



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

JAMILLE MARTINS FORTE

**APLICAÇÕES DE MARCADORES MOLECULARES NAS PRINCIPAIS ESPÉCIES
DA AQUICULTURA DO NORDESTE BRASILEIRO**

FORTALEZA

2015

JAMILLE MARTINS FORTE

**APLICAÇÕES DE MARCADORES MOLECULARES NAS PRINCIPAIS ESPÉCIES
DA AQUICULTURA DO NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Rui Simões de Menezes

F841a Forte, Jamille Martins.

Aplicações de marcadores moleculares nas principais espécies da aquicultura do
Nordeste Brasileiro / Jamille Martins Forte. – 2015.

66f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do
Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientação: Prof^o. Dr^o. Rodrigo Maggioni.

1. Animais aquáticos - Criação - Monitoramento. 2. Tilápia do Nilo. 3. Camarão
branco. I. Título.

CDD 591.77


JAMILLE MARTINS FORTE

“APLICAÇÕES DE MARCADORES MOLECULARES NAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DA AQUICULTURA DO NORDESTE BRASILEIRO”


Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de MESTRE em Ciências Marinhas Tropicais, área de concentração em Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Aprovada em, 09 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rodrigo Maggioni
UFC – Orientador – Presidente



Prof. Dr. Vicente Vieira Faria
UFC – Examinador Interno



Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra
UFRPE – Examinadora Externa à Instituição

A Deus, a N. Senhora de Fátima e ao Sagrado
Coração de Jesus.

Aos meus pais, ao Fagner e amigos.

AGRADECIMENTO

À Deus, N. Senhora de Fátima e ao Sagrado coração de Jesus, pois sempre me mostraram meios de superar as dificuldades e a alegria de viver.

Aos meus pais, pois desde pequena me introduziram na educação e até hoje me guiam para me manter firme neste caminho. Principalmente, a minha mãe Rosa e ao meu pai de coração Paulo José que estão sempre presentes nesta jornada com imenso amor, sabedoria e resistência diante dos problemas.

Ao meu grande amor Fagner, pelo seu companheirismo e ajuda em vários dias em que passamos trabalhando até tarde, pela sua expressão de tranquilidade quando o momento era conturbado, pela sua exigência para melhorar muitos procedimentos e, principalmente, pelo seu amor.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maggioni pela excelente orientação e inúmeros ensinamentos acadêmicos que guardarei para a futura vida profissional.

CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos professores Vicente Faria e Maria Raquel Moura Coimbra pelo tempo dedicado as correções e sugestões a dissertação.

Aos colegas do laboratório (Janaína, André, Rubens, João e Max), pelas reflexões, críticas e vários momentos de descontração dos quais sempre lembrarei com muita alegria. Como também a amiga Graça, por várias vezes animar e fortalecer para mais um dia de trabalho.

“Quem deseja aprender a voar deve primeiro aprender a caminhar, a correr, a escalar e a dançar. Não se aprende a voar voando”

(Nietzsche)

RESUMO

As principais espécies em evidência na aquicultura brasileira, principalmente no estado do Ceará, são a *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) e o *Litopenaeus vannamei* (camarão branco do Pacífico). O desenvolvimento de marcadores de microssatélites tem proporcionado um grande avanço no monitoramento genético destes animais. Por isso, quatro marcadores de microssatélites foram aplicados na caracterização genética de cinco planteis de tilápia do Nilo pertencentes a cinco municípios do estado do Ceará, apresentando um quadro de redução de heterozigosidade média esperada ($H_e=0,733$) em relação a heterozigosidade média observada ($H_o=0,575$) e o índice de endogamia (F_{IS}) significativos com uma moderada diferenciação genética ($F_{ST}=0,059$) em todos os planteis. O loco *UNH231* foi o único que apresentou um padrão consistente de desequilíbrio de Hardy-Weinberg na maioria dos planteis. Este conjunto de fatores levaram a uma estruturação em três grupos, **Grupo 1**: Fortaleza e Itaitinga e **Grupo 2**: Amanari, Horizonte e Russas, confirmando o histórico dos planteis. A utilização do loco *UNH104* como indicador do sexo masculino para a tilápia do Nilo apresentou o alelo 132 em sua maioria no total de alelos, principalmente em estado de homozigose (132/132). No entanto, não houve diferença significativa ($P=0,675$) na identificação sexual nos demais genótipos. Quinze marcadores de microssatélites foram testados em famílias de *Litopenaeus vannamei* para a construção de um painel de marcadores em sistema multiplex. Dentre estes, nove *locus* apresentaram amplificações consistentes em multiplex e sem formação de dímeros. No processo de avaliação dos marcadores, a maioria dos alelos identificados no sistema de PCR multiplex apresentaram segregação mendeliana. No entanto, em relação a análise de migração alélica dos *locus* em geral, todos os marcadores utilizados apresentaram distorções na distribuição de genótipos em relação a proporção mendeliana esperada. Isso mostra a necessidade de compreensão detalhada do modelo de evolução molecular de locos utilizados na descrição de variabilidade genética em populações e *L. vannamei*.

Palavras-chave: Aquicultura. *Oreochromis niloticus*. *Litopenaeus vannamei*. Microssatélites. Multiplex. Segregação alélica.

ABSTRACT

The main species in evidence in Brazilian aquaculture, mainly in the state of Ceara, are *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) and *Litopenaeus vannamei* (white shrimp Pacific). The development of microsatellite markers has provided a major advance in genetic monitoring of these animals. So, four microsatellite markers were applied in genetic characterization of five flocks of Nile tilapia from five municipalities in the state of Ceara, with a mean expected heterozygosity reduction framework ($H_e=0.733$) compared to average observed heterozygosity ($H_o = 0.575$) and the rate of inbreeding (F_{IS}) with a moderate significant genetic differentiation ($F_{ST} = 0.059$) in all flocks. The marker *UNH231* was the only one with a consistent pattern of Hardy-Weinberg disequilibrium in most flocks. These factors led to a structuring into three groups, Group 1: Fortaleza and Itaitinga and Group 2: Amanari, Horizonte and Russas, confirming the history of flocks. The use of the site UNH104 as male indicator for Nile tilapia presented the allele 132 mostly total alleles, particularly in a state of homozygosity (132/132). However, there was no significant difference ($P=0.675$) in sexual identification in other genotypes. Fifteen microsatellite markers were tested on families of *Litopenaeus vannamei* for the construction of a panel of markers in the multiplex system. Among these nine locus multiplex amplifications exhibited consistent and no dimer formation. In the process of evaluation of markers, most of the alleles identified in the multiplex PCR system showed Mendelian segregation. However, for migration analysis of allelic loci in general, all markers were used distortions in the distribution of genotypes in relation to the expected Mendelian ratio. This shows the need for comprehensive understanding of the loci molecular evolution model used in genetic variability description of populations and *L. vannamei*.

