

unesp 

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA
CAMPUS DE JABOTICABAL



**Seleção de marcadores moleculares em associação a
características de interesse produtivo no tambaqui
(*Colossoma macropomum*)**

Raquel Belini Ariede
Bióloga

639.31:636.082
(043)-690
A698s
12.389

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Seleção de marcadores moleculares em
associação a características de interesse
produtivo no tambaqui (*Colossoma
macropomum*)**

Raquel Belini Ariede

Bióloga

1310012389



Jaboticabal, São Paulo

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Seleção de marcadores moleculares em
associação a características de interesse
produtivo no tambaqui (*Colossoma
macropomum*)**

Raquel Belini Ariede

Orientador: Dr. Diogo Teruo Hashimoto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Biologia de Organismos Aquáticos, Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

| | |
|-------|-------------------------|
| CLAS | 639.31:636.082(043)-690 |
| | A698s |
| TOMBO | 12389 |

Ariede, Raquel Belini
A698s Seleção de marcadores moleculares em associação a características de interesse produtivo no tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Raquel Belini Ariede. -- Jaboticabal, 2017
v, 65 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, 2017
Orientador: Diogo Teruo Hashimoto
Banca examinadora: Fábio Porto-Foresti, Rafael Vilhena Reis Neto
Bibliografia

1. Tambaqui. 2. NGS. 3. Desafio bacteriano. 4. Microsatélites gene-associados. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura da UNESP.

CDU 639.31:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação - Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Seleção de marcadores moleculares em associação a características de interesse
TÍTULO: produtivo no tambaqui (*Colossoma macropomum*)

AUTORA: RAQUEL BELINI ARIEDE

ORIENTADOR: DIOGO TERUO HASHIMOTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA,
pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO
Centro de Aquicultura - CAUNESP / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. FABIO PORTO FORESTI
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP


Prof. Dr. RAFAEL VILHENA REIS NETO
Coordenadoria de Curso de Pesca / Câmpus de Registro

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2017.



DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Jefferson e Angela e irmãos,
Jônatas e Rebeca.*

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter cuidado de mim durante este período de mestrado, me dando saúde e colocando pessoas especiais em meu caminho.

Agradeço aos meus pais, meus irmãos e meus cunhados que mesmo de longe me deram forças e confiaram em minha capacidade.

Aos meus avós e família que sempre me incentivaram e oraram por mim.

Ao Prof. Dr. e orientador Diogo Teruo Hashimoto pela oportunidade oferecida, pela paciência e pelos inúmeros aprendizados tanto profissional quanto pessoal, obrigada!

Ao Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti, que inicialmente me aceitou em seu laboratório como aluna de iniciação científica e à Rosangela Zaganini que me ensinou muito do que sei hoje!

A todos do Laboratório LaGeAC, Milena, Milene, Natália, Paulo, Ricardo, Valéria e Vito. Meus agradecimentos por toda colaboração e pelas risadas em dias de experimento.

Ao Prof. Sergio Ricardo Batlouni pela ajuda na reprodução e a Fabiana Pilarski que nos auxiliou no desafio bacteriano.

Aos meus amigos de Bauru, Ariadne, Bruna, Isabel, Pelego, PH, Aline e Lívia que não deixaram a distância do dia a dia afetar em nossa amizade e me proporcionaram muitos momentos felizes e nos momentos em que precisei estavam ao meu lado, sou eternamente grata a vocês por isso.

Aos meus amigos de Jaboticabal, Milena, Xina e Thiago, o meu muito obrigada! A vocês que sempre estiveram comigo, me ajudando no projeto de mestrado e pelas inúmeras risadas em momentos de descontração e comilanças.

Muito obrigada a todos vocês!

APOIO FINANCEIRO

A CNPq pela Bolsa de Mestrado, Processo no 130629/2015-4.



SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 7 |
| 1.1 Desenvolvimento da aquicultura e produção de tambaqui | 7 |
| 1.2 Marcadores moleculares e sua aplicação em programas de melhoramento 8 | |
| 1.3 Caracterização de marcadores moleculares por sequenciamento de nova geração (<i>Next Generation Sequencing</i> - NGS)..... | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 11 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 12 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 12 |
| MANUSCRITO 1 | |
| Desenvolvimento de marcadores microssatélites utilizando sequenciamento de nova geração para <i>Colossoma macropomum</i> | 13 |
| Resumo | 14 |
| Abstract | 15 |
| 1. Introdução | 16 |
| 2. Material e métodos | 18 |
| 2.1 Sequenciamento WGS e Bioinformática | 18 |
| 2.2 Sequenciamento RNA-seq e Bioinformática | 19 |
| 2.3 Validação e Genotipagem (RNA-seq e WGS)..... | 20 |
| 3. Resultados | 22 |
| 3.1 <i>Whole Genome Shotgun</i> (WGS)..... | 22 |
| 3.2 RNA-seq | 23 |
| 4. Discussão | 24 |
| 5. Conclusão | 26 |
| 6. Referências Bibliográficas | 26 |
| Lista de Figuras | 32 |
| Lista de Tabelas | 33 |

MANUSCRITO 2

| | |
|---|-----------|
| Caracterização de marcadores microssatélites associados ao crescimento e análise de resistência à <i>Aeromonas hydrophila</i> em tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>..... | 38 |
| Resumo | 39 |
| Abstract | 40 |
| 1. Introdução..... | 41 |
| 2. Material e Métodos | 42 |
| 2.1 Formação das famílias..... | 43 |
| 2.2 Experimento de desafio bacteriano com <i>Aeromonas hydrophila</i> | 43 |
| 2.3 Medições das características de crescimento | 44 |
| 2.4 Avaliação dos marcadores microssatélites | 45 |
| 3. Resultados..... | 47 |
| 3.1 Análises de variância entre tempo de morte e taxa de mortalidade | 47 |
| 3.2 Análises Morfométricas..... | 47 |
| 3.3 Associação dos genótipos com as características de interesse | 48 |
| 4. Discussão | 48 |
| 5. Conclusão..... | 51 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 51 |
| Lista de Figuras | 55 |
| Lista de Tabelas..... | 56 |
| 3. DISCUSSÃO GERAL..... | 59 |
| 4. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES..... | 60 |

RESUMO

O Tambaqui (*Colossoma macropomum*), natural das bacias do rio Amazonas e do rio Orinoco, possui características favoráveis ao sistema de cultivo e boa aceitação de mercado. Contudo, há poucos estudos genéticos realizados com esta espécie, especialmente de melhoramento genético. Para a construção de um mapa genético desta espécie, é necessário o desenvolvimento de um elevado número de marcadores moleculares. Desta forma, este estudo teve como objetivo caracterizar microssatélites gene-associados e neutros (não gênicos), obtidos por *Next Generation Sequencing* (RNA-seq e *Whole Genome Shotgun* - WGS, respectivamente), para serem disponibilizados em estudos de associação com QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e construção de um mapa genético. De modo geral, a avaliação de 200 marcadores (100 de cada conjunto) resultou em 45 *loci* polimórficos. Do conjunto de marcadores RNA-seq, as heterozigosidades observada e esperada (H_o e H_e) variaram de 0,09 a 0,73, e 0,09 a 0,85, respectivamente. Do conjunto WGS, H_o e H_e variaram de 0,33 a 0,95, e 0,28 a 0,92, respectivamente. Posteriormente, alguns microssatélites foram testados em três famílias de *C. macropomum* para buscar associações com características de resistência à bactéria e crescimento. Para o estudo de resistência, três famílias ($n = 120$), foram submetidas ao desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila*. Os dados do desafio apresentaram diferenças significativas nos tempos de morte e taxa de mortalidade entre as famílias. O crescimento foi avaliado por medidas morfométricas e peso, sendo que todas as características estavam correlacionadas significativamente ($p < 0,01$). Análises de associação microssatélite/fenótipo sugeriram que o marcador gene-associado c3842 (*tnrc6b*) está associado ao comprimento padrão (CP) e um marcador neutro (r912) com a altura 2 (A2). O presente estudo possibilitou prospectar marcadores moleculares associados com crescimento que poderão ser utilizados na validação de seleção assistida por marcadores em famílias de tambaqui. Em conclusão, estes dados servirão como subsídios biotecnológicos para acelerar o melhoramento genético do tambaqui, que é a principal espécie nativa produzida na América do Sul.

PALAVRAS-CHAVE: tambaqui, NGS, desafio bacteriano, microssatélites gene-associados.

ABSTRACT

Tambaqui (*Colossoma macropomum*), is a fish species of the Amazon and Orinoco rivers, with favorable traits to the production system and market acceptance. However, there are few genetic studies with this species, especially genetic improvement. For the construction of a genetic map of this species, the development of a high number of molecular markers is necessary. Thus, this study aimed to characterize gene-associated and neutral (non-gene) microsatellites obtained by Next Generation Sequencing (RNA-seq and *Whole Genome Shotgun* - WGS, respectively), to be available in association studies with Quantitative Trait Loci (QTLs) and construction of a genetic map. Overall, the evaluation of 200 markers (100 of each set) resulted in 45 polymorphic loci. In the RNA-seq data, the observed and expected heterozygosity (H_o and H_e) ranged from 0.09 to 0.73, and 0.09 to 0.85, respectively. In the WGS data, H_o and H_e ranged from 0.33 to 0.95, and 0.28 to 0.92, respectively. Subsequently, some microsatellites were tested in three families of *C. macropomum* to seek associations with bacterial resistance and growth characteristics. For the resistance study, three families ($n = 120$) were submitted to the bacterial challenge with *Aeromonas hydrophila*. The challenge data presented significant differences in time of death and mortality rate among the families. Growth was evaluated by morphometric measures and weight, and all the characteristics were significantly correlated ($p < 0.01$). Microsatellite/phenotype association analyzes have suggested that the gene-associated marker (*tnrc6b*) is associated with the standard length (CP) and a neutral marker (r912) with height 2 (A2). The present study made it possible to prospect for molecular markers associated with growth that could be used in the validation of marker - assisted selection in tambaqui families. In conclusion, these data will serve as biotechnology subsidies to accelerate the genetic improvement of tambaqui, which is the main native species produced in South America.

KEY-WORDS: tambaqui, NGS, bacterial challenge, microsatellite gene-associated.



1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Desenvolvimento da aquicultura e produção de tambaqui

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), o desenvolvimento da aquicultura superou o crescimento populacional, resultando na expansão da aquicultura nas últimas três décadas. Em 2014, a produção total da aquicultura foi de 73,8 milhões de toneladas. Destes, 49,8 milhões de toneladas é composta por peixes, e o restante por moluscos, crustáceos e outros animais aquáticos (FAO, 2016). De forma geral, a Ásia foi a que mais contribuiu com a produção de peixes cultivados para consumo humano, e o Brasil encontra-se em 14º lugar na lista dos 25 países que mais contribuíram com a aquicultura mundial (FAO, 2016).

A aquicultura brasileira apresentou expressivo avanço nos últimos anos e, em 2015, segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), atingiu um valor de produção de R\$ 4,39 bilhões, com a maior parte (69,9%) oriunda da criação de peixes, seguida pela criação de camarões (20,6%). A produção total de peixes da piscicultura brasileira foi de 483,24 mil toneladas em 2015, representando um aumento de 1,5% em relação ao ano anterior (IBGE, 2016).

A tilápia (*Oreochromis* spp.) é a espécie mais cultivada (219,33 mil toneladas), representando 45,4% da produção de peixes no Brasil (IBGE, 2016). O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é uma espécie de peixe nativa e ocupa o segundo lugar no *ranking* nacional de produção de peixes (135,86 mil toneladas), com aproximadamente 28% da produção brasileira. Além disso, somando os híbridos produzidos tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) e tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*),

a contribuição de tambaqui na aquicultura chega a representar 173,301 mil toneladas (IBGE, 2016). Como visto, a aquicultura no Brasil tem crescido de forma significativa, evidenciando ainda mais a necessidade de estudos genéticos, tanto para o melhoramento quanto para conhecimento biológico das espécies.

O Brasil dispõe de recursos naturais e uma rica biodiversidade de peixes com potencial para melhoramento genético, do qual aproximadamente 23 espécies nativas de rios brasileiros são utilizadas para aquicultura nacional (IBGE, 2016). A maior parte dos cultivos é feita com espécies exóticas, principalmente a tilápia (Ponzoni *et al.*, 2011), evidenciando a necessidade de programas de melhoramento em espécies nativas do Brasil.

1.2 Marcadores moleculares e sua aplicação em programas de melhoramento

Programas de melhoramento genético são importantes para o desenvolvimento da aquicultura. A taxa de crescimento é uma das características mais visadas em programas de melhoramento, pois como evidenciado em um estudo com tilápia pode-se obter respostas de seleção para crescimento em uma taxa de 10 – 20% por geração (Gjedrem e Thodesen, 2005). Contudo, pesquisas sobre crescimento e genes relacionados em espécies nativas do Brasil são escassos, sendo a maior parte desenvolvida em espécies de países asiáticos (Ma *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2014).

Além do crescimento, outra característica de interesse para a aquicultura é a seleção dos organismos resistentes a doenças (Gjedrem, 2010). A intensificação da produção na piscicultura associado com a elevada densidade de estocagem, ocasiona estresse nos peixes e, com isso, é praticamente inevitável a transferência

de patógenos, como bactérias, viroses, fungos e parasitas (Gjedrem, 2015). Na aquicultura mundial, a infecção por *Aeromonas hydrophila* é responsável por surtos de mortandade e por grandes prejuízos econômicos no setor aquícola e está diretamente associada às modificações nas condições ambientais e aos fatores de estresse no cultivo intensivo, que levam à imunossupressão do sistema imunológico dos peixes e, conseqüente, morte (Esteve *et al.*, 1995; Janda *et al.*, 1996).

