diniz et al., 2005).

Todo o processo é oneroso e laborioso, exigindo um conhecimento mais aprofundado de diversas técnicas da Biologia Molecular. Não obstante, o aparecimento de novas tecnologias de sequenciamento (por exemplo, Next Generation Sequencing) tem facilitado em muito este trabalho (Souza et al. 2014).

Nem todos os marcadores microssatélites indicam níveis elevados de variação alélica. Alguns podem apresentar apenas 2 alelos, porém muitos apresentam mais que uma dezena de alelos. Adicionalmente, a presença de alelos nulos (i.e. alelos que não são amplificados na reação de PCR pelo surgimento de mutações nos sítios de anelamento) pode mascarar o número de indivíduos heterozigóticos e, por sua vez, serem confundidos como homozigóticos (Bruford & Wayne, 1993). A homoplasia por tamanho, ou seja, alelos idênticos em tamanho, mas não em sequência, pode também surgir como um problema na análise dos dados por reduzir o número de alelos observados por população, a proporção de indivíduos heterozigóticos e a diversidade genética (Estoup et al., 1995).

Aplicações

Basicamente, aos microssatélites são os marcadores mais comumente usados em estudos de diversidade genética, assim como para a análise de parentesco e construção de mapas de ligação que servem de base para a identificação de traços quantitativos (QTLs). Características como co-dominância e multialelismo conferem a estes marcadores elevado conteúdo de informação polimórfica, ideais para mapeamento genético e físico de genomas (Dor et al. 2014), e a identificação e discriminação de genótipos (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Por esta razão, o isolamento e caracterização de marcadores microssatélites para espécies cultivadas e com potencial de cultivo (An et al., 2014; McCraney et al., 2012) ainda são intensos.

Mesmo microssatélites que apresentem somente alguns alelos são adequados para estudos de genética populacional, observando-se cada caso, é claro. *Loci* de microssatélites altamente variáveis apresentam-se como ideais para o mapeamento genômico

da espécie e análise de pedigree e também têm grande potencial como etiquetas genéticas (*genetic tags*) para uso na aquicultura. *Loci* fixos ou muito pouco polimórficos podem ser usados para resolver ambigüidades taxonomic em diferentes espécies (Backer et al., 2002).

Na aquicultura especificamente, os marcadores microssatélites têm confirmado sua utilidade em inúmeras aplicações que incluem: avaliação de parentesco (Novel et al., 2010; Grzybowski et al., 2010), monitoramento da variabilidade genética em estoques selvagens (Ha et al., 2009) e cultivados (Zhang et al., 2010; Lafarga et al., 2010), a avaliação das ações de repovoamento de espécies aquícolas em perigo de extinção ou com potencial de cultivo (Dantas et al., 2013; Borrell et al., 2014), apoio à ações de gestão na aquicultura visando minimizar a perda da diversidade genética ao longo do tempo de cultivo (Wang et al., 2012), identificação de famílias e planteis de reprodutores (Maggioni et al., 2006), mapeamento genético, e detecção de QTLs (Wright and Bentzen, 1994; O'Connell & Wright, 1997; Chistiakov et al., 2006).

POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO

O polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples (*Single Nucleotide Polymorphism; SNP*) descreve os polimorfismos causados por mutações pontuais, ou seja, que afetam somente uma base nucleotídica (adenina, timina, citosina ou guanina) na sequência do genoma, gerando diferentes alelos contendo bases nucleotídicas alternativas em uma dada posição do nucleotídeo, dentro de um *locus*, sendo assim marcadores bi-alelicos (Figura 5). Desta forma, SNPs revelam o polimorfismo mais abundante no genoma, aproximadamente um por kilobase da sequência genômica (Sachidanandam et al., 2001), quer em regiões codificantes ou não. SNPs são marcadores geneticamente estáveis, e herdados co-dominantemente. É facilmente adaptável à automatização, e revelam o polimorfismo por vezes não detectado por meio de outros marcadores ou métodos (Morin et al., 1994; Stoneking, 2001; Vignal et al., 2002; Liu & Cordes, 2004). Uma vez descobertos, esses SNPs poderão ser facilmente analisados por meio