Keywords: Aquaculture. *Oreochromis niloticus*. *Litopenaeus vannamei*. Microsatellites. Multiplex. Allelic segregation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

- Figura 1 – Esquematização da papila urogenital de tilápia fêmea (a esquerda) e macho (a direita) 26
- Figura 2 – Dendograma obtido pela matriz de distância genética a partir dos dados gerados pelas avaliações genéticas baseada em distância de Nei (1978). Amanarí, (Aman); Fortaleza (Fort); Horizonte, (Hori); Itaitinga, (Ita); Russas, (Russ)..... 34
- Figura 3 – Frequência alélica do marcador UNH104 para macho e para fêmea de tilápia do Nilo com os respectivos erros padrões..... 35
- Figura 4 – Frequência genotípica com os do marcador UNH104 para macho e para fêmea de tilápia do Nilo..... 35

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1 – Marcadores de microssatélites para *Oreochromis niloticus* (Lee; Kocher, 1996). Número de acesso ao Genbank, sequências dos primers (5'-3'), amplicons em pares de bases (pb), repetição do microssatélite, marcação fluorescente e Temperatura de anelamento (Ta) em °C..... 27
- Tabela 2 – Variabilidade genética de cinco planteis de Tilápia do Nilo através de quatro loci de microssatélites..... 29
- Tabela 3 – Tabela de frequência alélica para cada loco de tilápia do Nilo..... 31
- Tabela 4 – Matriz de diferenciação genética (F_{st}) par a par entre os planteis de tilápia Nilótica..... 33
- Tabela 5 – Índice de Identidade genética (Ig) (acima da diagonal) e distância genética (Da) (abaixo da diagonal) 34

Capítulo 2

- Tabela 1 – Marcadores testados para o desenvolvimento de painéis multiplex para *Litopenaeus vannamei*..... 50
- Tabela 2 – Conjunto de painéis multiplex com concentração de *primers* para cada marcador e marcação fluorescente..... 54
- Tabela 3 – Frequência genotípica entre oito famílias de *Litopenaeus vannamei* de irmãos completos e valores de X^2 para proporções de segregação mendeliana esperada..... 55

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
REFERÊNCIAS	17
HIPÓTESE	22
OBJETIVO GERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
CAPÍTULO 1	23
1 INTRODUÇÃO	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
<i>2.1 Histórico dos planteis estudados para caracterização genética de planteis de tilápia do Nilo</i>	24
<i>2.2 Caracterização genética de planteis de tilápia do Nilo</i>	25
<i>2.3 Identificação de alelos associados ao sexo da tilápia do Nilo</i>	27
3 RESULTADOS	27
<i>3.1 Caracterização genética de planteis de tilápia do Nilo</i>	27
<i>3.2 Identificação alélica do marcador UNH104 associada ao sexo da tilápia do Nilo</i>	29
4 DISCUSSÃO	36
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 2	45
1 INTRODUÇÃO	45
2 MATERIAL E MÉTODOS	47
<i>2.1 Obtenção das amostras e extração de DNA</i>	47
<i>2.2 Desenvolvimento do sistema de PCR multiplex</i>	48
<i>2.3 Validação dos conjuntos de PCR multiplex</i>	49
3 RESULTADOS	52
<i>3.1 Desenvolvimento do sistema de PCR multiplex</i>	52
<i>3.2 Validação dos conjuntos de PCR multiplex</i>	52

4 DISCUSSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	63
CONCLUSÕES GERAIS.....	67

APRESENTAÇÃO

O cultivo de organismos aquáticos através da atividade aquícola vem ultrapassando o crescimento populacional e continua sendo um dos setores que mais crescem na produção de alimentos (FAO, 2014). A quantidade de produtos consumidos oriundos da aquicultura é maior do que o volume produzido pela pesca convencional, atingindo quase a metade do total de peixes e mariscos para fins alimentares (GJEDREM *et al.*, 2012).

A aquicultura de água doce contribuiu de forma definitiva na produção mundial em 2010, contribuindo com 36,9 milhões de toneladas, sendo 91,7% desta produção dominada pela produção de peixes de água doce (FAO, 2012). Os ciclídeos, como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), são o tipo de animal mais utilizado na aquicultura mundial, sendo registrado em mais de 135 países (FAO, 2012; MPA, 2012). No Brasil, as linhagens de tilápias que mais se desenvolveram no país foram Bouaké, GIFT, Supreme e Chitralada. A primeira a ser cultivada foi a Bouaké, oriunda de Bouaké (Costa do Marfim, África), sendo introduzida em Pentecostes no Ceará (CASTAGNOLLI, 1992) através do convênio do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) e do *Centre Technique Forétier Tropical* (CTFT). Com o tempo, esses animais adquiridos começaram a apresentar problemas como baixo desempenho e anomalias genéticas (MASSAGO *et al.*, 2010). Com isso, veio a linhagem Chitralada em 1996, sendo procedentes da Tailândia, para Londrina, Paraná. Essa tilápia foi domesticada desde a década de 40, inicialmente no Japão e depois na Tailândia (ZIMMERMANN, 1999), seu cultivo foi melhorado com a técnica de incubação, resolvendo os problemas de baixa eficiência da técnica de reversão sexual tradicional, destacando elevada produção na região Nordeste do Brasil. O programa GenoMar Supreme Tilapia, pertencente a empresa GenoMar em Oslo, Noruega (CYRINO *et al.*, 2004), forneceu para Maringá, Paraná (PR) a linhagem *Supreme* em 2005. A linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*) proveniente da Malásia foi desenvolvida inicialmente pelo *International Center for Living Aquatic Resources Management* (ICLARM), atualmente conhecida como *Worldfish Center* a que deu continuidade ao desenvolvimento da linhagem a partir do cruzamento de oito linhagens, sendo quatro delas africanas selvagens e quatro linhagens domesticadas na Ásia (MASSAGO *et al.*, 2010).