Os avanços na pesquisa genômica melhoraram significativamente as ferramentas disponíveis para o estudo de características comercialmente importantes. Os marcadores moleculares são empregados para detectar associações entre genótipo e o fenótipo desejável, indicando a sua localização no genoma e a intensidade com que estes *loci* afetam uma característica (Gutierrez *et al.*, 2015). Estudos de *loci* de características quantitativas (QTLs) são particularmente úteis para compreender o direcionamento de características que são difíceis de medir diretamente sobre os candidatos de seleção (Villanueva *et al.*, 2011; Taylor, 2014). Estudos de marcadores moleculares para associação com características de interesse zootécnico, têm merecido destaque em diversas espécies de peixes (Korol *et al.*, 2007), mas ainda não foram aplicados para espécies nativas do Brasil.

A capacidade de determinar as regiões que afetam características economicamente importantes levou à implementação de programas de seleção baseados na identificação de animais com genótipos favoráveis (Gutierrez *et al.*, 2015). Com a identificação de um QTL, é possível realizar a seleção assistida por marcadores (MAS), a qual permite selecionar indivíduos que possuem determinadas características de interesse (Korol *et al.*, 2007; Goddard e Hayes,

2009). Na aquicultura a seleção assistida por marcadores pode ser uma ferramenta valiosa para os programas de seleção, melhorando a precisão da seleção e, por conseguinte, o ganho genético (Sonesson, 2007). Os investimentos em programas de melhoramento são únicos, porque os ganhos genéticos obtidos em tais programas são cumulativos (Weller, 2006). A genética quantitativa e a reprodução seletiva representam um campo recente da ciência, e esta técnica no setor aquícola está em fase inicial em comparação com as indústrias de plantas e outros animais cultivados (Gjedrem, 2012). A herdabilidade relativamente alta para características economicamente importantes em peixe e crustáceos, combinada com alta fecundidade e intervalos de geração curtos (1-4 anos) na maioria das espécies, explica os altos ganhos genéticos obtidos em muitos programas de aquicultura (Gjedrem, 2012).

1.3 Caracterização de marcadores moleculares por sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS)

Entre os marcadores moleculares, os microssatélites são um dos marcadores mais utilizados em estudos de genética de peixes. Os microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), são elementos repetitivos, formados por arranjos de repetições em *tandem*, de dois a seis nucleotídeos de comprimento e estão entre os locos mais polimórficos dos genomas (Ferguson *et al.*, 1995; Milach, 1998; Matioli, 2001). O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do número dos elementos repetidos, provavelmente devido aos erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA (Stuart, 2001), demonstrando altos níveis de polimorfismo alélico (Oliveira *et al.*, 2006). Devido ao alto polimorfismo e

codominância, os marcadores microssatélites foram os mais utilizados nos últimos anos em estudos de peixes (Liu *et al.*, 2008).

Considerando os avanços biotecnológicos e genéticos, a prospecção e desenvolvimento de marcadores estão cada vez mais acessíveis, de modo a contribuir para o conhecimento biológico e genético de muitas espécies aquáticas. Atualmente, o NGS possibilita a descoberta de milhões de marcadores moleculares, que podem estar associados a características de interesse econômico, como crescimento e resistência a doenças, com maior rapidez e baixo custo (Davey *et al.*, 2011). Uma das estratégias utilizada é o *Whole Genome Shotgun* (WGS), que consiste no sequenciamento aleatório do DNA genômico, para prospecção de marcadores neutros frequentemente utilizado em genomas de peixes (Carvalho *et al.*, 2011; Carvalho e Beheregaray, 2011). O sequenciamento do transcriptoma é outra estratégia para a descoberta de genes, e pode ser utilizada em espécies cujo genoma ainda não está disponível (Grabherr *et al.*, 2011). Esta metodologia tem demonstrado ser muito eficaz para identificação de microssatélites gene-associados em peixes (Ji *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2013; Gross *et al.*, 2013). Análises feitas em peixes, com marcadores obtidos do transcriptoma, tem demonstrado êxito na busca de associações entre marcadores moleculares e características de interesse, como crescimento, resposta imune e diferenciação das gônadas. (Ma *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar marcadores microssatélites neutros e gene-associados para estudos genéticos aplicados ao tabaqui.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar análises de bioinformática para caracterização e anotação funcional dos microssatélites.
- Testar dois conjuntos de marcadores microssatélites (RNA-seq e WGS) em indivíduos selvagens para validação de polimorfismo.
- Buscar marcadores microssatélites que estejam associados a características de interesse zootécnico, como crescimento e resistência à bactéria.

MANUSCRITO 1

**Desenvolvimento de marcadores microssatélites
utilizando sequenciamento de nova geração
para *Colossoma macropomum***

Resumo

O Tambaqui (*Colossoma macropomum*), natural das bacias do rio Amazonas e do rio Orinoco, possui características zootécnicas favoráveis ao sistema de cultivo e aceitação no mercado. No entanto, a construção de um mapa genético para o melhoramento desta espécie é limitada pelo baixo número de marcadores moleculares atualmente descritos. Desta forma, este estudo teve como objetivo analisar 100 microssatélites gene-associados e 100 microssatélites neutros (não gênicos), obtidos por *Next Generation Sequencing* (RNA-seq e *Whole Genome Shotgun* - WGS, respectivamente), para futura construção de um mapa genético e busca por QTLs (*quantitative trait loci*). Para isso, análises genéticas foram realizadas em indivíduos selvagens ($n = 24$) do Rio Curuá-Uná (bacia Amazônica). Do conjunto RNA-seq, as heterozigosidades observada e esperada (H_o e H_e) variaram de 0,09 a 0,73, e 0,09 a 0,85, respectivamente. Do conjunto WGS, H_o e H_e variaram de 0,33 a 0,95, e 0,28 a 0,92, respectivamente. De modo geral, a avaliação dos 200 marcadores resultou em 45 *loci* polimórficos, sendo 14 gene-associados do conjunto RNA-seq e 31 neutros do conjunto WGS. Além disso, alguns marcadores relacionados a genes do sistema imune, regulação/controle biológico e biogênese foram encontrados. Este estudo contribui com o aumento significativo de marcadores moleculares para *C. macropomum*, permitindo futuras análises para busca por QTLs.

PALAVRAS-CHAVE: NGS, aquicultura, SSRs gene-associados, tambaqui.

Abstract

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is a fish species from the Amazon and Orinoco rivers, with favorable traits to the production system and market acceptance in South America. However, the construction of a genetic map for the genetic improvement of this species is limited by the low number of molecular markers currently described. Thus, this study aimed to validate gene-associated and neutral (non-genic) microsatellites obtained by Next Generation Sequencing (RNA-seq and *Whole Genome Shotgun* - WGS, respectively), for future construction of a genetic map and search for QTL (Quantitative trait *loci*) in this species. In the RNA-seq data, the observed and expected heterozygosity (H_o and H_e) ranged from 0.09 to 0.73, and 0.09 to 0.85, respectively. In the WGS data, H_o and H_e ranged from 0.33 to 0.95, and 0.28 to 0.92, respectively. In general, the evaluation of 200 markers resulted in 45 polymorphic *loci*, of which 14 were gene-associated (RNA-seq) and 31 were neutral (WGS). Moreover, some markers were related to genes of the immune system, biological regulation/control and biogenesis. This study contributes to increase the number of molecular markers available for genetic studies in *C. macropomum*, which will allow the development of breeding programs assisted by molecular markers.

KEY-WORDS: NGS, aquaculture, SSR gene-associated, tambaqui.

1. Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Curvier, 1818) é uma espécie de peixe reofílico nativo das bacias do rio Amazonas e do rio Orinoco, pertencente à ordem dos Characiformes (Eigenmann, 1915; Britski, 1977). Essa espécie tem uma considerável importância econômica na aquicultura, principalmente, pelo seu alto valor nutricional, rápido crescimento, adaptação e reprodução em cativeiro (Gomes *et al.*, 2010). Além disso, *C. macropomum* é muito utilizado nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil para cruzamentos com outras espécies de Serrasalminidae, resultando em híbridos interespecíficos (Hashimoto *et al.*, 2012). No Brasil, *C. macropomum* e seus híbridos, tambacu (híbrido do *Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) e tambatinga (híbrido do *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachipomus*) correspondem ao segundo grupo de peixes mais produzidos na aquicultura, representando cerca de 36% da produção (173,301 t) (IBGE, 2016). Além disso, o tambaqui também tem importância na aquicultura de outros países da América do Sul (Valladão *et al.*, 2016) e, portanto, é uma espécie-alvo para programas de melhoramento que aumentarão sua produção na aquicultura.

Ferramentas moleculares têm sido utilizadas em várias espécies de peixes modelo para mapeamento de *loci* de características quantitativas (QTLs), resultando no desenvolvimento de programas de melhoramento por meio do uso da seleção assistida por marcadores. Esta metodologia busca localizar regiões genômicas relacionadas a variações genéticas de fenótipos economicamente importantes, isto é, marcadores moleculares ligados a uma determinada característica de interesse (Souza, 2001). No entanto, a descoberta e

caracterização de marcadores moleculares são o primeiro passo para a implementação desta metodologia.

Até o momento, há 41 marcadores microssatélites neutros descritos para *C. macropomum* (Santos *et al.*, 2009; Hamoy *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2012), os quais foram os primeiros estudos a contribuir com dados genéticos nesta espécie. No entanto, estes marcadores descritos, foram utilizados apenas para estudos de variabilidade genética, não sendo testados em associação com características economicamente importantes. Para estudos de caracterização de marcadores associadas a QTLs, esta quantidade disponível é pequena e, portanto, a probabilidade de serem detectados QTLs é menor, tornando necessário a descoberta de novos marcadores microssatélites para serem aplicados em programas de melhoramento genético de *C. macropomum*.

Historicamente, o método tradicional para o isolamento de microssatélites era uma tarefa dispendiosa e demorada, por meio da construção de bibliotecas de genomas enriquecidos em microssatélites, clonagens e sequenciamentos pelo método de Sanger (Billotte *et al.*, 1999). Atualmente, o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) oferece vantagens significativas em termos de rapidez e custo, facilitando a descoberta de milhões de marcadores moleculares (Seeb *et al.*, 2011; Davey *et al.*, 2011). *Whole Genome Shotgun* (WGS) é uma das estratégias NGS utilizadas para a descoberta de marcadores moleculares, que consiste no sequenciamento aleatório do DNA, um processo rápido que localiza marcadores neutros e que tem sido utilizado frequentemente em genomas de peixes (Carvalho *et al.*, 2011; Carvalho e Beheregaray, 2011). Além disso, muitos estudos com peixes vêm adotando a estratégia de sequenciamento do transcriptoma (RNA-seq), que consiste no sequenciamento de

mRNA (RNA mensageiro) de diferentes tecidos para a identificação de microssatélites associados a genes (Liu *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2013; Gross *et al.*, 2013).

Neste contexto, o objetivo principal deste estudo foi a descoberta e caracterização de novos marcadores microssatélites para *C. macropomum*, obtidos por NGS, por meio das estratégias de sequenciamento WGS e RNA-seq, e que serão úteis para análises de QTLs e melhoramento genético de *C. macropomum*.

2. Material e métodos

2.1 Sequenciamento WGS e Bioinformática

Para o sequenciamento *Whole Genome Shotgun* (WGS), 500 ng de DNA genômico de um indivíduo de *C. macropomum* (coletado no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, CEPTA, Pirassununga, SP) foi fragmentado aleatoriamente por nebulização com gás nitrogênio (30 psi). O DNA fragmentado foi purificado usando o "MinElute PCR Purification Kit" (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A construção da biblioteca e o sequenciamento foram realizados por pirosequenciamento em um equipamento 454 GS-FLX Titanium® equipment (Roche Diagnostics), no Instituto Agrobiotecnológico de Rosário, INDEAR, Argentina, seguindo os procedimentos descritos em Margulies *et al.* (2005).

Como foi realizado um sequenciamento de baixa cobertura do genoma do tambaqui, a prospecção dos microssatélites foi realizada diretamente sobre os *reads*, ou seja, não foi feita a montagem *de novo* das sequências porque resultaria em um baixo número de *contigs*. Os *reads* de WGS foram analisados para

identificar Repetições de Sequência Simples (SSRs) (mínimo de cinco repetições), usando o software "Msatcornmander" (Faircloth, 2008). O desenho dos *primers* foi realizado no software "Primer3" (Rozen e Skaletsky, 2000). Foram excluídas sequências de microssatélites que mostraram homologia com mtDNA (DNA mitocondrial), transposons, mRNA e microssatélites já descritos para *C. macropomum*, usando a função BLASTn da base de dados GenBank.

2.2 Sequenciamento RNA-seq e Bioinformática

Para realizar o sequenciamento do transcriptoma foram coletadas amostras de fígado de dez exemplares de *C. macropomum*, de cinco diferentes estoques cultivados no Brasil: sendo, n = 3 do CEPTA, Pirassununga, SP; n = 2 do CAUNESP, Jaboticabal, SP; n = 1 do Projeto Surubim, Santa Rita do Tocantins, TO; n = 2 da Fazenda São Paulo, Brejinho de Nazaré, TO; e n = 2 da Fazenda Sambaíba, Porto Nacional, TO. O RNA foi extraído com Rneasy Mini Kit (Qiagen). Preparou-se um pool equimolar de amostras de RNA total (de 10 indivíduos) para o enriquecimento de mRNA com μ MACS mRNA Isolation Kit (Miltenyi Biotech). A construção da biblioteca e o sequenciamento foram realizados por pirosequenciamento em um equipamento 454 GS-FLX Titanium® (Roche Diagnostics), na empresa HELIXXA (Campinas, SP).