da utilização de vários métodos, dentre eles a PCR ou *DNA chips/microarrays* (microarranjos de DNA) (Ohnishi et al., 2001). Os polimorfismos de nucleotídeo único podem ser descobertos utilizando-se diferentes estratégias, porém o sequenciamento do DNA é o mais usado e o de maior acurácia (Vignal et al., 2002). Os recentes avanços nas tecnologias de sequenciamento do genoma (por exemplo, next generation sequencing) têm propiciado uma grande facilidade de descoberta destes SNPs, e o surgimento de novas ferramentas como os arrays de alta densidade de SNPs (*high density single nucleotide polymorphism arrays*; HD-SNP) para análise genética e genômica de animais de criação (Fan et al., 2010). Contudo, o potencial de SNPs como marcadores moleculares na aquicultura é ainda subestimado.

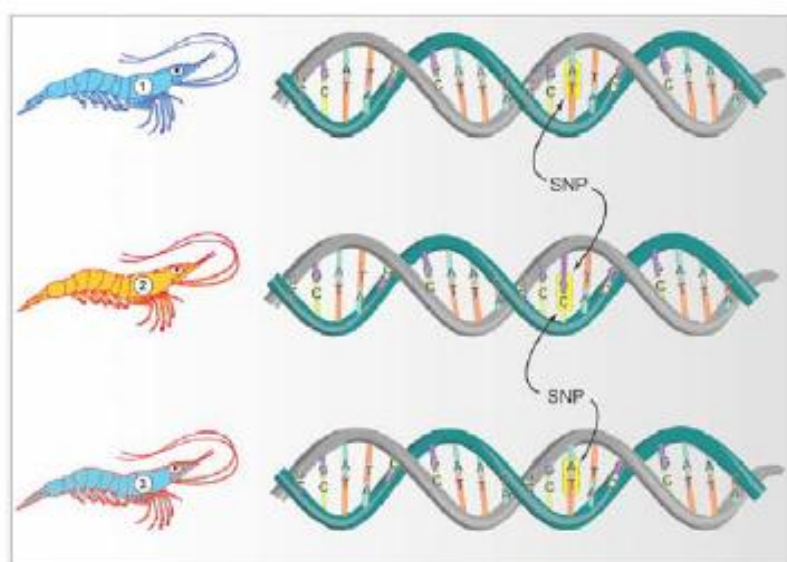


Figura 5. Mutações pontuais na sequência do DNA de 3 diferentes indivíduos caracterizando um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP).

Vantagens e desvantagens técnicas

SNPs são os mais abundantes tipos de polimorfismo no genoma de eucariotos (Sachidanandam et al., 2001; Hirschhorn & Daly, 2005), geneticamente estáveis, e o processo de genotipagem pode ser facilmente ajustado para automação (Vignal et al., 2002; Stoneking, 2001; Lai, 2001). No entanto, são marcadores menos informativos que microssatélites, e estima-se que para fornecer a

mesma quantidade de informação que um único *locus* de microssatélites sejam necessários 5 SNPs. Essa desvantagem, porém, é facilmente superada pelo emprego de tecnologia de genotipagem em larga escala (por exemplo, IlluminaTM and AffymetrixTM) (Gjedrem & Baranski, 2009).

Aplicações

Embora a maioria dos SNPs situam-se em regiões não-codificantes, e por esta razão não apresentam um impacto direto no fenótipo de um indivíduo, alguns SNPs têm o potencial de detectar variações genéticas funcionais, por introduzirem mutações em sequências expressas ou em regiões que influenciam a expressão genética (por exemplo, regiões promotoras), e portanto podem induzir mudanças na estrutura da proteína e sua regulação (Beuzen, 2000). Estes SNPs são marcadores mais apropriados para seleção ao longo do tempo.