No entanto, do ponto de vista de recursos naturais disponíveis, espera-se que a futura expansão aquícola virá da aquicultura marinha, tanto para locais em alto mar, como também em áreas costeiras. Esta atividade alcançou 37,08% da produção mundial de cultivo

em 2012 (FAO, 2014; GJEDREM *et al.*, 2012), sendo representado por duas espécies em destaque no cultivo de camarões peneídeos, o *Litopenaeus vannamei* no Ocidente e o *Penaeus monodon* no oriente. Grande parte da produtividade de crustáceos (29,4% em 2010) é representada pela espécie marinha *Litopenaeus vannamei*, o camarão branco do Pacífico (FAO, 2012). No Brasil, apesar dos intensos esforços para o desenvolvimento da cadeia produtiva do *Penaeus japonicus* entre as décadas de 70 e 80, esta atividade não obteve sucesso devido à ausência de um planejamento mais abrangente e a coincidência com um período de estiagens mais prolongadas do Nordeste (SCHWAB; WEBER; LEHMANN, 2002, MOLES; BUNGE, 2002 *apud* NATORI *et al.*, 2011). No entanto, estes problemas serviram como lições e aproveitamento das fazendas e laboratórios de camarão já instalados. Houveram tentativas no cultivo de espécies nativas (*L. subtilis*, *Farfantepenaeus paulensis* e *L. schimitti*), mas estas não alcançaram um desempenho produtivo suficiente para cobrir os custos de produção. A decisão de importar pós larvas de *L. vannamei* veio na década de 80, diante do êxito de produção mostrado pelo Equador e Panamá e a capacidade desta espécie de adaptação a ecossistemas diferentes do ocidente (COSTA, 2004; SEBRAE & ESPM, 2008). Ao longo do tempo, mesmo com a grande aceitação do mercado internacional ao camarão marinho cultivado no Brasil, esta atividade passou por algumas intempéries, atualmente já superadas, como a ação antidumping dos EUA, valorização da moeda nacional e ao surto patológico de mancha branca em Santa Catarina (SUSSEL *et al.*, 2010).

No Nordeste brasileiro, a tilápia, *Oreochromis niloticus*, e o camarão marinho *Litopenaeus vannamei* são as principais espécies de incentivo aquícola (MPA, 2012). Segundo o SEBRAE em 2009, a tilápia nilótica apresentou uma produção média de 23 mil toneladas no estado do Ceará, revelando ser uma espécie de grande destaque no estado e em nível nacional (KUBITZA *et al.*, 2012). Em relação ao cultivo do camarão branco do Pacífico, esta espécie proporcionou uma série de benefícios econômicos e sociais, através de divisas de exportações e a criação de empregos diretos e indiretos para o estado desde a sua implantação (NUNES *et al.*, 2005), atingindo uma produção nacional de 35 mil toneladas em 2012 (MPA, 2012).

O desenvolvimento e a sustentabilidade da aquicultura de espécies exóticas, como o camarão branco do Pacífico e a tilápia do Nilo, traz desafios adicionais ao setor aquícola. Dentre estes está a manutenção da diversidade e o melhoramento genético das linhagens nacionais. O método intensivo de cultivo adotado para as populações aquícolas propicia o acasalamento precoce entre parentes, ou seja, dentro de um mesmo plantel, um macho atinge a maturidade sexual cada vez mais jovem e pode fertilizar um número de fêmeas de várias

gerações (FALCONER; MACKAY, 1996; BEARDMORE; MAIR; LEWIS, 2001), resultando em uma possível redução do tamanho da prole, acarretando um mesmo macho acasalar com seus próprios descendentes. Este procedimento contribui fortemente para o esgotamento da diversidade, levando ao aumento da taxa de endogamia dentro dos plantéis e a perda da qualidade dos reprodutores (HALLERMAN, 2003). Contudo, para que haja uma redução da reprodução precoce na prole a melhor maneira é a obtenção de populações de um único sexo, especialmente o sexo masculino, por apresentar uma maior média de taxa de crescimento, como também, a redução do risco de impacto ambiental diante dos escapes de espécies exóticas (BEARDMORE; MAIR; LEWIS, 2001).

Com a inserção de marcadores moleculares de DNA na aquicultura, este desenvolvimento tem proporcionado um grande avanço no monitoramento da variabilidade genética, da endogamia, da identificação de espécies, do sexo, linhagens e de relações de parentesco, como também, na construção e um maior adensamento de mapas de ligação para espécies cultivadas (ALMEIDA *et al.*, 2013; LIU; CORDES, 2004). Os marcadores do tipo microssatélites ou *simple sequence repeats* (SSRs) foram relatados em organismos eucarióticos desde 1970 (BRUFORD *et al.*, 1996) e têm sido uma ferramenta eficiente na avaliação da variabilidade genética, seleção de famílias, em estratégias de melhoramento genético e determinação do sexo para o camarão *Litopenaeus vannamei* (ALCIVAR-WARREN *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2007; MAGGIONI *et al.*, 2013) e para a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (TRONG *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2014). Este último fator tem proporcionado identificações destes marcadores associados a genes em regiões de determinação sexual, auxiliando antecipadamente a indicação do sexo, já que existem vários fatores, inclusive a temperatura, que podem interferir na definição do sexo do animal (BAROILLER *et al.*, 2009; PALAIOKOSTAS *et al.*, 2013). Além disso, para proporcionar um melhor desempenho e um menor custo no processo de genotipagem de organismos aquáticos por meio de microssatélites, muitos estudos adotaram técnicas como painéis multiplex e adição de caudas fluorescentes (SCHUELKE, 2000; DIXON *et al.*, 2008; DINIZ *et al.*, 2005; DONG *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; HAMOY *et al.*, 2008; HAMOY; SANTOS, 2012).

Considerando estes aspectos, o trabalho desenvolvido ficou dividido em dois capítulos. O capítulo 1 aborda a caracterização genética e identificação de alelos associados ao sexo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através de marcadores moleculares microssatélites, e o capítulo 2 aborda a marcação de fragmentos de PCR com sondas

fluorescentes no desenvolvimento de painéis multiplex para análise parental do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

REFERÊNCIAS

- ALCIVAR-WARREN, A. *et al.* Shrimppmap : a Low-Density, Microsatellite-Based Linkage Map of the Pacific Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus Vannamei*: Identification of Sex-Linked Markers in Linkage Group 4. **Journal of Shellfish Research**, v. 26, n. 4, p. 1259–1277, dez. 2007.
- ALMEIDA, I. G. *et al.* Bulked segregant analysis of the pirarucu (*Arapaima gigas*) genome for identification of sex-specific molecular markers. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 12, n. 4, p. 6299–308, jan. 2013.
- AN, H. S. *et al.* Genetic diversity of wild and farmed black sea bream populations in Jeju. **Animal Cells and Systems**, v. 14, n. 1, p. 37–44, mar. 2010.
- AN, H. S. *et al.* Genetic characterization of five hatchery populations of the Pacific Abalone (*Haliotis discus hannai*) using microsatellite markers. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 8, p. 4836–49, jan. 2011.
- BAROILLER, J. F. *et al.* Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 153, n. 1, p. 30–8, maio 2009.
- BEARDMORE, J.; MAIR, G.; LEWIS, R. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 283–301, jun. 2001.
- BENZIE, J. A H. Population genetic structure in penaeid prawns. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 1, p. 95–119, jan. 2000.
- BRUFORD, M.W., CHEESMAN, D.J., COOTE, T., GREEN, H.A.A., HAINES, S. A., ORYAN, C. Microsatellites and their application to conservation genetics. In: Smith, T.B., Wayne, R.K. (Eds.), *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. **Oxford University Press**, Oxford, p. 278–297, 1996.
- CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. São Paulo: FUNEP, 1992.
- CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 1–29, maio 2006.
- CRUZ, P. *et al.* Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 6, n. 2, p. 157–64, 2004.
- CYRINO, J. E. P. *et al.* **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004.