O processo de *trimming* (*quality score* $Q > 20$), montagem *de novo*, retirada de contaminação por DNA mitocondrial e RNA ribossômico foi realizado por meio do software "CLC Genomics Workbench" (version 7.5.1). O software "CD-HIT" (*Weizhong Li's Group*) foi utilizado para retirar sequências menores que 200 pb e remoção da redundância, com um limiar de 90% de identidade.

A anotação funcional das sequências consenso foi realizada por homologia no BLASTx em pesquisa contra o banco de dados zebrafish (*Danio rerio*) no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (*E-value cutoff* de 1E-3) para a obtenção da identidade gênica utilizando o software BLAST2GO (Conesa, 2005). Os termos *Gene Ontology* (GO) foram atribuídos a cada gene com base nos termos GO anotados em homólogos correspondentes na base de dados NCBI (*e-value cutoff* 1e-6). Os transcritos foram anotados no banco de dados de proteínas InterPro, Enzyme code (EC) e KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), e analisados em vias metabólicas através do método *Bi-direcional Best Hit* (BBH).

Os microssatélites foram identificados usando o *software* "Msatcommander" e os *primers* foram desenhados no "Primer3". Nas pesquisas BLASTx, foram identificadas a localização dos microssatélites nos genes, ou seja, cds (sequência codificante) ou UTR 3' e 5' (região não traduzida). Foram selecionados preferencialmente microssatélites localizados nas regiões 3' ou 5' UTR dos genes, pois estes poderiam ser mais polimórficos do que aqueles posicionados em cds.

2.3 Validação e Genotipagem (RNA-seq e WGS)

Após a filtragem das sequências de microssatélites, foram selecionadas 100 SSRs gene-associados (RNA-seq) e 100 SSRs neutros sem associação gênica (WGS) para validação em uma população selvagem de *C. macropomum* (n = 24), do Rio Curuá-Uná (2 ° 26 '4,20 "S 54 ° 7' 43,70" O), bacia Amazônica. As amostras de nadadeiras foram fornecidas por Jonas da Paz Aguiar, da Universidade Federal do Pará (UFPA), Brasil.

O DNA genômico foi extraído utilizando amostras de nadadeira, seguindo o protocolo do kit comercial "Wizard Genomic DNA Purification Kit" (*Promega*). Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), um volume final de 25 µl foi utilizado, contendo 100 µM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1X Taq DNA buffer, 0,1 µM de cada *primer* (F e R), 0,5 unidades de Taq polimerase (*Invitrogen*) e 10-50 ng de DNA genômico. As reações foram feitas em um termociclador (*ProFlex™ PCR System, Life Technologies*) nas seguintes condições: 30s a 95 °C, 30s a 55-60 °C (ajustado para cada conjunto de *primers*) e 20s a 72 °C. Os fragmentos de DNA foram aplicados num gel de agarose a 2%, corado por Nancy (*Sigma*), para verificar a ocorrência de polimorfismo.

Os microssatélites que mostraram polimorfismo em géis de agarose a 2% foram analisados no sequenciador ABI3730 XL DNA Analyzer (*Life Technologies*) para melhor acurácia na determinação dos alelos. A estratégia de sequenciamento adotada neste estudo foi de acordo com o protocolo descrito por Schuelke (2000), utilizando o iniciador CAGtag (5'-CAGTCGGGCGTCATCA-3') marcado com os fluorocromos HEX, FAM e NED. A genotipagem foi realizada com os seguintes reagentes: 100 µM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1X Taq DNA buffer, 0,1 µM de cada *primer* (F e R), 0,01 µM do *primer* CAGtag, 0,5 unidades de Taq Polymerase (*Invitrogen*) e 10-50 ng de DNA genômico. As condições de PCR foram: 9 ciclos de 95 °C / 30s, 55-60 °C / 30s (ajustado para cada conjunto de *primers*) e 72 °C / 20s; e então 30 ciclos de 95 °C / 30s, 50 °C / 30s e 72 °C / 20s. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese capilar no equipamento ABI3730 XL, utilizando a matriz DS-30, com o Size Standart GeneScan 500 ROX (*Thermo*). Foi utilizado o programa *GeneMapper 4.0* (*Applied Biosystems*) para analisar os tamanhos dos alelos.

Os parâmetros de diversidade genética foram estimados utilizando os *softwares* "GENEPOP" (Rousset,2008) e "ARLEQUIM" (Excoffier,2005), incluindo o número de alelos observados (N_a), heterozigotidade observada (H_o), heterozigotidade esperada (H_e), testes de qui-quadrado para Hardy-Weinberg (EHW), desequilíbrio de ligação (DL) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) segundo os parâmetros de Weir e Cockerhsam (1984). Os níveis de significância foram ajustados para testes múltiplos utilizando a correção de Bonferroni ($p < 0,05$) (Rice,1989). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado utilizando o *software* "CERVUS 3.0.7" (Kalinowsk *et al.*, 2007). Para determinar possíveis erros de genotipagem e a ocorrência de alelos nulos, foi utilizado o *software* "MicroChecker" (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

3. Resultados

3.1 *Whole Genome Shotgun (WGS)*

O sequenciamento WGS produziu 42.563 *reads*, que foram depositadas no *Short Read Archive* (SRA) do NCBI sob o número de acesso SRR5122724. No total, 6.105 microssatélites foram encontrados nesta biblioteca (Tabela 1) e *primers* flaqueadores foram desenhados para 1.255 *loci*. Foram selecionados 100 microssatélites neutros (sem associação gênica) para validação, dos quais 31 foram polimórficos quando testados na população selvagem de *C. macropomum* (número de acesso GenBank KY379117 - KY379147). A análise do genótipo mostrou os seguintes valores: o número médio de alelos foi oito, H_o variou de 0,33 a 0,95 e H_e variou de 0,28 a 0,92. Os índices de H_o e H_e tiveram uma média de 0,64 e 0,75, respectivamente (Tabela 2). Quatro *loci* mostraram desvio significativo de

EHW ($p < 0,0011$, após correção de Bonferroni). Houve desequilíbrio de ligação entre os microssatélites r4722 e r6071 ($p = 0$). A presença de alelos nulos foi detectada nos *loci* r912, r846, r4990, r4880, r3061, r1986 e r1247.

3.2 RNA-seq

O processo de *trimming* do RNA-seq resultou em 277.245 *reads*, que foram depositadas no *Short Read Archive* (SRA) do NCBI sob o número de acesso SRR5122711. Estes *reads* foram montados em 7.119 *contigs* (Tabela 1), dos quais 4.637 *contigs* foram anotados funcionalmente por BLASTx e 4.028 sequências (86%) foram classificados em termos Gene Ontology (GO): Processo Biológico (47,7%), Função Molecular (29,3) e Componente Celular (23%). Os principais termos GO relacionados ao Processo Biológico foram, *cellular process*, *metabolic process*, e *single-organism process*; para a Função Molecular foram *binding*, *catalytic activity*, e *transporter activity*; e ao Componente Celular foram *cell*, *organelle* e *membrane* (Fig. 1). Foram encontradas 3.760 sequências anotadas com números de acesso da Interpro. A caracterização dos transcritos na base de dados KEGG resultou em 1.176 transcrições relacionadas a 116 vias metabólicas, com a participação de 328 enzimas.

Foram encontrados 748 *contigs* contendo microssatélites, contudo, foram desenhados *primers* para 233 SSRs *loci*. A anotação funcional por BLASTx identificou 224 microssatélites com identidade gênica, dos quais 100 SSRs foram escolhidos para validação. Após a genotipagem, 14 microssatélites demonstraram polimorfismo (número de acesso do GenBank KY379103 - KY379116). O número médio de alelos foi quatro, a H_o variou de 0,09 a 0,73, e H_e variou de 0,09 a 0,85. Os valores médios de H_o e H_e foram de 0,46 e 0,51, respectivamente (Tabela 3).

Após a correção de Bonferroni para múltiplos *loci* ($p = 0,0011$), todos os *loci* entraram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Houve desequilíbrio de ligação entre os microssatélites c3843 e c1842 ($p = 0,0002$).

4. Discussão

Até o momento, três estudos anteriores foram realizados para isolar e caracterizar 41 *loci* de microssatélites em *C. macropomum* (Santos *et al.*, 2009; Hamoy *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2012). No presente estudo, utilizamos a estratégia de NGS para aumentar a quantidade de microssatélites disponíveis para estudos genéticos e programas de melhoramento desta espécie. Os níveis de polimorfismo (número de alelos e heterozigidade) de microssatélites descritos anteriormente em outros estudos (Santos *et al.*, 2009; Hamoy *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2012) foram semelhantes aos encontrados nesta pesquisa para o WGS. No entanto, os marcadores neutros do WGS apresentaram maiores taxas de polimorfismo (dos 100 marcadores analisados, 31 foram polimórficos), PIC, número de alelos e média de heterozigidade em comparação com os microssatélites do conjunto de dados RNA-seq (14 polimórficos) (Tabela 4). De fato, os microssatélites associados a genes são suscetíveis à pressão seletiva, o que pode explicar os menores níveis de polimorfismo neste conjunto de dados (Papetti *et al.*, 2016).

Embora menos polimórficos, os marcadores derivados de transcriptoma podem ser usados como marcadores funcionais na identificação de genes que desempenham papéis importantes em características zootécnicas. Estudos de caracterização e descrição de microssatélites associados a genes já demonstraram a utilidade desses marcadores na detecção de características quantitativas

economicamente importantes e sua aplicabilidade em estudos de melhoramento, como descrito em barramundi (*Lates calcarifer*), tilápia (*Oreochromis spp.*), carpa comum (*Cyprinus carpio*), salmão atlântico (*Salmo salar*) e bacalhau (*Gadus morhua*) (Yue *et al.*, 2001; Yue e Orban, 2002; Yue *et al.*, 2003; Vasemägi *et al.*, 2005; Stenvik *et al.*, 2006). Em dourada (*Sparus aurata*) (Almuly *et al.*, 2005), por exemplo, observou-se um microssatélite dinucleotídico (alelos 250 e 254) localizado no gene do hormônio de crescimento (*gh*) em associação com o grupo de peixe de maior peso corporal. Este microssatélite, localizado na região promotora de *gh*, pode ser considerado um marcador genético candidato para manejo de estoques de reprodutores e programas de seleção de crescimento de *Sparus aurata*.

No presente estudo, identificamos diferentes genes relacionados ao sistema imune, como: o *GTPase IMAP* (c4296), que está envolvido em respostas inflamatórias causadas pelo aumento de peso e pelo consumo de ração contendo produtos vegetais em peixe-zebra (*Danio rerio*) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Drew *et al.*, 2012; Sahlmann *et al.*, 2012), respectivamente; e o gene *Calnexin precursor* (c2311), que é descrito como um componente do sistema imune inato e adaptativo em peixes ósseos (Vasta *et al.*, 2011). Portanto, estudos futuros sobre esses *loci* podem melhorar o conhecimento sobre a associação de microssatélites com características zootécnicas. Por fim, estes 45 novos *loci* polimórficos de SSRs são potencialmente úteis para estudos genéticos de populações naturais e cultivadas de *C. macropomum*.

5. Conclusão

A estratégia de sequenciamento genômico NGS permitiu o desenvolvimento de um alto número de marcadores, disponibilizando milhares de SSRs para validação. Estes novos microssatélites, somados aos descritos, permitem a construção de um mapa genético para caracterização de QTLs em *C. macropomum*, que fornecerá importantes ferramentas moleculares para programas de melhoramento genético na aquicultura.

Agradecimentos

Este trabalho foi subsidiado pela PROPE / UNESP (07/2015), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 446779 / 2014-8 e 305916 / 2015-7), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo 2014 / 03772-7), e CAPES. Agradecemos a Jonas da Paz Aguiar por fornecer amostras de indivíduos selvagens do rio Curuá-Uná.

6. Referências Bibliográficas

- Almuly R, Poleg-Danin Y, Gorshkov S, Rapoport B, Soller M, *et al.* (2005) Characterization of the 5' flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter. *Fisheries Sci* 71(3):479-490
- Billotte N, Lagoda P JL, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277-288

- Britski HA (1977) Sobre o gênero *Colossoma* (Pisces, Characidae). *Ciência e Cultura* 29:810
- Carvalho DC, Beheregaray LB (2011) Rapid development of microsatellites for the endangered Neotropical catfish *Conorhynchus conirostris* using a modest amount of 454 shot-gun pyrosequencing. *Conserv Genet Resour* 3:373-375
- Carvalho DC, Rodríguez-Zárate CJ, Hammer MP, Beheregaray B (2011) Development of 21 microsatellite markers for the threatened Yarra pygmy perch (*Nannoperca obscura*) through 454 shot-gun pyrosequencing. *Conserv Genet Resour* 3:601-604
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-3676
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, *et al.* (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature* 12(7):499-510
- Drew RE, Settles ML, Churchill EJ, Williams SM, Balli S, *et al.* (2012) Brain transcriptome variation among behaviorally distinct strains of zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Genomics* 13:323
- Eigenmann CH (1915) The Serrasalminae and Mylinae. *Annals of the Carnegie Museum* 9:226-271
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50
- Faircloth BC (2008) Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Mol Ecol Research* 8:92-94

- Gomes LC, Simões, LN, Araújo-Lima, CARM (2010) Tambaqui (*Colossoma macropomum*), p175-204. In: Baldisserotto B, Gomes LC (eds.) Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2ª. Ed. Editora UFSM, Santa Maria
- Gross JB, Furter A, Carlson BM (2013) An integrated transcriptome-wide analysis of cave and surface dwelling *Astyanax mexicanus*. PLoS One 8:e55659
- Hamoy IG, Cidade FW, Barbosa MS, Gonçalves EC, Santos D (2010) Isolation and characterization of tri and tetranucleotide microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes). Conserv Genet Resour 3:33–36
- Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2012) Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. Reviews in Aquaculture 4:108-118
- IBGE (2016) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro Produção da Pecuária Municipal 2015, v. 43
- Ji P, Liu G, Xu J, Wang X, Li J, Zhao Z (2012) Characterization of common carp transcriptome: sequencing, de novo assembly, annotation and comparative genomics. PLoS One 7(4):e35152
- Kalinowsk ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol Ecol 16:1006–1099
- Liu S, Zhou Z, Lu J (2011) Generation of genome-scale gene-associated SNPs in catfish for the construction of a high-density SNP array. BMC Genomics 12:53
- Long Y, Li Q, Zhou B (2013) De novo assembly of Mud Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) skin transcriptome to identify putative genes involved in immunity and epidermal mucus secretion. PLoS One 8:e56998

- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, *et al.* (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437(7057):376-380
- Papetti C, Harms L, Jürgens J, Sandersfeld T, Koschnick N, *et al.* (2016) Microsatellite markers for the notothenioid fish *Lepidonotothen nudifrons* and two congeneric species. *BMC Research Notes* 9:238
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8:103-106
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386
- Sahlmann C, Sutherland BJB, Kortner TM, Koop BF, Krogdahl A, *et al.* (2012) Early response of gene expression in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the development of soybean meal induced enteritis. *Fish Shellfish Immunol* 34:599e609
- Santana GX, Santos CHA, Sousa CFS, Nascimento PRM, Paula-Silva MN, *et al.* (2012) Isolation of novel microsatellite markers for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Curvier 1818), an importante freshwater fish of the Amazon. *Conserv Genet Resour* 4:197-200
- Santos MCF, Hrbek T, Farias IP (2009) Microsatellite markers for the tambaqui (Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Mol Ecol Res* 9:874-876
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotech* 18:233–234

- Seeb JE, Carvalho G, Hauser L (2011) Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Mol Ecol Research* 11:1-8
- Souza AP (2001) Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: Nass LL, Valois ACC, Mello IS, Valadares-Ingliš MC (ed.) Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação MT, pp. 939-965
- Stenvik J, Wesmajervi MS, Fjalestad KT, Damsgard B, Delghandi M (2006) Development of 25 gene-associated microsatellite markers of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Mol Ecol Notes* 6:1105-1107
- Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2016) South american fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 0:1-19
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Vasemägi A, Nilsson J, Primmer CR (2005) Expressed sequence tag-linked microsatellite as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergente selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Mol Biol Evol* 22(4) 1067-1076
- Vasta GR, Nita-Lazar M, Giomarelli B, Ahmed H, Du S, *et al.* (2011) Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: Relevance to innate and adaptive immunity. *Dev Comp Immunol* 35(12):1388–1399
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370
- Yue GH, Li Y, Orban L (2001) Characterization of microsatellites in the IGF-2 and GH genes of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Mar Biotechnol* 3:1–3

Yue GH, Orban L (2002) Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. *Mol Ecol Notes* 2:99–100

Yue GH, Ho MY, Orban L, Komen J (2003) Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. *Aquaculture* 234:85-98

Lista de Figuras

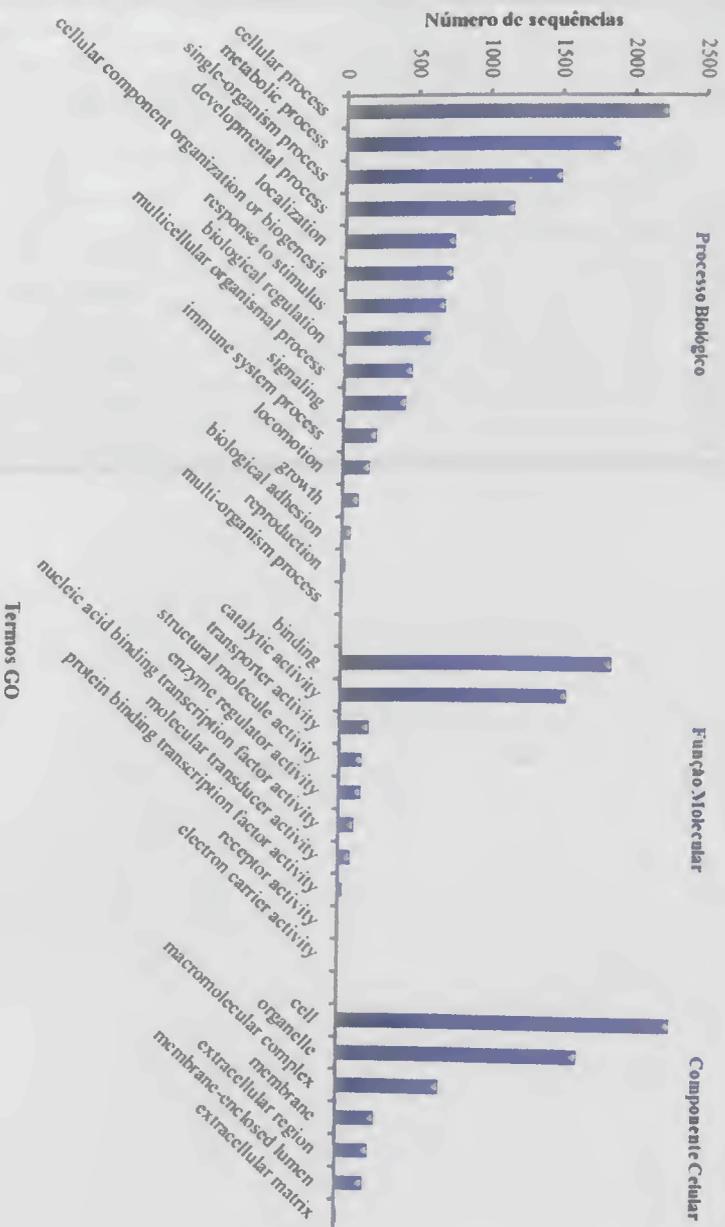


Fig 1. Classificação das seqüências em termos Gene Ontology (GO) e suas subclasses.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados obtidos no sequenciamento do transcriptoma (RNA-seq) e WGS.

| Características | RNA-seq | WGS |
|-------------------------------------|-------------|------------|
| Sequências | 277.245 | 42.563 |
| Total (pb) | 101.959.245 | 15.604.478 |
| Tamanho médio dos <i>reads</i> (pb) | 400.9 | 366.6 |
| <i>Contigs</i> | 7.119 | - |
| N50 | 865 | - |
| SSR | 748 | 6.105 |
| SSR com <i>primers</i> | 233 | 1.255 |
| Dinucleotídeos | 592 | 5.258 |
| Trinucleotídeos | 138 | 465 |
| Tetranucleotídeos | 14 | 339 |
| Pentanucleotídeos | 2 | 22 |
| Hexanucleotídeos | - | 21 |

Tabela 2. Caracterização de 31 microsátélites polimórficos neutro (WGS) em tambaqui (*Colossoma macropomum*).

| Loci | Primer | Motif | Ta (°C) | Tamanho (pb) | EHW | Fis | Ho | He | A | PIC |
|--------|---|----------|---------|--------------|-------|--------|-------|-------|----|-------|
| r912* | F: CAGTCGGGGCGTCATCACCACACATTGACCACACTCTGCTAC | AC(12) | 60 | 160-210 | 0 | 0,556 | 0,381 | 0,847 | 7 | 0,803 |
| | R: GCCACTACTGTTTCACTGGG | | | | | | | | | |
| r872 | F: GCAATGTCAGCTCCCTTTC | AGAT(15) | 60 | 240-320 | 0,104 | 0,144 | 0,773 | 0,900 | 13 | 0,868 |
| | R: CAGTCGGGCGTCATCAGCTCCATGTCTCAGATTAGCC | | | | | | | | | |
| r846* | F: CAGTCGGGCGTCATCAGCTTAACCAGCATGCAG | AG(10) | 60 | 140-190 | 0 | 0,604 | 0,364 | 0,905 | 15 | 0,875 |
| | R: GGAACCATGGGCAGGATTG | | | | | | | | | |
| r800 | F: TTCCTCTTGATCAGCGCGC | AC(12) | 60 | 240-280 | 0,069 | 0,143 | 0,773 | 0,899 | 14 | 0,867 |
| | R: CAGTCGGGCGTCATCATAAAGGGAGGTGGGTGTGAC | | | | | | | | | |
| r6071* | F: GGACTTACAGTGGATTTGGC | AGAT(11) | 60 | 250-300 | 0,298 | -0,060 | 0,958 | 0,905 | 11 | 0,875 |
| | R: CAGTCGGGCGTCATGTTCCCTGTAGATGATGTGC | | | | | | | | | |
| r5666 | F: TATTGGGCAGCTCAAAGGC | ACAT(7) | 60 | 200-300 | 0,020 | 0,060 | 0,708 | 0,753 | 10 | 0,703 |
| | R: CAGTCGGGCGTCATCAGTTGGAAATGTCATGTGG | | | | | | | | | |
| r5455 | F: CAGTCGGGCGTCATCATTTCCGGTGTACTAGATGGATTGG | AGAT(9) | 60 | 140-200 | 0,228 | 0,121 | 0,75 | 0,851 | 11 | 0,816 |
| | R: CGCTGCAGTATAAGTGGTGC | | | | | | | | | |
| r4992 | F: CAGTCGGGCGTCATCATCGTCTCACCTGGCAAC | AC(9) | 60 | 170-190 | 0,441 | -0,055 | 0,75 | 0,712 | 4 | 0,637 |
| | R: AGCTCCTAAACACTCCCTCC | | | | | | | | | |
| r4990* | F: CGTCGCCGCAATAACTACTG | ATC(11) | 60 | 170-280 | 0,001 | 0,417 | 0,5 | 0,850 | 8 | 0,811 |
| | R: CAGTCGGGCGTCATCATAGCTGTGTTCAACAAACG | | | | | | | | | |
| r4985 | F: TGCCATCTATCTGTCTGTG | AGAT(12) | 60 | 240-285 | 0,073 | 0,104 | 0,783 | 0,87 | 9 | 0,837 |
| | R: CAGTCGGGCGTCATCACCAATAGACCACACACTGC | | | | | | | | | |
| r4880* | F: ACCAAATCAAACAGCTCCGC | AAT(10) | 60 | 290-320 | 0,012 | 0,309 | 0,609 | 0,874 | 10 | 0,839 |
| | R: CAGTCGGGCGTCATCAGTCTGCCGTTGGTCAAG | | | | | | | | | |
| r4722* | F: CAGTCGGGCGTCATCAGCTCAGGATTACAGCAGC | AC(16) | 60 | 110-180 | 0,459 | 0,053 | 0,857 | 0,904 | 11 | 0,871 |
| | R: AGCGCGTTTCTATTACGCTG | | | | | | | | | |
| r4569 | F: TGGGTGGAAC TGAAACGAC | AAT(10) | 60 | 160-200 | 1 | -0,180 | 0,333 | 0,284 | 2 | 0,239 |
| | R: CAGTCGGGCGTCATCACCAAGCCATGAAGATACAGC | | | | | | | | | |
| r4496 | F: CATGTGGTGTGGGCTGAAC | AC(14) | 60 | 220-250 | 1 | -0,063 | 0,524 | 0,494 | 3 | 0,416 |
| | R: CAGTCGGGCGTCATCACTGTTGTCAACCCTCCAC | | | | | | | | | |
| r4481 | F: CAGCTTTCAC TGCAC TGAAG | AC(10) | 60 | 220-265 | 0,832 | 0,005 | 0,818 | 0,822 | 9 | 0,778 |
| | R: CAGTCGGGCGTCATCACTCTCACGGGCGAATCTTTC | | | | | | | | | |
| r4182- | F: CAGTCGGGCGTCATCAGTCCGTAAACGTGTCTCAATG | AC(18) | 60 | 130-170 | 0 | 0,120 | 0,810 | 0,918 | 13 | 0,887 |
| | R: TTCTACACTCACCGCTGCCTC | | | | | | | | | |
| r415 | F: CAGTCGGGCGTCATCAGTCTCTCAGGCTCATGG | ACTC(7) | 60 | 250-280 | 0,463 | 0,026 | 0,35 | 0,359 | 6 | 0,337 |
| | R: TGGTATTGGTCCCTGTCTC | | | | | | | | | |
| r3808 | F: CAGTCGGGCGTCATCAGTAATAGAGAGCTGGGCCG | AG(10) | 60 | 130-160 | 0,727 | 0,045 | 0,522 | 0,546 | 5 | 0,463 |
| | R: CGGCAGGTCAGTAACAGGAG | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | |
|---------|--|---------|----|---------|-------|--------|-------|-------|----|-------|
| r13620 | F: CAGTCGGGGCGTCATCATCCACCACCAGCCCTTACAGAG R: TCAGCTGTCTTACGGCTCTCC | AG(12) | 60 | 115-145 | 0,012 | 0,272 | 0,455 | 0,621 | 6 | 0,574 |
| r13429 | F: CAGTCGGGGCGTCATCATCAGTAAAGGGGAGTCTC R: TCTTGTTCATGTAGTGGTGC | AAT(11) | 60 | 300-330 | 0,511 | 0,026 | 0,708 | 0,727 | 5 | 0,662 |
| r13264 | F: CAGTCGGGGCGTCATCAGGAGTAAGTGCAGATCCAG R: GCTGTATACATAGCGGGAAGG | AAT(9) | 60 | 300-315 | 0,384 | 0,064 | 0,522 | 0,557 | 4 | 0,467 |
| r13061* | F: CAGTCGGGGCGTCATCACCACCTCATGACATTTGACCC R: GTTGTGCTGCTCAGAGTGTG | AGAT(9) | 60 | 280-340 | 0,022 | 0,214 | 0,727 | 0,921 | 14 | 0,891 |
| r12899 | F: CAGTCGGGGCGTCATCATTTCAAAACCAGGCGCTTCC R: GAACGGTTCCTTCGGGAATC | AGC(8) | 60 | 110-130 | 0,474 | 0,051 | 0,545 | 0,574 | 4 | 0,465 |
| r12823 | F: CAGTCGGGGCGTCATCACAAAGAACCCTTCTCTGGC R: GCGTACTTACAGCGGAACAC | AC(9) | 60 | 205-225 | 0,178 | 0,167 | 0,565 | 0,676 | 6 | 0,614 |
| r12355 | F: CAGTCGGGGCGTCATCAGTACCCTGAGACCAGATTGC R: ATACACGACCGCATGCATTCC | AC(8) | 60 | 230-250 | 0,760 | -0,057 | 0,619 | 0,587 | 5 | 0,537 |
| r11986* | F: CAGTCGGGGCGTCATCATTTCCCATGTTTGAGAGCG R: CATGACATCAATGCTTACACCG | AC(13) | 60 | 195-225 | 0,022 | 0,167 | 0,739 | 0,884 | 12 | 0,85 |
| r11935 | F: ACACCTGCTGCCATAGACTC R: CAGTCGGGGCGTCATCATGTGAGTGAATTGTCTCC | AG(15) | 60 | 120-170 | 0,444 | 0,080 | 0,727 | 0,789 | 7 | 0,822 |
| r11366 | F: CAGTCGGGGCGTCATCATCTCATAGCGGGTCAGTCTG R: CTGGTCTGTGTCCTCAGCTG | ACAT(9) | 60 | 240-290 | 0,546 | 0,128 | 0,75 | 0,857 | 9 | 0,819 |
| r11342 | F: ACAGACAAGGAAGGAGAGCG R: CAGTCGGGGCGTCATCAGCAGGACCACACTTTGTTT | AG(10) | 60 | 240-300 | 0,012 | 0,050 | 0,818 | 0,860 | 10 | 0,822 |
| r1247*- | F: CAGTCGGGGCGTCATCAGCAATTAGAGCCCTGAGTGTGG R: GGCGAACATGGAACTGCATC | AC(17) | 60 | 210-280 | 0 | 0,351 | 0,591 | 0,903 | 11 | 0,872 |
| r11163 | F: CAGTCGGGGCGTCATCAACTGTACATCCAAGCCAGG R: TTATGGGTCTTGAAGGCTCCC | AC(9) | 60 | 250-280 | 0,664 | 0,083 | 0,478 | 0,521 | 3 | 0,4 |