Sua utilização na construção de mapas genéticos de ligação e análise genética de QTLs (Yan et al., 2013; Jin et al., 2012; Sauvage et al., 2007), determinação de paternidade (Trinh et al., 2013), programas de criação (Pustovrh et al., 2012), quantificação de introgressão genética no ambiente natural por escapes de indivíduos cultivados (Glover et al., 2013), construção de microarranjos de alta densidade para análise de características de performance e produção (Liu et al., 2011) em diversas espécies cultivadas é descrita na literatura. Um número maior de marcadores estão sendo descobertos (Bester et al., 2013; Vera et al., 2013; Xia et al., 2010; Zhang, Liusuo & Ximing, 2010) inclusive em espécies nativas com potencial aquícola (Blanck et al. 2013). Estes SNPs serão úteis para acessar a variação genética de populações e estudar suas relações com características do interesse para a aquicultura. Em ambos os casos, favorecendo a conservação dos estoques naturais e cultivados.

POLIMORFISMO DE ETIQUETAS DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS

Etiquetas de sequências expressas (*Expressed sequence tag*; ESTs) são pequenos e incompletos fragmentos de DNA de genes expressos obtidas pelo sequenciamento parcial de clones de cDNA (Adams et al., 1991; KHECHUMIAN et al., 1989). As diferenças na sequência de DNA entre duas ou mais ESTs podem ser usadas como marcador (Polimorfismo de etiquetas de sequências expressas, ESTPs; Figura 6). Este polimorfismo pode ser detectado pela (i) digestão (restrição) dos ESTs; (ii) por PCR, pela amplificação de DNA genômico com *primers* desenhados em fragmentos de cDNA sequenciados, observando-se assim, diferenças no tamanho do fragmento amplificado; (iii) ou pelo exame de diferenças de mobilidade por meio de uma eletroforese em gel de gradiente desnaturante-DGGE (Pelgas et al. 2004). Marcadores ESTPs são co-dominantes e multialélicos e podem ser usados para analisar o polimorfismo na sequência de DNA em populações ou servir como marcadores em procedimentos de mapeamento genético (Boguski & Schuler, 1995). ESTs são úteis para o mapeamento de espécies aquícolas somente se ESTPs são identificados (Liu et al., 1999). Como o avanço das técnicas de sequenciamento genômico tornou-se mais fácil desenvolver marcadores ESTPs ligados, por exemplo, a importantes características fenotípicas (por exemplo, tamanho do peixe). Dessa forma, ESTPs tem grande potencial para estudos de variação genética adaptativa na aquicultura.

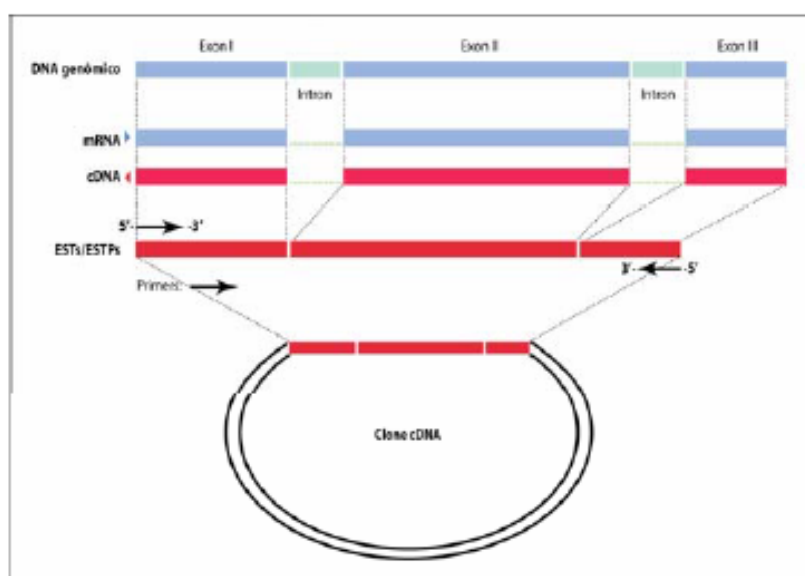


Figura 6. Etiquetas de seqüências expressas (ESTs) obtidas pelo sequenciamento parcial de clones de cDNA. As diferenças na seqüencia de DNA entre duas ou mais ESTs podem ser usadas como marcador caracterizando o polimorfismo de etiquetas de seqüências expressas (ESTPs).