- DINIZ, F. M. *et al.* Microsatellites in the overexploited spiny lobster, *Panulirus argus*: Isolation, characterization of loci and potential for intraspecific variability studies. **Conservation Genetics**, v. 6, n. 4, p. 637–641, 22 out. 2005.
- DINIZ, F. M. *et al.* Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. v. 384, p. 380–384, 2007.
- DIXON, T. J. *et al.* Shifts in genetic diversity during domestication of Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, monitored using two multiplexed microsatellite systems. **Aquaculture**, v. 283, n. 1-4, p. 1–6, out. 2008.
- DONG, S. *et al.* Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 283–288, ago. 2006.
- ESHEL, O. *et al.* Linkage and Physical Mapping of Sex Region on LG23 of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 2, n. 1, p. 35–42, jan. 2012.
- FREITAS, P. D.; JESUS, C. M.; GALETTI JR., P. M. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.324–326, 2007.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 1996. Essex Longman Group Ltd.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, p.230, 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. FAO, p.243, 2014.
- FESSEHAYE, Y. *et al.* Effects of relatedness and inbreeding on reproductive success of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.294, n.3-4, p.180-186, 2009.
- GJEDREM, T.; ROBINSON, N.; RYE, M. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. **Aquaculture**, v. 350-353, p. 117–129, jun. 2012.
- HALLERMAN, E. M.; FUERST, P. Population genetics: Principles and practices for fisheries scientists. **American Fisheries Society**, p.458, (ed.) 2003.
- HAMOY, I. G.; SANTOS, E. J. M.; SANTOS, S. E. B. Rapid and inexpensive analysis of genetic variability in *Arapaima gigas* by PCR multiplex panel of eight microsatellites. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 7, n. 1, p. 29–32, jan. 2008.
- HAMOY, I. G.; SANTOS, S. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the tambaqui, *Colossoma macropomum*, developed as a tool for use in conservation and broodstock management. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 1, p. 141–6, jan. 2012.

- HASSANIEN, H. A.; GILBEY, J. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 14, p. 1450–1457, out. 2005.
- HAUSWALDT, J. S.; GLENN, T. C. Microsatellite DNA loci from the Diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 2, p. 174–176, jun. 2003.
- KUBITZA, F., CAMPOS, J. L., ONO, E. A., ISTCHUK, P. I. **Panorama da Piscicultura no Brasil**, v.22, n.132, 2012.
- LEE, B.-Y. et al. Genetic and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 3, p. 557–62, jun. 2011.
- LEE, B.-Y.; HULATA, G.; KOCHER, T. D. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). **Heredity**, v. 92, n. 6, p. 543–9, jun. 2004.
- LEE, B.-Y.; PENMAN, D. J.; KOCHER, T. D. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. **Animal Genetics**, v. 34, n. 5, p. 379–383, out. 2003.
- LI, Y. *et al.* Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. **Aquaculture**, v. 266, n. 1-4, p. 279–288, jun. 2007.
- LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, n. 1-4, p. 1–37, set. 2004.
- LUVESUTO, E.; MANOEL, P.; JUNIOR, G. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. v. 1160, p. 1156–1160, 2007.
- MASSAGO, H. *et al.* Crescimento de quatro linhagens de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias Ambientais**, v.8, n.4, p.397-403, 2010.
- MAGGIONI, R. *et al.* Genetic variability of marine shrimp in the Brazilian industry. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 968–974, ago. 2013.
- MCKINNA, E. M. et al. An investigation of the possible causes for the loss of productivity in genetically improved farmed tilapia strain in Fiji: inbreeding versus wild stock introgression. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. e730–e742, 4 out. 2010.
- MEEHAN, D. et al. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea:Decapoda]. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 5, n. 4, p. 311–30, 2003.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, 2010. Brasília, 2012.

MOLES, P.; BUNGE, J. Shrimp farming in Brazil: an industry overview. Roma: FAO/WWF/NACA, 2002, p.26.

MONTALDO, H. H. et al. Evaluation of genetic variability loss in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 4, 15 jul. 2013.

MOREIRA, A. A. et al. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. n. 1, p. 521–526, 2007.

NATORI, M. M. Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas**, v.41, n.2, 2011.

PALAIOKOSTAS, C. et al. Mapping and validation of the major sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Using RAD sequencing. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68389, jan. 2013.

PÉREZ, F. et al. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus biridy*. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 7, n. 5, p. 554–69, 2005.

RUTTEN, M. J. M. et al. Genetic characterization of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using microsatellite markers. **Animal genetics**, v. 35, n. 2, p. 93–7, abr. 2004.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments A poor man ' s approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics . v. 18, n. February, p. 1–2, 2000.

SCHWAB, B.; WEBER, M.; LEHMANN, B. Key management challenges for the development and growth of a shrimp farm in northeast Brazil; a case study of CamanorProdutos Marinhos Ltda. Roma: NACA/WWF/FAO, 2002, p.33

SEBRAE & Escola superior de propaganda e Marketing - ESPM. Relatório completo. Aquicultura e pesca: camarões. 2008. Disponível em: <[http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/47ACFD29DAFB1D2D832574DC00461D54/\\$File/NT0003906A.pdf](http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/47ACFD29DAFB1D2D832574DC00461D54/$File/NT0003906A.pdf)> Acesso em 23/01/2015.

SIMBINE, L.; VIANA DA SILVA, J.; HILSDORF, A. W. S. The genetic diversity of wild *Oreochromis mossambicus* populations from the Mozambique Southern watersheds as evaluated by microsatellites. **Journal of Applied Ichthyology**, v.30, n.2, p.272-280, 2014.

SINT, D.; RASO, L.; TRAUOGOTT, M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. **Methods in ecology and evolution / British Ecological Society**, v.3, n.5, p. 898-905, 2012.

SUN, Y.-L. et al. Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 433, p. 19–27, set. 2014.

SUSSEL, F. R.; VIEGAS, E. M. M.; PARISI, G. **Acquacultura in Brasile**. Revista II Pesce. n.2, p.49-55, 2010.