TA = Temperatura de anelamento, P (EHW) = equilíbrio de Hardy-Weinberg, Fis = coeficiente de endogamia, Ho = heterozigidade observada, He = heterozigidade esperada, A = número de alelos por loci, PIC = Conteúdo de Informação Polimórfica. (*) indica a presença de alelos nulos (*) indica desequilíbrio de ligação. (-) indica loci fora do EHW após correção de Bonferroni (p = 0,0011).

Tabela 3. Caracterização de 14 microssatélites gene-associados polimórficos (RNA-seq) em tambaqui (*Colossoma macropomum*).

| Locl | Gene | Primer | Motif | Ta (°C) | Tamanho (pb) | EHW | Fis | Ho | He | A | PIC |
|---------|--|---|----------|------------|-----------------|-------|--------|-------|-------|---|-------|
| c841 | Uncharacterized protein KIAA0754-like | F: GACGTCAGAATGCGCTGTCG | AG (5) | 60 | 210-230 | 0,559 | 0,004 | 0,333 | 0,334 | 3 | 0,303 |
| | | R: CAGTCGGGGCGTCATCATCCAGCGCTGTTCACTCTC | | | | | | | | | |
| c5837 | La-related protein 1 isoform X3 | F: GTGCTCTGAAGTTCACCGAC | ACTCC(5) | 60 | 160-190 | 0,511 | -0,076 | 0,739 | 0,688 | 6 | 0,631 |
| | | R: CAGTCGGGGCGTCATCATCTGCCACTCTGGCTCTTAG | | | | | | | | | |
| c5009 | Abhydrolase domain- containing protein 3-like | F: CAGTCGGGGCGTCATCATCTTCGGTAAACAGGCCATG | AAT(5) | 60 | 120-200 | 1 | 0,022 | 0,429 | 0,438 | 2 | 0,336 |
| | | R: TGGCATTGCCGTTAACACACC | | | | | | | | | |
| c4706 | Beta-1-syntrophin | F: TGAGACGTTCAAGCTCCTCAG | AGG(5) | 60 | 160-200 | 0,893 | 0,068 | 0,609 | 0,652 | 3 | 0,564 |
| | | R: CAGTCGGGGCGTCATCATCTCCGCCAAGATCAG | | | | | | | | | |
| c4604 | Arylsulfatase A | F: CAGTCGGGGCGTCATCACAGGAGACATGCTAGCTG | AGC(6) | 60 | 120-160 | 0,105 | 0,185 | 0,542 | 0,662 | 5 | 0,602 |
| | | R: GCATTTCACTCGTACCGCTCG | | | | | | | | | |
| c4296 | GTPase IMAP family member 8-like, partial | F: AGCTATTCTCCTCCCAAAAC | AG(9) | 60 | 105-125 | 0,413 | 0,204 | 0,583 | 0,730 | 5 | 0,668 |
| | | R: CAGTCGGGGCGTCATCACAGCACATATCCAGAGTCC | | | | | | | | | |
| c3905 | Protein asunder homolog | F: AGATGATGTATGGCAGGG | ATC(5) | 58 | 150-180 | 1 | -0,056 | 0,15 | 0,142 | 2 | 0,129 |
| | | R: CAGTCGGGGCGTCATCACTCTTCCCTTGACAGCCCGTG | | | | | | | | | |
| c3843** | Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5A | F: CAGTCGGGGCGTCATGAAACGGGACCTTAGACGG | AGG(6) | 60 | 180-210 | 0,003 | 0,483 | 0,304 | 0,583 | 3 | 0,505 |
| | | R: TTCACCTGCTCAGCCTCTTC | | | | | | | | | |
| c3842 | Trinucleotide repeat- containing gene 6B protein-like isoform X5 | F: CAGTCGGGGCGTCATCAGCTGCTTCCCTCTGTGCC | ACT(5) | 60 | 170-200 | 0,093 | -0,397 | 0,696 | 0,502 | 2 | 0,371 |
| | | R: GGTCCGACCACCACTCACTATC | | | | | | | | | |
| c3818* | Ubiquitin carboxyl- terminal hydrolase 44 | F: CAGTCGGGGCGTCATCAGTCTCTCACGTTGCACAC | AC(12) | 60 | 200-250 | 0,003 | 0,311 | 0,591 | 0,851 | 9 | 0,813 |
| | | R: TGTAGTAGGGTTCAAGCGGTTG | | | | | | | | | |
| c3592 | Ranbp1 protein | F: AGGGAGAAGTGTTCAGAGTC | AG (6) | 60 | 165-185 | 0,538 | 0,106 | 0,273 | 0,304 | 2 | 0,253 |
| | | R: CAGTCGGGGCGTCATCAAAAGTGGCGGAGAACTGG | | | | | | | | | |
| c2647 | Mannose-1-phosphate guanylyltransferase beta | F: CAGTCGGGGCGTCATCATCCCAACCCTTACAATACGC | AC (6) | 60 | 195-215 | 1 | -0,026 | 0,095 | 0,093 | 2 | 0,087 |
| | | R: CTGAGCCCTCGCATCATCATG | | | | | | | | | |
| c2311 | Calnexin precursor | F: CAGTCGGGGCGTCATCAATTCACCCGCTCAGAC | ATC (8) | 60 | 150-200 | 0,357 | 0,101 | 0,696 | 0,772 | 7 | 0,719 |
| | | R: TCGGCACAGTTAAGGAATGG | | | | | | | | | |
| c1842* | Inositol oxygenase | F: CTACGACACCTGCTGCTTTG | ATC(7) | 60 | 150-170 | 1 | 0,007 | 0,455 | 0,458 | 3 | 0,366 |
| | | R: CAGTCGGGGCGTCATCACAGAAAGGAGAAAGGTGTG | | | | | | | | | |

TA = Temperatura de anelamento, P (EHW) = equilíbrio de Hardy-Weinberg, Fis = coeficiente de endogamia, Ho = heterozigiosidade observada, He = heterozigiosidade esperada, A = número de alelos por loci, PIC = Conteúdo de Informação Polimórfica. (*) indica a presença de alelos nulos (*) indica desequilíbrio de ligação.

Tabela 4. Comparação de resultados com dados descritos na literatura.

| Comparação dos Resultados | | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------|--|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------|
| Referências | Tipo de marcador | Quantidade de marcadores (Motifs) | Média de alelos | Média de H_E | Média de H_o | Média PIC |
| 7 | Neutro | 14 (dinucleotídeos) | 11,5 | 0,77 | 0,70 | * |
| 8 | Neutro | 13 (tri e tetranucleotídeos) | 7,0 | 0,76 | 0,65 | * |
| 9 | Neutro | 14 (dinucleotídeos) | 11,9 | 0,85 | 0,67 | 0,81 |
| Presente Estudo | Neutro | 31 (di, tri e tetranucleotídeos) | 8 | 0,72 | 0,65 | 0,70 |
| Presente Estudo | Gene-associado | 14 (di, tri e pentanucleotídeos) | 4 | 0,51 | 0,46 | 0,45 |

H_o = heterozigidade observada, H_E = heterozigidade esperada e PIC (Conteúdo de informação polimórfica). (*) Dados não disponíveis.

Manuscrito 2

**Caracterização de marcadores microssatélites
associados ao crescimento e análise de
resistência à *Aeromonas hydrophila* em
tambaqui *Colossoma macropomum***



Resumo

O cultivo de tambaqui, *Colossoma macropomum*, está crescendo em países da América do Sul e, no Brasil, é a principal espécie nativa produzida. Por isso, pode ser considerada uma espécie alvo para o melhoramento genético em aquicultura, aumentando sua produtividade e gerando impacto econômico. Além disso, estudos de melhoramento podem ser otimizados com o uso de marcadores moleculares associados a fenótipos produtivos. O objetivo deste estudo foi testar o desempenho de características de crescimento e resistência à bactéria *Aeromonas hydrophila*, em associação com marcadores microssatélites no tambaqui *C. macropomum*. Neste estudo, três famílias de tambaqui (n = 120) foram formadas e submetidas ao desafio bacteriano e avaliações morfométricas de crescimento. Em relação ao desafio bacteriano, as famílias diferiram significativamente para o tempo de morte e taxa de mortalidade. Entretanto, não houve associação das características de resistência com os microssatélites. Em relação às características de crescimento, houve associação marcador/fenótipo em dois microssatélites. O marcador presente no gene *trinucleotide repeat-containing gene 6b isoform x5 (tncrc6b)* está associado ao comprimento padrão, enquanto que um marcador neutro (sem associação gênica) está associado à altura. O presente estudo possibilitou prospectar marcadores moleculares associados com crescimento que poderão ser utilizados na validação de seleção assistida por marcadores em famílias de tambaqui.

PALAVRAS-CHAVE: aquicultura, desafio bacteriano, melhoramento animal, QTL.

Abstract

The farming of tambaqui, *Colossoma macropomum*, is growing in countries of South America and it is the main native species produced in Brazil. Therefore, this fish can be considered a target species for genetic improvement in aquaculture, increasing its productivity and generating economic impact. In addition, breeding studies can be optimized with the use of molecular markers associated with productive phenotypes. The objective of this study was to test the performance of growth traits and resistance to the bacteria *Aeromonas hydrophila*, in association with microsatellite markers in tambaqui *C. macropomum*. In this study, three families of tambaqui (n = 120) were created and submitted to bacterial challenge and morphometric growth assessments. Regarding the bacterial challenge, the families differed significantly for the time of death and mortality rate. However, there was no association of resistance characteristics with microsatellites. Regarding the growth characteristics, there was a marker/phenotype association in two microsatellites. The marker present in the repeat-containing gene 6b isoform x5 gene (*tnrc6b*) is associated with the standard length, whereas a neutral marker (without gene association) is associated with height. The present study allowed to prospect for molecular markers associated with growth that could be used in the validation of marker assisted selection in tambaqui.

KEY-WORDS: aquaculture, bacterial challenge, animal improvement, QTL

1. Introdução

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), é uma espécie de peixe de grande porte, que pode atingir 1 m de comprimento padrão e pesar até 30 kg. No Brasil, é a principal espécie nativa produzida, com um total aproximado de 135,86 mil toneladas no ano (IBGE, 2016). Além disso, o cultivo de *C. macropomum* está crescendo em países da América do Sul, como a Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (Valladão *et al.*, 2016). Neste sentido, o melhoramento genético de estoques cultivados de *C. macropomum* pode ser uma ferramenta importante para aumentar a sua produtividade em aquicultura.

O conhecimento sobre o desempenho de crescimento, tolerância ao estresse, rendimento e qualidade da carne, assim como resistência a doenças, são muitas vezes limitadas a pesquisas em peixes exóticos, como a truta arco-íris, salmão e tilápia, por meio de programas de melhoramento genético (Gjedrem 2000, 2010; Brummett *et al.*, 2004). Em espécies de peixes nativos do Brasil, pouco esforço tem sido destinado para obtenção de linhagens geneticamente melhoradas.

Um dos principais problemas nos estoques aquícolas é a mortalidade ocasionada por patógenos, dos quais destaca-se a infecção por *Aeromonas hydrophila*. Esta bactéria é frequentemente associada à septicemia hemorrágica, à erosão das nadadeiras e à distensão da cavidade abdominal, entre outras condições patológicas (Paniagua *et al.*, 1990, Joseph *et al.*, 1994) que ocasionam a mortalidade em massa de várias espécies (Abdel-Tawwab *et al.*, 2008). Deste modo, estudos de resistência à esta bactéria são de interesse para a aquicultura,

visto que esta bactéria ocasiona grandes perdas econômicas para o setor aquícola (Monette *et al.*, 2006).