Vantagens e desvantagens técnicas

Como ESTs são resultantes de sequenciamento único é comum observar erros nas base nucleotídicas fruto do sequenciamento. As seqüências são, geralmente, curtas (aprox. 300 pb) e ocorrência de múltiplas cópias de um único fragmento (Liang et al., 2000; Wang et al., 2004).

Aplicações

ESTs são utilizadas na construção de mapas físicos, na caracterização de grandes seqüências genômicas e transcritas, na identificação de novos genes e análises de expressão gênica diferencial (Zweiger & Scott, 1997; Schmutz & Grimwood, 2004). O polimorfismo identificado nestas seqüências de DNA pode ser usado como um marcador ortólogo no mapeamento comparativo do genoma (Dreyer et al., 2007) visando também a identificação de genes de função conhecida, ou genes candidatos que afetem importantes características genéticas (*genetic traits*) de interesse econômico (Andersson & Georges, 2004) em espécies aquícolas. Além disso, ESTPs podem ser empregados como marcadores em

uma seleção inicial do material disponível para um programa de melhoramento na aquicultura.

Bancos de EST (por exemplo, dbEST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) estão disponíveis para diversas espécies cultivadas. O banco para ostra (*Crassostrea gigas*), por exemplo, conta com 206.388 ESTs, para a tilápia-do-nylo (*O. niloticus*) 120.991 ESTs, para o camarão-branco (*L. vannamei*) são 161.248 ESTs, e a coleção de EST obtidas para o camarão gigante da Malásia (*Macrobrachium rosenbergii*), depositadas no NCBI (dbEST), totaliza 4.427 ESTs. Espera-se que estas bases de dados de ESTs sejam mais amplamente utilizadas como fonte de informação genômica (por exemplo, ESTPs, construção de plataformas de microarranjos, etc.) para aplicação no desenvolvimento da aquicultura nos próximos anos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estimativas indicam que a aquicultura abastecerá cerca de dois terços do consumo global de pescado até 2030 (World Bank/FAO/IFPRI, 2013). Dessa forma, é possível compreender que o futuro da aquicultura no Brasil, como atividade produtiva, deva passar pelo melhoramento genético de espécies já cultivadas (ainda explorado de maneira clássica), mas principalmente pelo melhoramento de espécies nativas, objetivando o aumento dos índices de produtividade (RESENDE et al., 2008). As grandes reservas de água e a ictiofauna brasileira que compreende, por exemplo, aproximadamente 2.300 espécies de água doce (Reis et al., 2003), garantem ao país o excelente potencial para a expansão da carcinicultura e piscicultura. Por sua vez, o uso e aumento no número de marcadores moleculares e construção de mapas genéticos de alta densidade, assim como a implementação de recursos genômicos já disponíveis (sequenciamento genômico por tecnologias NGS – *Next Generation Sequencing*), poderão fornecer ferramentas valiosas para o melhoramento genético de espécies aquícolas nas suas mais diversas estratégias/etapas, mas principalmente na seleção assistida por marcadores (SAM).

Tendo em vista o crescente interesse de diversos segmentos da aquicultura (por exemplo, carcinicultura) em explorar o cultivo comercial de espécies nativas faz-se necessário que a utilização desses recursos biológicos provenientes de ecossistemas aquáticos deva ser precedida de levantamentos sobre a situação das espécies atualmente utilizadas, como também daquelas com potencial de cultivo. É particularmente importante o emprego de marcadores moleculares em estudos com estas espécies visando o desenvolvimento de estratégias para sua conservação através da proteção dos ambientes naturais e de diretrizes de manejo pesqueiro de populações selvagens ou cultivadas, base essencial para o fortalecimento da atividade aquícola. Conhecer e conservar a diversidade genética de espécies aquícolas, é um dos requisitos para que estoques pesqueiros e cultivados sejam sustentáveis a médio e longo prazo (Hilsdorf, 2011). Estes estudos também facilitarão o monitoramento e seleção, em populações naturais, de plantéis viáveis ao cultivo de espécies nativas de peixes, crustáceos ou moluscos. A própria sustentabilidade da atividade deve passar pela implementação de técnicas moleculares modernas disponíveis atualmente e baseadas na análise de DNA (Preston & Clifford, 2002).