TRONG, T. Q. et al. A comparison of microsatellites and SNPs in parental assignment in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): The power of exclusion. **Aquaculture**, v. 388-391, p. 14–23, abr. 2013.

ZIMMERMANN, S. Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. Panorama da Aquicultura, v.9, n.5, p.15-21, 1999.

VALLES-JIMENEZ, R.; CRUZ, P.; PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 6, n. 5, p. 475–84, 2005.

WANG, H.; LI, F.; XIANG, J. Polymorphic EST–SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, v. 249, n. 1-4, p. 107–114, set. 2005.

WANG, X. et al. Identification of two novel female-specific DNA sequences in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. **Aquaculture**, v. 388-391, p. 49–53, abr. 2013.

WOLFUS, G. M.; GARCIA, D. K.; ALCIVAR-WARREN, A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. **Aquaculture**, v. 152, n. 1-4, p. 35–47, jun. 1997.

HIPÓTESE

Os marcadores do tipo microssatélites são capazes de mapear o histórico de formação de planteis em nível de variabilidade genética e identificar o sexo através dos genótipos, assim como associar famílias cultivadas aos seus respectivos genitores.

OBJETIVO GERAL

Aplicação de marcadores do tipo microssatélites para o monitoramento da variabilidade genética, identificação sexual e atribuição parental em organismos cultivados aquáticos, junto às técnicas de incorporação de cauda fluorescente e sistema multiplex.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo 1

- Caracterizar o nível de variabilidade genética dos principais planteis de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do estado do Ceará.
- Identificar o fenótipo sexual da tilápia do Nilo através dos genótipos gerados pelo marcador *UNH104*.

Capítulo 2

- Incorporar a cauda M13(-21) em todos os *primers* selecionados para o *Litopenaeus vannamei* e otimizar a temperatura de anelamento.
- Formar conjuntos de marcadores de microssatélites em um sistema de PCR multiplex.
- Avaliar os marcadores estudados através da análise de segregação alélica em famílias cultivadas de *Litopenaeus vannamei*.

Capítulo 1- Caracterização genética e identificação de alelos associados ao sexo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através de marcadores moleculares microssatélites

1. INTRODUÇÃO

As tilápias têm se tornado um dos peixes mais cultivados no mundo, alcançando uma produção acima de três milhões de toneladas em 2011 (FAO, 2012 e 2014). Na região Nordeste do Brasil, sobretudo no estado do Ceará, a produção de tilápia tem se mostrado representativa em nível nacional, com uma produção média de 23 mil toneladas em 2009 (SEBRAE & ESPM, 2008; KUBITZA *et al.*, 2012).

A avaliação da estrutura genética de estoques cultivados se torna imprescindível para o manejo efetivo e a manutenção da diversidade do plantel, pois baixos índices de variabilidade genética podem levar à redução da produção (MCKINNA *et al.*, 2010; PETERSEN *et al.*, 2012). A perda de variabilidade genética dentro dos estoques cultivados tem sido relatada em muitas espécies, como no camarão tigre gigante, *Penaeus japonicus*, (SBORDONI *et al.*, 1986), carpa, *Cyprinus carpio*, (DESVIGNES *et al.*, 2001), salmão do Atlântico, *Salmo salar*, (KOLJONEN *et al.*, 2002), tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, (RUTTEN *et al.*, 2004), curimatã, *Prochilodus lineatus*, (BARRERO *et al.*, 2008), isto revela a importância do manejo estratégico de reprodutores para que se reduza o nível de parentesco nos cruzamentos, a seleção individual e a diminuição do número efetivo dos reprodutores (FALCONER; MACKAY, 1996).

Através dos marcadores moleculares, o monitoramento genético dos estoques cultivados pode auxiliar no manejo genético, minimizando a endogamia e aumentando a variabilidade genética (SEKINO *et al.*, 2002; WASKO *et al.*, 2004; LIU; CORDES, 2004). Dentre estes, os marcadores microssatélites são amplamente aplicados no campo da aquicultura. Isto porque são úteis na construção de mapas de ligação, mapeamento de características quantitativas (QTL), seleção assistida e, principalmente, na caracterização do material genético e seleção de reprodutores (CHISTIYAKOV *et al.*, 2006). Neste último caso, o manejo de reprodutores tem sido alvo de muitos estudos para a determinação do sexo em *Oreochromis niloticus* (AN *et al.*, 2011; ESHEL *et al.*, 2012; PALAIOKOSTAS *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2014). Nos cultivos de tilápias é dada preferência à produção de machos, devido ao crescimento rápido, serem maiores que as fêmeas e representarem uma efetiva solução para a maturação sexual precoce e reproduções não controladas dentro dos cultivos (MAIR *et al.*, 1997).

Os processos de obtenção de machos em tilapicultura incluem sexagem manual (POPMA *et al.*, 1984), reversão sexual hormonal (HOPKINS *et al.*, 1979; ROSENSTEIN; HULATA, 1994; MAIR *et al.*, 1995, 1997; BEARDMORE *et al.*, 2001), hibridização (HICKLING, 1960; HULATA *et al.*, 1983) ou produção de supermacho (MAIR *et al.*, 1997). Porém, todas estas técnicas apresentaram muitas desvantagens e nenhuma é amplamente utilizada.

A técnica de seleção sexual através de seleção assistida por marcadores (MAS) parece ser efetiva para identificação e controle do sexo (LIU; CORDES, 2004; GUI; ZHU, 2012; LIU *et al.*, 2013). Por exemplo, o loco *UNH104* (GenBank nº acesso G12257) foi mapeado em uma região muito próxima de determinação sexual ligada ao haplótipo Y no cromossomo da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) e da tilápia azul (*Oreochromis aureus*), identificando o sexo masculino através de segregação alélica (LEE *et al.* 2003; 2004).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar cinco planteis de tilápia do Nilo cultivadas no estado do Ceará e analisar a associação de genótipos com o sexo do macho através de marcadores moleculares do tipo microssatélites.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Histórico dos planteis de tilápia do Nilo caracterizados geneticamente*

Juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) da linhagem chitralada provenientes de cinco planteis dos municípios de Fortaleza (n=30), Amanarí (n=28), Horizonte (n=30), Itaitinga (n=30) e Russas (n=29) localizados no estado do Ceará (CE), apresentaram o seguinte histórico de origem: o plantel de **Fortaleza** correspondente a Estação de Piscicultura Professor Raimundo Saraiva da Costa da Universidade Federal do Ceará/DEP/CCA/UFC e a larvicultura comercial de **Itaitinga** foram originados pelos estoques de tilápias provenientes do Centro de Pesquisa em Aquicultura (CPAq) do Departamento Nacional de Obras contra a Seca (DNOCS) localizado no município de Pentecoste, a 85 quilômetros de Fortaleza. A larvicultura localizada em **Russas** formou seu plantel com a aquisição de linhagens melhoradas geneticamente e com reprodutores já estabelecidos no Ceará. A larvicultura de **Horizonte** adquiriu reprodutores provenientes da Estação de Piscicultura Valdemar Carneiro de França, pertencente ao DNCOS, localizado no distrito de **Amanarí**, na cidade de Maranguape, a 50 quilômetros de Fortaleza. A amostragem consistiu, portanto, de dois planteis pertencentes a estações de piscicultura (Fortaleza e Amanarí) e três planteis originárias de larviculturas comerciais.