Estudos de melhoramento podem ser otimizados com o uso de marcadores moleculares associados a fenótipos produtivos. Deve-se destacar que o uso da seleção assistida por marcadores (MAS) pode ajudar a melhorar geneticamente a espécie em cerca de 25 a 50% em comparação com as técnicas tradicionais de reprodução seletiva artificial, pois centra-se principalmente na análise de genótipos-alvo combinados com fenótipos, além de poder ser realizado durante os estágios iniciais de vida dos organismos (Ma *et al.*, 2014). A associação de marcadores moleculares à fenótipos produtivos são úteis como ferramentas para auxiliar a seleção de prole (Na-Nakorn e Moeikum, 2009). Estudos genéticos têm buscado a identificação, caracterização e validação de marcadores moleculares associados a diferentes características, incluindo o crescimento e resistência a patógenos em distintas espécies (Rodríguez-Ramilo *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012).

Tendo em vista os avanços genéticos e as vantagens da utilização de programas de melhoramento, este estudo teve como objetivo testar o desempenho de características de crescimento e resistência à bactéria *Aeromonas hydrophila*, em associação com marcadores microssatélites no tambaqui *C. macropomum*.

2. Material e Métodos

Todos os experimentos realizados com peixes foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Câmpus de Jaboticabal – SP, protocolo: 18.764/16.

2.1 Formação das famílias

Três famílias foram formadas a partir de três casais de reprodutores, provenientes do plantel de reprodutores do Centro de Aquicultura da UNESP (Caunesp), em Jaboticabal-SP. A indução à desova foi realizada com uso de extrato bruto de hipófise de carpa, dissolvido em solução salina (0,9% NaCl) e aplicado intramuscular em duas doses, com intervalo de 12 h (1ª dose de 0,6 mg hipófise kg⁻¹ de peixe; 2ª dose de 5,4 mg de hipófise kg⁻¹ de peixe), conforme protocolo descrito por (Pinheiro *et al.*, 1988). Os peixes manipulados foram anestesiados por meio de imersão em benzocaína diluída em água (100 mg / L).

Uma pequena parcela das larvas, eclodidas de cada casal (aproximadamente 150 larvas por família), foi mantida em hapas separadas de aproximadamente 60 L até atingirem aproximadamente 3 g de peso corporal. Em seguida, os juvenis foram identificados morfológicamente com marcações coloridas (cada família possuía uma coloração diferente). Após a marcação, os juvenis foram soltos em três diferentes tanques com capacidade para 500 L. Nesse período, foram alimentados quatro vezes ao dia com aproximadamente 100 náuplios de *Artemia* / larva / dia (BioArtemia. Ltda, RN, Brasil) e após um período de 20 dias, alimentadas com ração comercial em pó e com ração extrusada, com frequência de 4 porções diárias, até completarem 6 meses após a eclosão.

2.2 Experimento de desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila*

Um total de 40 animais foram utilizados de cada família (3 famílias, n = 120) para o delineamento experimental (inteiramente ao acaso) de desafio à bactéria *A. hydrophila*, sendo 30 para tratamento (10 em cada réplica, em triplicata) e 10 para o grupo controle. Cada réplica foi mantida em uma caixa de 500 L (densidade de ~

7 g de peixe por 1 L de água), com um sistema de recirculação de água independente, filtro mecânico, filtro biológico e temperatura mantida constante em $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O desafio bacteriano foi realizado com uma cepa de *A. hydrophila*, isolada de um surto de aeromoniose e mantida pelo Laboratório de Patologia do Caunesp. Para escolha da melhor dose de *A. hydrophila*, a dose letal em 50% dos indivíduos (DL50) foi testada previamente nas seguintes dosagens: 10^6 , 10^7 e 10^8 Unidade Formadora de Colônias (UFC) por mL^1 de cepa viva de *A. hydrophila*, em 30 indivíduos (10 de cada família) escolhidos aleatoriamente das famílias de tambaqui, por meio da inoculação intraperitoneal. No experimento desafio definitivo, a infecção foi induzida por meio de inoculação de $0,1 \times 10^8$ UFC / 10 g de peso corporal.

As famílias infectadas foram observadas por um período de 15 dias em relação a duas características: taxa de mortalidade e tempo de morte. Todos os animais que morreram tiveram os sinais clínicos decorrentes da aeromoniose, como petéquias hemorrágicas, distensão da cavidade abdominal, lesões ulcerativas na superfície do corpo, isolamento do cardume e coloração escura.

Para avaliar a resistência entre as famílias, análises de variância do tempo de morte foram realizadas por meio do Teste de Tukey ($p < 0,05$) e a taxa de mortalidade foi avaliada por testes de Qui-Quadrado ($p < 0,01$).

2.3 Medições das características de crescimento

Seis características relacionadas ao crescimento foram mensuradas em 96 indivíduos, sendo 32 irmãos completos de cada família. Estas características incluem o comprimento da cabeça (CC), altura da cabeça (AC), comprimento

padrão (CP), altura do início da nadadeira dorsal até o início da nadadeira ventral (A1), altura do final da nadadeira dorsal ao começo da nadadeira anal (A2) e peso corporal (P).

As cinco medidas morfológicas foram aferidas em milímetros por meio do *software* Image J / Fiji 1.46 e o peso corporal foi mensurado por uma balança digital de precisão (precisão de 0,01 g). Após as medições, análises de correlações das variáveis morfométricas foram estimadas por meio da correlação de Pearson. Não foi possível realizar análises comparativas de crescimento entre as famílias, visto que as famílias avaliadas cresceram em ambientes diferentes.

2.4 Avaliação dos marcadores microssatélites

Microssatélites gene-associados foram priorizados para o teste de associação com os fenótipos de crescimento e resistência a *A. hydrophila*, sendo escolhidos 13 marcadores gene-associados (c5009, c5837, c4604, c3592, c3842, c4296, c2311, c3818, c841, c4706, c2647, c3843, c3905) e 4 marcadores neutros (r1366, r912, r415, r3808). Inicialmente, um total de 17 microssatélites descritos anteriormente (capítulo 1) foram testados nos parentais. Entretanto, apenas os marcadores com genótipo heterozigoto, em um dos parentais, foram selecionados para o teste na respectiva progênie. Dos 17 marcadores, apenas 9 microssatélites (c5837, c4604, c3592, c3842, c4296, c2311, c3818, r1366, r912) foram heterozigotos nos parentais, sendo que sete são microssatélites gene-associados e dois marcadores neutros. Os indivíduos da família 1 foram genotipados com os seguintes microssatélites c2311, c3592, c5837, c3818, c4296; a família 2 com c3842; e a família 3 com c4604, c3842, r1366, r912.

O DNA genômico foi extraído de fragmentos de nadadeiras dos irmãos completos e dos três casais parentais ($n = 6$), seguindo o protocolo do kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (*Promega*). As amplificações foram feitas por PCR (com adição de fluorocromos, FAM, HEX e NED) e ocorreram conforme descrito a seguir: 1X de tampão da Taq polimerase; 1,5 mM de $MgCl_2$; 100 μM de cada dNTP; 0,1 μM de cada *primer* (F e R); 0,01 μM do *primer* CAGtag; 10-50 ng de DNA genômico e 0,5 U de Taq polimerase (Invitrogen). Os ensaios de PCR foram realizados no equipamento ProFlex™ PCR System (*Life Technologies*) com nove ciclos de 95 °C / 30s, 55 a 60 °C / 30s (ajustado para cada *loci* de microssatélite), e 72 °C / 20s; e 30 ciclos de 95 °C / 30s, 50 °C / 30s e 72 °C / 20s.

A genotipagem foi realizada no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), sediada na UNESP – Jaboticabal/SP, por sequenciador automático ABI3730 XL DNA Analyzer (*Applied Biosystems*) utilizando a matriz DS-30, com o marcador GeneScan 500 ROX dye Size Standard (*Thermo*). A análise e padronização dos tamanhos de fragmentos de alelos foram realizadas por meio do *software* “GeneMapper v.4.0” (*Applied Biosystems*). Foram realizados testes de Qui-Quadrado ($p < 0,01$) nos genótipos das progênes para verificar se estes estão distribuídos de acordo com o padrão mendeliano.

A associação microssatélite / fenótipo foi avaliada por meio da análise de variância utilizando o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, version 9.2), aplicando o Modelo Linear Generalizado (PROC GLM), com o modelo: $Y = m + G + e$, em que, Y é o valor observado de determinada característica contínua (características de crescimento e tempo de morte); m é a média geral da característica; G é o efeito do genótipo; e e o efeito de erro aleatório ($p < 0,05$). O modelo estatístico escolhido foi baseado no modelo descrito por Ma *et al.* (2014),

com algumas modificações. A taxa de mortalidade foi considerada uma característica binária (vivo = 1 e morto = 0), deste modo, este fenótipo foi avaliado por meio de tabela de contingência (teste de Qui-Quadrado, $p < 0,01$).

3. Resultados

3.1 Análises de variância entre tempo de morte e taxa de mortalidade

As primeiras mortalidades ocorreram 11 h após o desafio em todas as unidades experimentais, com exceção dos peixes do tratamento controle inoculados com solução salina. Os tempos observados nas famílias 1, 2 e 3 (em horas) foram 17,20; 9,13 e 18,25 h, respectivamente, evidenciando diferenças significativas entre as famílias 1-2 e 2-3 (Figura 1). Além disso, as taxas de mortalidade foram significativamente diferentes entre as famílias, demonstradas na Figura 2, sendo a porcentagem da família 2 (57,6%) superior às famílias 1 (30,5%) e 3 (28,5%).

3.2 Análises Morfométricas

Entre os indivíduos da família 1, o menor peso (g) encontrado foi 12 e o maior foi 70 g; na família 2, de 16 e 67g; e na família 3, de 21 e 57g, respectivamente. As demais características morfométricas estão descritas na (Tabela 1).

A correlação fenotípica revelou que todas as características avaliadas estão correlacionadas significativamente ($p < 0,01$). No entanto, as medidas de comprimento padrão (CP) e altura (A1) estão pouco correlacionadas, com valor de correlação igual a 0,37 (Tabela 2).

3.3 Associação dos genótipos com as características de interesse

Os genótipos dos parentais com seus respectivos microssatélites estão descritos na Tabela 3. Os genótipos das progênes, assim como a média das características de crescimento, estão descritos na Tabela 4. Em relação à característica de resistência a *A. hydrophila*, não houve associação significativa entre os microssatélites ($p < 0,05$) para tempo de morte e taxa de mortalidade.

Em relação ao crescimento, houve associação significativa nas famílias 2 e 3 com os marcadores c3842 e r912, respectivamente. O marcador gene-associado c3842 apresentou associação com o comprimento padrão (CP) e o marcador neutro r912 com a altura 2 (A2). Dos peixes avaliados com o marcador c3842, os indivíduos com genótipo 183/183 apresentaram média de comprimento padrão maior (CP= 111,56) e o genótipo 183/186, média de (CP= 98,33) (mm) (Tabela 4). O marcador r912 apresentou médias diferentes da altura 2 (A2) em relação aos genótipos, ou seja, a média de A2 nos indivíduos com genótipo 175/175 foi de 27,44 e nos que apresentaram genótipo 175/185 a média foi de 29,65 (mm).

Apenas os marcadores c4604, c3842 e r1366 aplicados na família 3 não seguiram padrão de segregação mendeliano ($p < 0,01$) e, portanto, foram excluídos da análise de associação.

4. Discussão

Os experimentos de desafio realizados neste estudo revelaram variações significativas nos tempos de morte e taxa de mortalidade entre as famílias. Nossos resultados indicaram que a família 2 é mais suscetível à bactéria *A. hydrophila*, uma vez que o tempo de morte foi menor e a taxa de mortalidade desta família foi maior comparada às outras duas famílias. Estes resultados sugerem que a suscetibilidade

desta família a aeromoniose é ocasionada por fatores genéticos. Do mesmo modo, também foi observada a influência genética dos indivíduos em um desafio bacteriano em salmão (Houston *et al.*, 2010). Neste referido estudo, os autores observaram que os padrões de mortalidade dentro das famílias estavam relacionados com os genótipos dos animais, sugerindo que os peixes homocigotos para o alelo resistente não apresentariam mortes. Já os portadores de uma única cópia do alelo de resistência mostraram uma mortalidade baixa, indicando possível dominância do alelo de resistência.

Sabe-se que experimentos de desafio baseados em testes de sobrevivência à exposição a patógenos, têm sido realizados para buscar estimativas confiáveis de seleção de famílias resistentes às enfermidades (Moen *et al.*, 2007; Pardo *et al.*, 2008; Ødegard *et al.*, 2011). Embora o presente estudo não tenha identificado a associação de marcadores com a resistência a *A. hydrophila*, os dados obtidos no desafio podem ser úteis para futuros estudos de seleção de famílias resistentes em *C. macropomum*, visto que a bactéria *A. hydrophila* tem importância no setor aquícola, pois tem sido responsável por altas taxas de mortalidade ocasionando grandes prejuízos econômicos (Janda *et al.*, 1996).

Quanto ao desempenho de crescimento, neste estudo, os resultados de correlação fenotípica entre as medidas morfométricas foram semelhantes aos resultados encontrados em tambaqui por Mello *et al.* (2016), o qual demonstrou que a seleção para o peso do filé pode ser feita utilizando medidas morfométricas, pois há um coeficiente de correlação positivo entre tais características. Em ambos os estudos, o peso apresentou maior correlação fenotípica com o comprimento padrão e comprimento da cabeça (0,70 em ambos os estudos). Além disso, o maior valor

de correlação fenotípica foi observado entre o comprimento da cabeça e comprimento padrão (0,84, no presente estudo; e 0,9, em Mello *et al.*, 2016).