Não podemos mais permitir que reprodutores de espécies com maior potencial aquícola sejam retirados do meio ambiente sem que questões importantes tenham sido antes respondidas a respeito da variabilidade genética de suas populações naturais; a estimativa do grau de similaridade entre populações e espécies, a distribuição filogeográfica no meio ambiente tendo em vista aspectos relacionados a origem e a história recente de suas populações, dentre outras. Essas respostas podem ser facilmente encontradas com pesquisas que envolvam o uso de marcadores moleculares como ferramentas biotecnológicas (Hilsdorf, 1997).

Apesar do maior avanço tecnológico da genética molecular observado nos últimos 10 anos, e do intenso uso de marcadores moleculares para abordar questões referentes à ecologia e conservação de populações naturais e recursos pesqueiros, as aplicações de marcadores de DNA em seleção e melhoramento

genético de espécies aquícolas tem ainda se restringido a poucas espécies de interesse econômico, e desta forma, este conhecimento precisa ser difundido entre os gestores do setor da aquicultura para que sirva como ferramenta de apoio à tomada de decisão. A maior facilidade apresentada com as tecnologias de nova geração de sequenciamento deverão, adicionalmente, gerar grande quantidade de dados oriundos de espécies de interesse. A identificação de SNPs em grandes quantidades, consistirá também uma ferramenta para a busca de correlações entre genótipos e fenótipos com maior acurácia do que pelo uso de alguns poucos marcadores individuais.

Espera-se que parcerias entre o meio acadêmico e o setor produtivo sejam criadas para incentivar o surgimento de iniciativas científicas promissoras que possam seguir os moldes bem sucedidos do Projeto Genoma Humano, objetivando a identificação e análise dos diferentes perfis polimórficos de marcadores (por exemplo, SNPs, ESTPs, outros) em diversas espécies aquícolas no mundo, em especial em nosso país.

Em suma, são diversas as possibilidades de uso dos marcadores moleculares como uma ferramenta moderna que possibilitará o aumento e maior diversificação da produção na aquicultura. No entanto, é preciso que o conhecimento destas tecnologias, ainda mais restrito ao meio acadêmico, possa ser difundido no setor aquícola de maneira que estas ferramentas possam se tornar verdadeiramente disponíveis aos pequenos ou grandes produtores, quer de maneira direta ou indireta. Os esforços no sentido de conhecer geneticamente nossos recursos aquáticos por meio de marcadores moleculares e a disponibilidade destas ferramentas poderão garantir que a aquicultura continue a crescer como uma das atividades produtoras de alimentos mais promissoras no mundo.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.F.; KERLAVAGE, A. R.; MCCOMBIE, W. R.; VENTER, J. C.

Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252(5013):1651-1656, 1991.

ALTUNOK, M. Biotechnology and Aquaculture in Sustainable Development. In: 3rd International Symposium on Sustainable Development, May 31 - June 01 2012, Sarajevo, 2012.

AN, HYE SUCK; KANG, HEE WOONG; HAN, HYON SOB et al. Isolation and characterization of 26 novel polynucleotide microsatellites from short barbeled grunter (*Haplogenys nitens*) for genetic analysis. *Conservation Genetics Resources*, 6 (3): 669-672, 2014.

ANDERSSON, L.; GEORGES, M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nature Reviews Genetics* 5: 202-12, 2004.

AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York, London, 1994.

BACKER, J.; BENTZEN, P.; MORAN, P. Molecular markers distinguish coastal cutthroat trout from coastal rainbow trout/steelhead and their hybrids. *Transaction of American Fisheries Society*, 131(3): 404-417, 2002.

BESTER-VAN DER MERWE, ALETTA; BLAAUW, SONJA; DU PLESSIS, JANA et al. Transcriptome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs) for abalone (*Haliotis midae*): validation and application using goldengate medium-throughput genotyping assays. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (9): 19341-19360, 2013.

BEUZEN, N. D.; STEAR, M. J.; CHANG, K.C. Molecular marker and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*, 160: 42-52. 2000.