2.2. Caracterização genética de planteis de tilápia do Nilo

Amostras de nadadeira caudal foram coletadas dos respectivos planteis e preservadas em etanol a 95%. A extração de DNA seguiu o protocolo padrão PCI-Proteinase K (SAMBROOK *et al.* 1989).

Quatro marcadores de microssatélites foram selecionados para genotipagem de acordo com suas características polimórficas e reprodutibilidade através do banco de acesso Genbank. As sequências diretas de cada par de primer foram marcadas com fluoróforos para os locos *UNH104* (G12257), *UNH108* (G12261), *UNH222* (G12373) e *UNH231* (G12382) (Tabela 1). As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em um volume final de 10 μ L, contendo: 1x PCR Buffer (10mM, Tris-HCL pH 8,3), 1,8mM de MgCl₂, 0,5pmol/ μ L de cada *primer*, 0,2mM de cada dNTPs, 1U *Taq* DNA polimerase (Promega) e 100ng de DNA. As condições de ciclagem da PCR foram: desnaturação a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94° por 30 segundos, temperatura de anelamento (Ta): *UNH104* (52°C), *UNH108* (52°C), *UNH222* (54°C) e *UNH231* (54°C) por 45 segundos e extensão de 72°C por 60 segundos, e um passo final de extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese capilar em um sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems, CA, USA.) com o marcador de peso molecular GS-350 ROX. A análise genotípica foi realizada através do GeneMapper Version 4.0 (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA).

Os valores estimados para heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), índices de F de Wright (COCKERHAM & WEIR, 1993) e as análises de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram obtidos através da plataforma online GENEPOP, versão 3.1 (RAYMOND E ROUSSET, 1995). Para os testes múltiplos foi utilizada a correção de Bonferroni (Rice, 1989). A presença de alelos nulos foi verificada através do software Micro-checker versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2005) para a conformidade de frequência alélica. Número de alelos (N_a), alelos efetivos (A_e), matriz de F_{st} e identidade (I_g) e distância genética (D_a) e o índice de diversidade gênica geral (D_{st}) foram analisados pelo programa FSTAT (GOUDET, 2002).

O número de alelos privados (A_p) foi obtido através do software GENALEX6 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). A análise de variância molecular (AMOVA) foi calculada com o programa Arlequin 2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000) baseado em 1000 permutações.

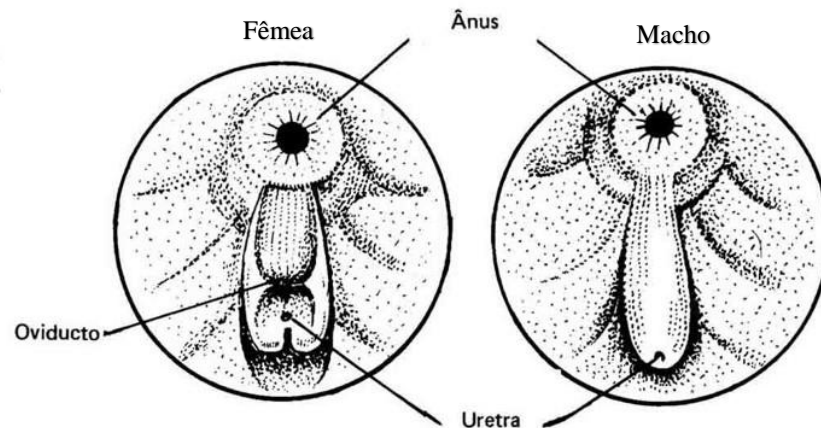
A árvore UPGMA foi gerada através do DendroUPGMA (GARCIA-VALLVE *et al.* 1999) e visualizada pelo software TreeViewX (Page, 1996).

2.3. Identificação de alelos associados ao sexo da tilápia do Nilo

Baseado em evidências apresentadas por Lee *et al.*, 2003, o loco *UNH104* (G12257) (LEE; KOCHER, 1996) foi avaliado para a ligação ao sexo em uma população cultivada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Amostras da nadadeira caudal foram coletadas de 100 reprodutores (50 machos e 50 fêmeas), em uma larvicultura comercial localizada no município de Jaguaribara-CE. O processo de sexagem foi realizado observando a papila genital, apresentando esta região um aspecto alongado nos machos e arredondado nas fêmeas (POPMA *et al.*, 1984) (Figura 1). A extração de DNA seguiu o protocolo padrão PCI-Proteinase K (SAMBROOK *et al.*, 1989).

As condições de amplificação, termociclagem e genotipagem obedeceram as mesmas metodologias adotadas para o estudo de caracterização genética de planteis cultivados de tilápia do Nilo. O teste G (“goodness of fit”) foi utilizado para a verificação de associação de genótipos ao sexo, já que é uma prova estatística não paramétrica de aderência empregada em duas ou mais categorias exclusivamente mútuas.

Figura 1 – Esquemática da papila urogenital do sexo feminino e masculino da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)



(Hussain, 2004)

Tabela 1 – Marcadores de microssatélites para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (LEE; KOCHER, 1996). Número de acesso ao Genbank, sequências dos primers (5'-3'), amplicons em pares de bases (pb), repetição do microssatélite, marcação fluorescente e Temperatura de anelamento (Ta) em °C.

<i>Loco (Nº de acesso)</i>	<i>Sequências (5'-3')</i>	<i>pb</i>	<i>Repetição</i>	<i>Marcação</i>	<i>Ta</i>
<i>UNH104 (G12257)</i>	F: GCAGTTATTTGTGGTCACTA R:GGTATATGTCTAACTGAAATCC	130-160	(AC) ₁₅	HEX	52
<i>UNH108 (G12261)</i>	F: GGGATCAGCTGTTAAGTTT R: TGAGTTGATTATTAATTTCTGA	130-148	(AC) ₁₇	6-FAM	52
<i>UNH222 (G12373)</i>	F: CTCTAGCACACGTGCAT R: TAACAGGTGGGAACTCA	162-199	(CA) ₁₇	6-FAM	54
<i>UNH231 (G12382)</i>	F: GCCTATTAGTCAAAGCGT R: ATTTCTGCAAAAGTTTTCC	170-183	(CA) ₁₇	HEX	54

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização genética de planteis de tilápia do Nilo

Os marcadores de microssatélites *UNH104* (G12257), *UNH108* (G12261), *UNH222* (G12373) e *UNH231* (G12382) se mostraram polimórficos com um total de 58 alelos diferentes.