Sendo assim, de acordo com os dados morfométricos observados em *C. macropomum*, esta espécie apresenta um grande comprimento da cabeça. No entanto, esta característica não é atrativa para o setor comercial, pois, quanto maior o comprimento da cabeça menor o rendimento de filetagem, conforme evidenciado por Mello *et al.* (2016). Como observado em ambos os estudos, há uma correlação positiva entre comprimento da cabeça e peso e, deste modo, não é possível selecionar indivíduos de maior peso corporal sem que estes possuam comprimento de cabeça também maior. Este padrão de correlação também foi observado em tilápia do Nilo (Rutten *et al.*, 2005), pois foi observada uma forte relação entre as medidas corporais e o peso (0,9), sugerindo que a seleção para uma característica resultaria no ganho das demais características, assim como ocorre para o tambaqui.

Em relação à análise por marcadores genéticos, a maior parte dos estudos sobre crescimento associado a marcadores foram realizados em genes que estão diretamente ligados a este fenótipo, como o gene do hormônio do crescimento (*gh*) e o gene da insulina (*igf1*) (Yue e Orban, 2002; Tsai *et al.*, 2014). Diferente destes estudos, o marcador c3842, identificado neste estudo em associação com o crescimento, está inserido na região do gene *trinucleotide repeat-containing gene 6b isoform x5 (tncrc6b)*, localizado na região 5' UTR. Este gene já foi descrito em mamíferos (humanos e ratos) e em peixes (*Maylandia zebra*) e sua função pode estar relacionada com diferentes processos biológicos, como o silenciamento de genes guiados por miRNAs, e com a regulação positiva RNAm, dentre outros. Nesse sentido, deve-se destacar a importância de uma melhor compreensão sobre

o papel deste gene e a possível relação entre as suas funções moleculares com o crescimento diferencial desta espécie. Os resultados obtidos da análise de associação com o marcador gene-associado c3842 sugerem que o alelo 183, quando está em homozigose, exerça influência no aumento da média do CP do animal.

O segundo microssatélite que apresentou associação com o crescimento foi o marcador neutro r912. Em geral, os marcadores neutros são frequentemente utilizados em estudos de identificação de QTLs, pois nestes casos, os marcadores estão próximos fisicamente a estes *loci* e, portanto, intimamente ligados (Reid *et al.*, 2005; Bouza *et al.*, 2012). Nossos resultados sugerem que está relacionado a uma segunda característica morfométrica (Altura 2) e, de forma oposta ao observado no marcador gene-associado, o aumento da altura ocorre quando o marcador r912 está em heterozigose, sugerindo que a presença do alelo 185 exerça influência na altura do animal.

5. Conclusão

Os dados obtidos permitem direcionar futuros programas de melhoramento genético em relação a características de crescimento para tambaqui, pois os microssatélites prospectados poderão ser utilizados na validação de seleção assistida por marcadores em famílias de *C. macropomum*.

6. Referências Bibliográficas

- Bouza C, Hermida M, Pardo BG, Vera M, Fernández C, *et al.* (2012) An Expressed Sequence Tag (EST)-enriched genetic map of turbot (*Scophthalmus maximus*): a useful framework for comparative genomics across model and farmed teleosts. *BMC Genetics* 13:54
- Brummett RE, Angoni DE, Pouomogne V (2004) On-farm and on-station comparison of wild and domesticated Cameroonian populations of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 242:157-164
- Gjedrem T (2000) Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquac Res* 31:25-33
- Gjedrem T (2010) The first family-based breeding program in aquaculture. *Rev Aquaculture* 2:2-15
- Houston RD, Haley CS, Hamilton A, Guy DR, Mota-Velasco JC, *et al.* (2010) The susceptibility of Atlantic salmon fry to freshwater infectious pancreatic necrosis is largely explained by a major QTL. *Heredity* 105:318-327
- IBGE (2016) *Produção da Pecuária Municipal 2015*. Rio de Janeiro, 43:35-41
- Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Kellogg GH, Shimada T (1996) Further Studies on Biochemical Characteristics and Serologic Properties of the Genus *Aeromonas*. *J Clin Microbiol* 34(8):1930
- Ma H, Jiang W, Liu P, Feng N, Ma Q, *et al.* (2014) Identification of Transcriptome-Derived Microsatellite Markers and Their Association with the Growth Performance of the Mud Crab (*Scylla paramamosain*). *PLoS One* 9(2):e89134
- Mello FD, Oliveira CAL, Streit Jr D, Resende EK, Oliveira SN, *et al.* (2016) Estimation of Genetic Parameters for Body Weight and Morphometric Traits to Tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of Fisheries Sciences* 10(2):096-100

- Moen T, Sonesson A, Hayes B, Lien S, Munck H, *et al.* (2007) Mapping of a quantitative trait locus for resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo Salar*): comparing survival analysis with analysis on affected/resistant data. *BMC Genetics* 8:53
- Na-Nakorn U, Moeikum T (2009) Genetic diversity of domesticated stocks of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878), in Thailand: Relevance to broodstock management regimes. *Aquaculture* 297:70-77
- Ødegard J, Baranski M, Gjerde B, Gjedrem T (2011) Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: challenges and future prospects. *Aquac Res* 42:103-114
- Pardo BG, Fernández C, Millán A, Bouza C, Vázquez-López A, *et al.* (2008) Expressed sequence tags (ESTs) from immune tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) challenged with pathogens. *BMC Vet Res* 4:37
- Pinheiro JLP, *et al.* (1988) Produção de alevinos: tecnologia aplicada nas estações de piscicultura da CODEVASF no Baixo São Francisco. Brasília: CODEVASF 27p
- Reid DP, Szanto A, Glebe B, Danzmann RG, Ferguson MM (2005) QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Heredity* 94:166-172
- Rodríguez-Ramilo ST, Fernández J, Toro MA, Bouza C, Hermida M, *et al.* (2013) Uncovering QTL for resistance and survival time to *Philasterides dicentrarchi* in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Anim Genet* 44:149-157

- Rutten MJM, Bovenhuis H, Komen H (2005) Genetic parameters for fillet traits and body measurements in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture* 246, 125-132
- Song W, Li Y, Zhao Y, Liu Y, Niu Y, *et al.* (2012) Construction of a High-Density Microsatellite Genetic Linkage Map and Mapping of Sexual and Growth-Related Traits in Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*). *PLoS One* 7(12):e52097
- Tsai HY, Hamilton A, Guy DR, Houston RD (2014) Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF1) gene are associated with growth-related traits in farmed Atlantic salmon. *Animal Genetics* 45:709-715
- Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2016) South american fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 0:1-19
- Yue GH, Orban L (2002) Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. *Mol Ecol Notes* 2:99–100

Lista de Figuras

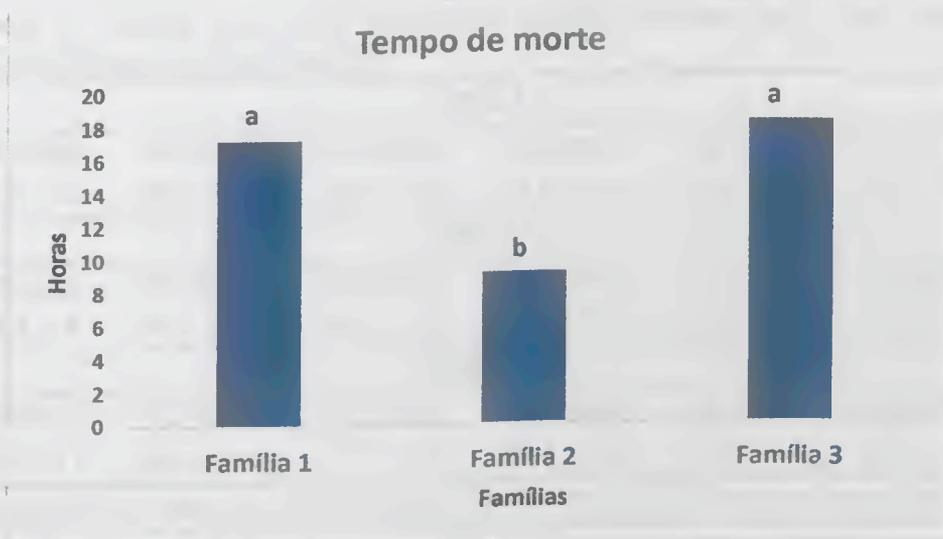


Figura 1. Comparação do tempo de morte entre as famílias.

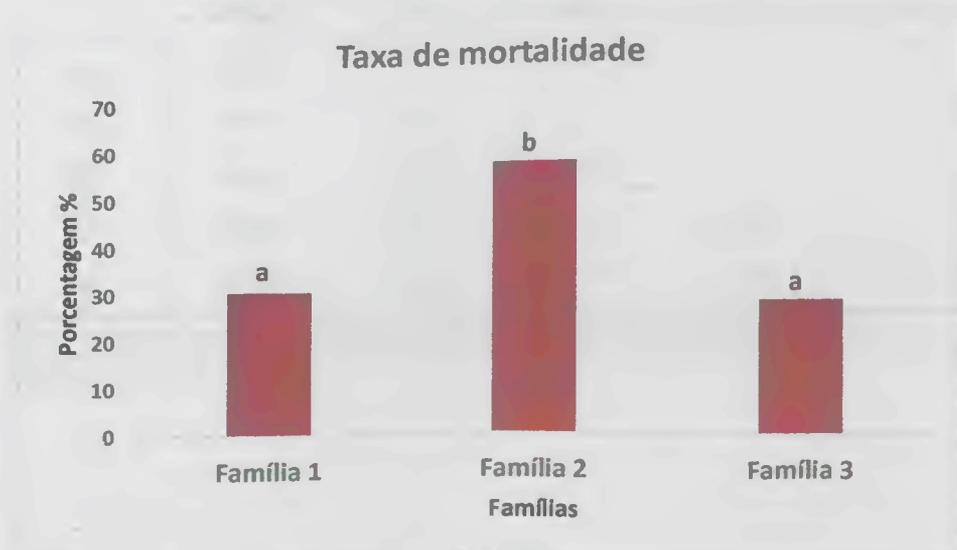


Figura 2. Comparação das taxas de mortalidade entre as famílias.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Médias com valor de desvio padrão do peso (g) e das medidas morfométricas (mm) por família.

| FAMÍLIA 1 | | | | | |
|-----------|------------|------------|--------------|-------------|------------|
| Peso (g) | CC (mm) | AC (mm) | CP (mm) | A1 (mm) | A2 (mm) |
| 44,5 ± 13 | 38,0 ± 4,9 | 34,5 ± 4,0 | 105,6 ± 11,3 | 55,4 ± 5,8 | 32,6 ± 4,7 |
| FAMÍLIA 2 | | | | | |
| Peso (g) | CC (mm) | AC (mm) | CP (mm) | A1 (mm) | A2 (mm) |
| 39,8 ± 8 | 38,5 ± 4,8 | 35,2 ± 3,9 | 104,3 ± 18,0 | 55,6 ± 10,1 | 32,2 ± 4,1 |
| FAMÍLIA 3 | | | | | |
| Peso (g) | CC (mm) | AC (mm) | CP (mm) | A1 (mm) | A2 (mm) |
| 31,7 ± 11 | 35,4 ± 4,6 | 31,1 ± 3,4 | 96,4 ± 8,2 | 47,4 ± 4,4 | 28,5 ± 3,0 |

CC= comprimento da cabeça, AC= altura da cabeça, CP= comprimento padrão, A1= altura do início da nadadeira dorsal até o início da nadadeira ventral, A2= altura do final da nadadeira dorsal ao começo da nadadeira anal.

Tabela 2. Correlações morfométricas.

| | PESO | CC | AC | CP | A1 |
|----|------|------|------|------|------|
| CC | 0.71 | | | | |
| AC | 0.70 | 0.94 | | | |
| CP | 0.73 | 0.84 | 0.83 | | |
| A1 | 0.62 | 0.58 | 0.62 | 0.37 | |
| A2 | 0.73 | 0.66 | 0.70 | 0.73 | 0.68 |

CC= comprimento da cabeça, AC= altura da cabeça, CP= comprimento padrão, A1= altura do início da nadadeira dorsal até o início da nadadeira ventral, A2= altura do final da nadadeira dorsal ao começo da nadadeira anal.