BLANCK, D. V.; FREITAS, W. C.; GALETTI JUNIOR, P. D. MANOEL, P. Isolation and characterization of SNPs within HSC70 gene in the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Conservation Genetics Resources*, 5(3): 631-633, 2013.

BOGUSKI, M. S.; SCHULER, G. D. Establishing a human transcript map. *Nature Genetics*, 10(4): 369-371, 1995.

BORRELL, Y. J.; ARIAS-PEREZ, A.; FREIRE, R.; et al. Microsatellites and multiplex PCRs for assessing aquaculture practices of the grooved carpet shell *Ruditapes decussatus* in Spain. *Aquaculture*, 426: 49-59, 2014.

BRUFORD, M. W.; WAYNE, R. K. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3: 939-943, 1993.

CHISTIYAKOV D.; HELLEMANS B.; F.A.M. VOLCKAERT. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function, and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255:1-29, 2006.

DANTAS, H. L.; NETO, M. A. D.; OLIVEIRA, K. K. C.; SEVERI, W.; DINIZ, F. M.; COIMBRA, M. R. M. Genetic Diversity of Captive and Wild Threatened Catfish *Pseudoplatystoma corruscans* in the São Francisco River. *Reviews in Fisheries Science*, 21(3-4): 237-246, 2013.

DEB, R.; CHAKRABORTY, S.; SINGH, U. Molecular markers and their application in livestock genomic research. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 3:e108, 2012. doi:10.4172/2157-7579.1000e108.

DINIZ, F. M.; MACLEAN, N.; OGAWA, M.; PATERSON, I. G.; BENTZEN, P. Microsatellites in the overexploited spiny lobster, *Panulirus argus*: Isolation, characterization of loci and potential for intraspecific variability studies. *Conservation Genetics* 6 (4): 637-641. 2005.

DINIZ, F. M.; MACLEAN, N.; PATERSON, I. G.; BENTZEN, P. Polymorphic tetranucleotide microsatellite markers in the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 327-329, 2004.

DOR, L.; SHIRAK, A.; GORSHKOV, S.; et al. Construction of a microsatellites-based linkage map for the white grouper (*Epinephelus aeneus*). *G3-Genes Genomes Genetics*, 4 (8): 1455-1464, 2014.

DREYER, C.; HOFFMANN, M.; LANZ, C.; et al. ESTs and EST-linked polymorphisms for genetic mapping and phylogenetic reconstruction in the guppy, *Poecilia reticulata*. *BMC Genomics*, 8:269, 2007.

ESTOUP, A.; TAILLIEZ, C.; CORNEET, J. M.; SOLIGNAC, M. Size homoplasy and mutational process of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution*, 12: 1074-1084, 1995.

FAN, B.; ZHI-QIANG, D.; DANIELLE, M.; GORBACH, M.; ROTHSCHILD, F. Development and application of high-density SNP arrays in genomic studies of domestic animals. *Asian-Aust. The Journal of Animal Science*, 23: 833-847, 2010.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2012. Rome, FAO. 2012.

FERGUSON, M. The role of molecular genetic markers in the management of cultured fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4:351-373, 1994.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20). 1998.

GJEDREM, T.; BARANSKI, M. Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction. New York: Springer, 2009.

GLOVER, K. A.; PERTOLDI, C.; BESNIER, F.; et al. Atlantic salmon populations invaded by farmed escapees: quantifying genetic introgression with a Bayesian approach and SNPs. *BMC Genetics*, 14: 74, 2013.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, Oxford, 1999.

GRZYBOWSKI, M.; SEPULVEDA-VILLET, O. J.; STEPIEN, C. A.; et al. Genetic variation of 17 wild yellow perch populations from the midwest and east coast analyzed via microsatellites. *Transactions of the American Fisheries Society*, 139 (1):270-287, 2010.