Os níveis de variabilidade alélica entre os planteis alternaram entre 11 alelos para *UNH222* e quatro alelos para *UNH231* (Tabela 2). O número de alelos efetivos (Ae) variou entre 4,83 para Fortaleza e 3,12 para Russas (Tabela 2), junto a 26 alelos privados, sendo a maioria para Fortaleza (10) e Itaitinga (11) (Tabela 3). Esta quantidade pode ter influenciado no valor do índice de diversidade genética geral (D_{st}) de 0,039.

A presença de alelos nulos foi constatada, no plantel de Fortaleza para os loci *UNH104* (0,149), *UNH108* (0,155), *UNH231* (0,164); no plantel de Itaitinga para os loci *UNH104* (0,241) e *UNH231* (0,210); no plantel de Horizonte para o loco *UNH231* (0,321); no

plantel de Russas para os loci *UNH104* (0,231) e *UNH231* (0,160) e nenhum alelo nulo foi encontrado para o plantel de Amanarí.

Os planteis que apresentaram loci em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para $P < 0,05$ foram: Itaitinga com *UNH222* ($P = 0,163$); Amanarí com *UNH104* ($P = 0,450$), *UNH108* ($P = 0,094$), *UNH222* ($P = 0,346$); Horizonte com *UNH104* ($P = 0,288$), *UNH108* ($P = 0,392$), *UNH222* ($P = 0,311$) e Russas com *UNH108* ($P = 0,236$), *UNH222* ($P = 0,096$). O loco *UNH231* foi o único que apresentou um padrão consistente de desequilíbrio de Hardy-Weinberg na maioria dos planteis (Tabela 2).

Houve uma redução da heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,733$) em relação a heterozigosidade média observada ($H_o = 0,575$), evidenciado no déficit de heterozigotos pelos valores de D que mostraram-se negativos (Tabela 2).

Os valores médios de redução de genótipos de heterozigotos (F_{IS}) encontrados foram 0,272 para Itaitinga, 0,302 para Fortaleza, 0,104 para Amanarí, 0,184 para Horizonte e 0,296 para Russas (Tabela 2).

O resultado para F_{ST} total foi de 0,059 (Tabela 2), indicando uma moderada diferenciação genética e a principal parte atuante dessa diferença ocorre a nível intrapopulacional. Esta evidência pode ser explicada pelo teste de variância molecular (AMOVA), onde a variação entre os planteis foi de 0,09 e a variação dentro dos planteis foi de 0,91. A matriz de F_{ST} gerada revelou uma maior diferenciação (0,110) entre os planteis de Itaitinga e Russas (Tabela 4).

Os planteis de Horizonte e Amanarí tiveram os maiores índices de identidade genética (0,9340). Por outro lado, Itaitinga e Amanarí tiveram os maiores índices de distância genética (0,5041) (Tabela 5). Estas relações são sumarizadas no dendograma obtido que exibiu uma estruturação dos planteis em dois grupos, **Grupo 1**: Fortaleza (Fort) e Itaitinga (Itai), **Grupo 2**: Amanarí (Aman), Horizonte (Hori) e Russas (Russ) (Figura 2). Esta distribuição parece corresponder perfeitamente com o histórico conhecido dos plantéis.

3.2. Identificação alélica do marcador UNH104 associada ao sexo da tilápia do Nilo

Os oito alelos identificados no loco *UNH104* apresentaram de maneira geral proporções semelhantes entre macho e fêmeas (figura 3). No entanto, o alelo 132 esteve presente em 18 machos e em 10 fêmeas, revelando uma notável diferença de frequência entre os sexos. Ao comparar as frequências genotípicas entre os sexos, os genótipos correspondentes ao alelo 132 mostraram ser associados ao sexo masculino na maioria das vezes, principalmente no estado de homozigose (132/132), presente em seis machos e em nenhuma fêmea (Figura 4). Porém, as associações estatísticas realizadas pelo teste G para a frequência de genótipos associados ao sexo, mostraram que não houve diferença significativa ($P=0,675$) na diferenciação genotípica entre o sexo do macho e da fêmea para o nível de significância de 5%. Esta evidência pode estar atrelada a grande diversidade de genótipos encontrados para este marcador, pois os indivíduos foram amostrados de um único local onde haviam diversos planteis de reprodutores, sendo estes pertencentes a vários locais onde foram adquiridos.

Tabela 2. Variabilidade genética de cinco planteis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através para quatro loci de microssatélites.

População	Locus				Média
	UNH104	UNH108	UNH222	UNH231	
Fortaleza					
N	30	30	30	30	30
Na	9	9	8	6	8,000
Ne	5,0558	6,23	3,509	4,546	4,835
H _o	0,536	0,586	0,600	0,517	0,560
H _e	0,802	0,839	0,715	0,780	0,784
F _{IS}	0,348	0,318	0,177	0,352	0,302
D	-0,332	-0,302	-0,161	-0,337	-0,283
P	0,000	0,000	0,003	0,050	
Itaitinga					
N	30	30	30	30	30
Na	10	9	11	8	9,500
Ne	5,391	4,902	5,014	3,396	4,676
H _o	0,414	0,640	0,867	0,400	0,580
H _e	0,815	0,796	0,801	0,706	0,779
F _{IS}	0,505	0,216	-0,066	0,447	0,272
D	-0,492	-0,196	0,083	-0,433	-0,260
P	0,000	0,000	0,163	0,000	
Amanari					
N	28	28	28	28	28
Na	7	10	7	7	7,750
Ne	3,35	4,442	2,489	5,026	3,827
H _o	0,643	0,714	0,607	0,654	0,655