Tabela 3. Associação dos genótipos parentais com os microssatélites avaliados.

| | <i>Locl</i> | Genótipo ♂ | Genótipo ♀ |
|------------------|-------------|------------|------------|
| Família 1 | 5837 | 174/179 | 174/174 |
| | 2311 | 163/169 | 166/175 |
| | 3818 | 204/214 | 204/210 |
| | 3592 | 166/170 | 170/170 |
| | 4296 | 118/122 | 118/118 |
| Família 2 | 3842 | 183/186 | 186/186 |
| | 4604 | 142/151 | 148/151 |
| Família 3 | 3842 | 183/186 | 183/186 |
| | 1366 | 261/277 | 261/277 |
| | 912 | 175/175 | 175/185 |

Tabela 4. Representação das médias das medidas corporais relacionadas ao genótipo.

| Família | Locl | Genótipo | Frequência | Peso (g) | CC (mm) | AC (mm) | CP (mm) | A1 (mm) | A2 (mm) | |
|----------------|-------------|-----------------|-------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|
| 5837 | | 174/174 | 0,34 | 42,55 | 37,61 | 34,61 | 104,80 | 53,60 | 34,15 | |
| | | 174/179 | 0,66 | 42,52 | 38,17 | 34,44 | 106,07 | 53,27 | 31,92 | |
| | | 163/166 | 0,25 | 36,50 | 36,07 | 32,96 | 101,72 | 51,14 | 30,39 | |
| | | 163/175 | 0,41 | 45,08 | 38,94 | 35,45 | 107,49 | 54,44 | 33,92 | |
| | | 166/169 | 0,19 | 41,67 | 37,26 | 33,49 | 105,26 | 53,37 | 32,32 | |
| | | 169/175 | 0,16 | 46,60 | 39,37 | 35,67 | 107,51 | 54,25 | 33,61 | |
| 2311 | | 204/204 | 0,24 | 39,29 | 37,61 | 34,01 | 102,54 | 51,52 | 30,41 | |
| | | 204/210 | 0,34 | 37,40 | 36,74 | 33,67 | 101,44 | 50,86 | 32,17 | |
| | | 204/214 | 0,17 | 43,75 | 36,88 | 34,10 | 106,19 | 54,52 | 32,77 | |
| | | 210/214 | 0,24 | 51,71 | 41,36 | 36,62 | 114,07 | 57,56 | 35,60 | |
| | | 166/170 | 0,59 | 42,47 | 37,28 | 34,18 | 104,84 | 53,06 | 32,24 | |
| | | 170/170 | 0,41 | 42,62 | 38,99 | 34,96 | 106,78 | 53,85 | 33,34 | |
| 4296 | | 118/118 | 0,63 | 43,60 | 38,30 | 34,83 | 106,20 | 53,49 | 32,60 | |
| | | 118/122 | 0,38 | 40,75 | 37,45 | 33,94 | 104,68 | 53,21 | 32,82 | |
| | | 183/183 | 0,47 | 45,29 | 39,94 | 36,18 | 111,56 | 55,15 | 32,71 | |
| | | 183/186 | 0,53 | 36,50 | 38,13 | 34,81 | 98,33 | 54,42 | 32,38 | |
| | | 142/148 | 0,47 | 32,53 | 35,05 | 30,75 | 97,50 | 48,38 | 29,69 | |
| | | 142/151 | 0,22 | 30,43 | 34,67 | 31,30 | 95,06 | 46,04 | 27,09 | |
| 4604 | | 148/151 | 0,06 | 24,50 | 34,07 | 28,40 | 91,31 | 44,29 | 26,92 | |
| | | 151/151 | 0,25 | 32,88 | 36,92 | 32,22 | 96,39 | 47,16 | 27,81 | |
| | | 183/183 | 0,03 | 34,00 | 35,74 | 30,19 | 86,76 | 42,95 | 24,28 | |
| | | 183/186 | 0,56 | 30,72 | 35,60 | 31,41 | 96,13 | 47,79 | 28,94 | |
| | | 186/186 | 0,41 | 32,77 | 35,03 | 30,72 | 97,29 | 46,98 | 28,17 | |
| | | 261/261 | 0,06 | 29,00 | 32,21 | 29,85 | 94,11 | 46,71 | 27,93 | |
| 1366 | | 261/277 | 0,66 | 32,71 | 36,30 | 31,41 | 97,30 | 47,77 | 28,84 | |
| | | 277/277 | 0,28 | 29,78 | 33,91 | 30,62 | 94,47 | 46,35 | 27,76 | |
| | | 175/175 | 0,53 | 30,35 | 34,18 | 31,02 | 94,41 | 46,29 | 27,44 | |
| | | 175/185 | 0,47 | 33,13 | 36,72 | 31,16 | 98,46 | 48,46 | 29,65 | |
| | | 912 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| 3842 | | 183/183 | 0,47 | 45,29 | 39,94 | 36,18 | 111,56 | 55,15 | 32,71 | |
| | | 183/186 | 0,53 | 36,50 | 38,13 | 34,81 | 98,33 | 54,42 | 32,38 | |
| | | 142/148 | 0,47 | 32,53 | 35,05 | 30,75 | 97,50 | 48,38 | 29,69 | |
| | | 142/151 | 0,22 | 30,43 | 34,67 | 31,30 | 95,06 | 46,04 | 27,09 | |
| | | 148/151 | 0,06 | 24,50 | 34,07 | 28,40 | 91,31 | 44,29 | 26,92 | |
| | | 151/151 | 0,25 | 32,88 | 36,92 | 32,22 | 96,39 | 47,16 | 27,81 | |
| Familia 3 | | 183/183 | 0,03 | 34,00 | 35,74 | 30,19 | 86,76 | 42,95 | 24,28 | |
| | | 183/186 | 0,56 | 30,72 | 35,60 | 31,41 | 96,13 | 47,79 | 28,94 | |
| | | 186/186 | 0,41 | 32,77 | 35,03 | 30,72 | 97,29 | 46,98 | 28,17 | |
| | | 261/261 | 0,06 | 29,00 | 32,21 | 29,85 | 94,11 | 46,71 | 27,93 | |
| | | 261/277 | 0,66 | 32,71 | 36,30 | 31,41 | 97,30 | 47,77 | 28,84 | |
| | | 277/277 | 0,28 | 29,78 | 33,91 | 30,62 | 94,47 | 46,35 | 27,76 | |
| 912 | | 175/175 | 0,53 | 30,35 | 34,18 | 31,02 | 94,41 | 46,29 | 27,44 | |
| | | 175/185 | 0,47 | 33,13 | 36,72 | 31,16 | 98,46 | 48,46 | 29,65 | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

CC= comprimento da cabeça, AC= altura da cabeça, CP= comprimento padrão, A1= altura do início da nadadeira dorsal até o início da nadadeira ventral, A2= altura do final da nadadeira dorsal ao começo da nadadeira anal.

3. DISCUSSÃO GERAL

Para que possam ser realizados programas de melhoramento que utilizem marcadores moleculares na seleção, é necessária a caracterização de um alto número de marcadores moleculares (Navajas-Pérez *et al.*, 2012; Gutierrez *et al.*, 2015). Em geral, em estudos genéticos com peixes Neotropicais, grande parte dos marcadores caracterizados são para estudos de diversidade genética, estimativas do tamanho efetivo de populações, variabilidade genética, identificação de híbridos e espécies, entre outros (Barroso *et al.*, 2005; Hashimoto *et al.*, 2012; Bao *et al.*, 2016). Atualmente, a quantidade de marcadores prospectados para a realização de análise aplicada à seleção assistida é pequena para os peixes nativos, não sendo o suficiente para realizar estudos de associação de marcadores, construção de mapas genéticos e definição de estratégias de melhoramento.

O tambaqui é uma espécie importante do ponto de vista econômico e, portanto, uma espécie alvo para programas de melhoramento. Contudo, há pouco conhecimento genético desta espécie, sendo necessário o desenvolvimento de um maior número de marcadores que permitam realizar a sua associação com fenótipos desejáveis. Deste modo, este estudo foi o primeiro a contribuir com um grande número de marcadores para serem utilizados em estudos genéticos aplicados ao melhoramento do tambaqui.

A estratégia de sequenciamento genômico NGS permitiu o desenvolvimento de um alto número de marcadores, e disponibilizou milhares de microssatélites para futura validação. Estes novos microssatélites, somados aos descritos na literatura, possibilitam a construção de um mapa genético para *C. macropomum*. Além disso, uma contribuição importante deste estudo foi a prospecção de dois marcadores

moleculares que estão associados a características de crescimento em *C. macropomum*. Com os recentes avanços de tecnologias NGS, o presente estudo visou integrar estas ferramentas moleculares com o desempenho zootécnico do principal peixe nativo da aquicultura da América do Sul.

Por fim, o presente estudo estabeleceu um protocolo de desafio a *A. hydrophila* para tambaqui. Como a propagação de doenças é um dos principais problemas para a produção na aquicultura, é de interesse determinar a relação genética com às características de resistência a doenças (Moen *et al.*, 2004). Por meio de desafios bacterianos, é possível a identificação de genes responsáveis por diferentes respostas do sistema imune, o que permitirá a seleção de animais mais resistentes e que respondam melhor aos tratamentos (Pardo *et al.*, 2008; Ødegard *et al.*, 2011).

4. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- Bao MM, Zhou Q, Xie CX, Cai LG, Niu JG, et al. (2016) Ten polymorphic microsatellite markers characterized for *Schizothorax pseudaksaiensis* and applied for population genetic analysis. *J Genet* 95:e5–e8
- Barroso RM, Hilsdorf AWS, Moreira HLM, Cabello PH, Traub-Cseko YW (2005) Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. *Aquaculture* 247:51-65
- Carvalho DC, Beheregaray LB (2011) Rapid development of microsatellites for the endangered Neotropical catfish *Conorhynchus conirostris* using a modest amount of 454 shot-gun pyrosequencing. *Conserv Genet Resour* 3:373-375

- Carvalho DC, Rodríguez-Zárate CJ, Hammer MP, Beheregaray B (2011) Development of 21 microsatellite markers for the threatened Yarra pygmy perch (*Nannoperca obscura*) through 454 shot-gun pyrosequencing. *Conserv Genet Resour* 3:601-604
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, *et al.* (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature* 12(7):499-510
- Esteve C, Gutierrez MC, Ventosa A (1995) *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int J Syst Bacteriol* 45:462-466
- FAO (2016) The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. FAO: Rome, Italy, 200pp
- Ferguson A, *et al.* (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. *J Fish Biol* 47:103-126
- Gjedrem T, Thodesen J (2005) Selection. In: Gjedrem, T. (Ed.), *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*. Springer, The Netherlands. ISBN: 1-4020-3341-9, pp.11-89
- Gjedrem T (2010) The first family-based breeding program in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 2:2-15
- Gjedrem T. (2015) Disease resistant fish and shellfish are within reach: a review. *J Mar Sci Eng* 3:146-153
- Goddard ME, Hayes BJ (2009) Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nat Ver Genet* 10:381-391

- Godinho HP (2007) Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção Rev Bras Reprod Anim 31(3):351-360
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, *et al.* (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. Nat Biotechnol 29(7):644-52
- Gross JB, Furterer A, Carlson BM (2013) An integrated transcriptome-wide analysis of cave and surface dwelling *Astyanax mexicanus*. PLoS One 8:e55659
- Gutierrez AP, Yáñez JM, Fukui S, Swift B, Davidson WS (2015) Genome-Wide Association Study (GWAS) for Growth Rate and Age at Sexual Maturation in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). PLoS One 10(3): e0119730
- Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2012) Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. Aquac Res 1-9
- IBGE (2016) Produção da Pecuária Municipal 2015. Rio de Janeiro, 41:1-108
- Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Kellogg GH, Shimada T (1996) Further Studies on Biochemical Characteristics and Serologic Properties of the Genus *Aeromonas*. J Clin Microbiol 34(8):1930
- Ji P, Liu G, Xu J, Wang X, Li J, *et al.* (2012) Characterization of common carp transcriptome: sequencing, de novo assembly, annotation and comparative genomics. PLoS One 7(4):e35152
- Korol A, Shirak A, Cnaani A, Hallerman EM (2007) Detection and analysis of QTLs for economic traits in aquatic species. In: Liu ZJ (ed.), Aquaculture Genome Technologies. Blackwell, pp. 169–197

- Liu Z, Li RW, Waldbieser GC (2008) Utilization of microarray technology for functional genomics in ictalurid catfish. *J Fish Biol* 72:2377-2390
- Long Y, Li Q, Zhou B (2013) De novo assembly of Mud Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) skin transcriptome to identify putative genes involved in immunity and epidermal mucus secretion. *PLoS One* 8:e56998
- Ma H, Jiang W, Liu P, Feng N, Ma Q, *et al.* (2014) Identification of Transcriptome-Derived Microsatellite Markers and Their Association with the Growth Performance of the Mud Crab (*Scylla paramamosain*). *PLoS One* 9(2): e89134
- Ma D, Ma A, Huang Z, Wang G, Wang T, *et al.* (2016) Transcriptome Analysis for Identification of Genes Related to Gonad Differentiation, Growth, Immune Response and Marker Discovery in The Turbot (*Scophthalmus maximus*). *PLoS One* 11(2):e0149414
- Matioli SR (2001) Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucleicos. In: Matioli SR (ed.). *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos 153-161
- Milach SCK (1998) Marcadores de DNA. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* 1(5):14-17
- Moen T, Hoyheim B, Munck H, Gomez-Raya L (2004) A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. *Anim Genet* 35: 81–92
- Navajas-Pérez R, Robles F, Molina-Luzón M, De La Herran R, Álvarez-Dios J *et al.* (2012) Exploitation of a turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immune-related expressed sequence tag (EST) database for microsatellite screening and validation. *Mol Ecol Resour* 12: 706–716

- Ødegard J, Baranski M, Gjerde B, Gjedrem T (2011) Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: challenges and future prospects. *Aquac Res* 42:103-114
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 2:294-307
- Pardo BG, Fernández C, Millán A, Bouza C, Vázquez-López A, *et al.* (2008) Expressed sequence tags (ESTs) from immune tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) challenged with pathogens. *BMC Veterinary Research* 4:37
- Ponzoni RW, Nguyen NH, Khaw HL, Hamzah A, Bakar KRA, *et al.* (2011) Genetic improvement of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with special reference to the work conducted by the WorldFish Center with the GIFT strain. *Reviews in Aquaculture* 3:27-41
- Sonesson A (2007) Within-family marker-assisted selection for aquaculture species. *Genet Sel Evol* 39: 1–17
- Studart MT (2001) Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP. 2001. 73p. Dissertação (Mestrado em genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo
- Taylor JF (2014) Implementation and accuracy of genomic selection. *Aquaculture* 420-421(Suppl.1), S8–S14
- Tian C, Yang M, Lv L, Yuan Y, Liang X, *et al.* (2014) Single Nucleotide Polymorphisms in Growth Hormone Gene and Their Association with Growth Traits in *Siniperca chuatsi* (Basilewsky). *Int J Mol Sci* 15:7029-7036

Villanueva B, Fernández J, García-Cortés LA, Varona L, Daetwyler HD, *et al.* (2011)
Accuracy of genome-wide evaluation for disease resistance in aquaculture
breeding programs. *J Anim Sci* 89:3433-3442