HA, H. P.; NGUYEN, T. T. T.; POOMPUANG, S. et al. Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of

- striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Vietnam. *Aquaculture*, 291 (3-4):154-160,2009.
- HILSDORF, A.W.S. Ferramentas moleculares aplicadas à pesca e aquicultura. X Reunião Científica do Instituto de Pesca, São Paulo, SP-Brasil.(ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/10recip/palestras/X_ReCIP_p5_14-7.pdf).
- HILSDORF, A. W. S. *Biologia Molecular: Uma realidade para a aquicultura*. Panorama da Aquicultura, Janeiro/fevereiro, p.10-12, 1997.
- HIRSCHHORN, J. N.; DALY, M. J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 6:95-108, 2005.
- JIN, S.; ZHANG, X.; JIA, Z. et al. Genetic linkage mapping and genetic analysis of QTL related to eye cross and eye diameter in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using microsatellites and SNPs. *Aquaculture*, 358: 176-182, 2012.
- KHECHUMIAN, R. K.; MNDJOYAN, E. O.; MALEVANCHUK, O. A. et al. Polymorphism of the ests region of *Drosophila virilis*. *Genetika*, 25 (7): 1325-1329, 1989.
- LAFARGA DE LA CRUZ, F.; ANGEL DEL RIO-PORTILLA, M.; GALLARDO-ESCARATE, C. Genetic variability of cultured populations of red abalone in Chile: an approach based on heterologous microsatellites. *Journal of Shellfish Research*, 29(3): 709-715, 2010.
- LAI, E. Application of SNP technologies in medicine: Lessons learned and future challenges. *Genome Research*, 11:927-929, 2001.
- LIANG, F.; INGEBOG, H.; PERTEA, G.; KARAMYCHEVA, S.; SALZBERG, S. L.; QUACKENBUSH, J. An optimized protocol for analysis of EST sequences. *Nucleic Acids Research*, 28: 3657-3665, 2000.
- LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 138:1-37, 2004.
- LIU, S.; ZHOU, Z.; LU, J.; et al. Generation of genome-scale gene-associated SNPs in catfish for the construction of a high-density SNP array. *BMC Genomics*, 12: 53,2011.
- LIU, Z. J.; KARSI, A.; DUNHAM, R. A. Development of polymorphic EST markers suitable for genetic linkage mapping of catfish. *Marine Biotechnology*, 1(5):437-447, 1999.
- MAGGIONI, R.; COIMBRA, M. R. M.; LEGAT, A. P.; DINIZ, F.; COSTA, R. B.; MOLINA, W. F. *Genética de camarões: marcadores de DNA já podem identificar os diferentes plantéis de camarões criados no Brasil*. Panorama da Aquicultura, 16:44-49,2006.
- MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. DOS S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S.R. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, p.153-161, 2001.
- MCCOUCH, S. R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology*, 35, 89-99, 1997.

MCCRANEY, W. T.; SASKI, C. A.; GUYON, J. R. Isolation and characterization of 12 microsatellites for the commercially important sablefish, *Anoplopoma fimbria*. *Conservation Genetics Resources*, 4(2): 415-417, 2012.

MORIN, P. A.; LUIKART, G.; WAYNE, R. K. The SNP working group, SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(4): 208-216, 1994.

NOVEL, P.; JOSE, M. P.; PORTA, J. et al. PCR multiplex tool with 10 microsatellites for the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) - applications in genetic differentiation of populations and parental assignment. *Aquaculture*, 308 (Special Issue): S34-S38, 2010.

O'CONNELL, M.; WRIGHT, J. M. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7:331-363, 1997.

OHNISHI, Y.; TANAKA, T.; OZAKI, K.; YAMADA, R.; SUZUKI, H.; NAKAMURA, Y. A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *Journal of Human Genetics*, 46:471-477, 2001.

PELGAS, B.; ISABEL, N.; BOUSQUET, J. Efficient screening for expressed sequence tag polymorphisms (ESTPs) by DNA pool sequencing and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in spruces. *Molecular Breeding*, 13 (3): 263-279, 2004.

PRESTON, N. P.; CLIFFORD, H. Genetic improvement of farmed shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, p. 48-50, 2002.

PUSTOVRH, G.; BAJEC, S. S.; SNOJ, A. A set of SNPs for *Salmo trutta* and its application in supplementary breeding programs. *Aquaculture*, 370: 102-108, 2012.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

RESENDE, E.C.; RIBEIRO, R. P.; LEGAT, A. P.; BENITES, C. Melhoramento genético em peixes – uma revolução na aquicultura do Brasil. *ADM – Artigo de divulgação na mídia*, 130: 1-4, 2008.

SACHIDANANDAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S. C.; KAKOL, J. M.; STEIN, L. D.; MARTH, G.; SHERRY, S.; MULLIKIN, J. C.; MORTIMORE, B. J.; WILLEY, D. L.; HUNT, S. E.; COLE, C. G.; COGGILL, P. C.; RICE, C. M.; NING, Z.; ROGERS, J.; BENTLEY, D. R.; KWOK, P. Y.; MARDIS, E. R.; YEH, R. T.; SCHULTZ, B.; COOK, L.; DAVENPORT, R.; DANTE, M.; FULTON, L.; HILLIER, L.; WATERSTON, R. H.; MCPHERSON, J. D.; GILMAN, B.; SCHAFFNER, S.; VAN ETTEN, W. J.; REICH, D.; HIGGINS, J.; DALY, M. J.; BLUMENSTIEL, B.; BALDWIN, J.; STANGETHOMANN, N.; ZODY, M. C.; LINTON, L.; LANDER, E. S.; ALTSHULER, D. International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409(6822):928-33, 2001.

SAUVAGE, C. C. S.; LAPEGUE, S.; BOUDRY, P. Identification of SNPs and their mapping for the identification of QTLs of resistance to summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Conference: 9th International Symposium on Genetics in Aquaculture Location: Montpellier, France Date: Jun 26-30, 2006. *Aquaculture*, v. 272, Supplement 1, S309-S309, 2007.

SCHMUTZ, J.; GRIMWOOD, J. Fowl Sequence. *Nature*, 432: 679-80, 2004.

SOUZA, I. G. B.; IAN, P.; MEGHAN, C. M.; SOUZA, B. A.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; BENTZEN, P.; DINIZ, F. M. Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the stingless bee *Melipona subnitida* using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, doi:10.1007/s12686-014-0347-9.

STONEKING, M. Single nucleotide polymorphisms: From the evolutionary past. *Nature*, 409: 821-822, 2001.

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

TRINH, Q. T.; VAN BERS, N.; CROOIJMANS, R.; et al. A comparison of microsatellites and SNPs in parental assignment in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): the power of exclusion. *Aquaculture*, 388: 14-23, 2013.

VERA, M.; ALVAREZ-DIOS, J. A.; FERNANDEZ, C.; et al. Development and Validation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Markers from Two Transcriptome 454-Runs of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Using High-Throughput Genotyping. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3): 5694-5711, 2013.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34(3):275-305, 2002.

WANG, J. P.; LINDSAY, B. G.; LEEBENS-MACK, J.; CUI, L.; WALL, K.; MILLER, W. C.; DEPAMPHILIS, C. W. EST clustering error evaluation and correction. *Bioinformatics*, 20: 2973-2984, 2004.

WANG, L. E.; SHI, X.; SU, Y. et al. Loss of genetic diversity in the cultured stocks of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea*, revealed by microsatellites. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5): 5584-5597, 2012.

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

World Bank/FAO/IFPRI. Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. World Bank Report Number 83177-GLB. Washington D.C., USA. 2013.

WRIGHT, J. M., BENTZEN, P. Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 384-388, 1994.

XIA, J. H.; LIU, F.; ZHU, Z. Y. et al. A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs. *BMC Genomics*, 11:135, 2010.

YAN, J.; JING, J.; MU, X. et al. A genetic linkage map of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) based on microsatellites and SNPs. *Aquaculture*, 404:1-7, 2013.

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

ZHANG, L.; GUO, X. Development and validation of single nucleotide polymorphism markers in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin by mining ESTs and resequencing. *Aquaculture*, 302 (1-2): 124-129, 2010.

ZHANG, T.; KONG, J.; WANG, W.; et al. Genetic variability assessed by microsatellites in the breeding populations of the shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* in China. *Aquaculture*, 310(1-2): 229-233, 2010.

ZWEIGER, G.; SCOTT, R. W. From expressed sequence tags to 'epigenomics': an understanding disease processes. *Current Opinion of Biotechnology*, 8:684-687,1997.