H_e	0,702	0,775	0,598	0,801	0,719
F_{IS}	0,102	0,096	0,003	0,203	0,108
D	-0,084	-0,078	0,015	-0,184	-0,083
P	0,450	0,094	0,346	0,002	
Horizonte					
N	30	30	30	30	30
Na	6	9	8	4	6,750
Ne	3,713	5,357	3,482	2,903	3,864
H_o	0,724	0,767	0,733	0,200	0,606
H_e	0,731	0,813	0,713	0,656	0,728
F_{IS}	0,026	0,074	-0,012	0,704	0,184
D	-0,009	-0,057	0,029	-0,695	-0,183
P	0,288	0,392	0,311	0,000	
Russas					
N	29	29	29	29	29
Na	6	7	6	5	6,000
Ne	4,356	3,274	2,044	2,822	3,124
H_o	0,393	0,654	0,429	0,414	0,472
H_e	0,770	0,695	0,511	0,646	0,655
F_{IS}	0,504	0,078	0,179	0,374	0,296
D	-0,490	-0,059	-0,161	-0,359	-0,267
P	0,000	0,236	0,096	0,026	
Total					
N	147	147	147	147	147
Na	8	9	8	6	8
Ne	4,373	4,841	3,308	3,739	4,065
H_o	0,542	0,672	0,647	0,437	0,575
H_e	0,764	0,784	0,667	0,718	0,733
F_{ST}	0,034	0,091	0,041	0,070	0,059
D	-0,281	-0,138	-0,039	-0,402	-0,215
P	0,148	0,144	0,184	0,016	

N indica o número de indivíduos; Na, número de alelos; Ne, o número de alelos efetivos; H_o , heterozigosidade observada; H_e , heterozigosidade esperada; F_{IS} , índice de endogamia; F_{ST} , índice de diferenciação genética; D, déficit ou excesso de heterozigotos $(H_o - H_e) / (H_e)$; P , probabilidade de desvio significativo do EHW (método de Fisher; valores significativos estão em negrito, usando correção de Bonferroni $P < 0,05$ (Rice, 1989)).

Tabela 3. Tabela de frequência alélica para cada loco de tilápia do Nilo.

Loco	Alelo (pb)	Fortaleza	Itaitinga	Amanarí	Horizonte	Russas
UNH104	126	0,000	0,034*	0,000	0,000	0,000
	128	0,000	0,017*	0,000	0,000	0,000
	130	0,036	0,034	0,054	0,069	0,054
	132	0,304	0,241	0,464	0,414	0,143
	134	0,232	0,276	0,196	0,259	0,375
	138	0,000	0,052*	0,000	0,000	0,000
	140	0,000	0,000	0,018*	0,000	0,000
	144	0,035	0,172	0,036	0,052	0,161
	146	0,000	0,017*	0,000	0,000	0,000
	148	0,071	0,121	0,000	0,000	0,000
	150	0,000	0,000	0,196	0,138	0,089
	152	0,107*	0,000	0,000	0,000	0,000
	156	0,179	0,034	0,036	0,069	0,179
	158	0,018*	0,000	0,000	0,000	0,000
	160	0,018*	0,000	0,000	0,000	0,000
UNH108	123	0,000	0,000	0,107	0,033	0,115
	125	0,000	0,060	0,054	0,054	0,000
	127	0,034	0,180	0,000	0,000	0,000
	129	0,000	0,060	0,429	0,333	0,500
	131	0,138	0,280	0,071	0,167	0,115
	133	0,138	0,080	0,054	0,050	0,038
	135	0,017	0,020	0,054	0,117	0,000

	137	0,259	0,280	0,054	0,100	0,058
	139	0,000	0,020	0,089	0,133	0,154
	141	0,000	0,020	0,018	0,050	0,019
	143	0,000	0,000	0,071	0,017	0,000
	151	0,069*	0,000	0,000	0,000	0,000
	153	0,034*	0,000	0,000	0,000	0,000
	155	0,155*	0,000	0,000	0,000	0,000
	157	0,155*	0,000	0,000	0,000	0,000
	162	0,000	0,033*	0,000	0,000	0,000
	164	0,000	0,000	0,036	0,000	0,054
	166	0,000	0,050*	0,000	0,000	0,000
	168	0,000	0,033*	0,000	0,000	0,000
	170	0,000	0,000	0,000	0,017*	0,000
	172	0,017*	0,000	0,000	0,000	0,000
	174	0,000	0,017	0,054	0,033	0,036
UNH222	176	0,083	0,050	0,036	0,067	0,000
	178	0,183	0,033	0,214	0,167	0,000
	180	0,150	0,083	0,018	0,000	0,000
	182	0,466	0,350	0,589	0,467	0,679
	184	0,033	0,233	0,054	0,183	0,143
	186	0,000	0,067*	0,000	0,000	0,000
	188	0,050	0,000	0,000	0,033	0,036
	192	0,017	0,000	0,000	0,033	0,054
UNH231	155	0,000	0,017*	0,000	0,000	0,000

157	0,000	0,017*	0,000	0,000	0,000
161	0,000	0,033*	0,000	0,000	0,000
165	0,000	0,000	0,096*	0,000	0,000
167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017*
169	0,000	0,000	0,154	0,067	0,017
171	0,190	0,117	0,269	0,367	0,328
173	0,328	0,267	0,269	0,433	0,466
175	0,103	0,033	0,135	0,133	0,172
177	0,017*	0,000	0,000	0,000	0,000
179	0,000	0,067*	0,000	0,000	0,000
181	0,190	0,450	0,038	0,000	0,000
183	0,172*	0,000	0,000	0,000	0,000
187	0,000	0,000	0,038*	0,000	0,000

*Frequência de alelos privados

Tabela 4. Matriz de diferenciação genética (F_{ST}) par a par entre os planteis de tilápia do Nilo.

População	Fortaleza	Itaitinga	Amanarí	Horizonte	Russas
Fortaleza	*****				
Itaitinga	0,036	*****			
Amanarí	0,066	0,099	*****		
Horizonte	0,050	0,075	0,005	*****	
Russas	0,089	0,110*	0,039	0,023	*****

Os dados foram obtidos usando FSTAT (GOUDET, 2002) * $P < 0,05$.

Tabela 5. Índice de Identidade genética (Ig) (acima da diagonal) e distância genética (Da) (abaixo da diagonal).

	Fortaleza	Itaitinga	Amanarí	Horizonte	Russas
Fortaleza	*****	0,7819	0,7210	0,7715	0,6991
Itaitinga	0,2460	*****	0,6040	0,6831	0,6343
Amanarí	0,3271	0,5041	*****	0,9340	0,8654
Horizonte	0,2594	0,3811	0,0682	*****	0,9021
Russas	0,3579	0,4553	0,1446	0,1030	*****

Os dados foram obtidos usando FSTAT (GOUDET, 2002). $P < 0,05$.

Figura 2. Dendrograma obtido pela matriz de distância genética a partir dos dados gerados pelas avaliações genéticas baseada em distância de Nei (1978). Amanarí, (Aman); Fortaleza (Fort); Horizonte, (Hori); Itaitinga, (Ita); Russas, (Russ).

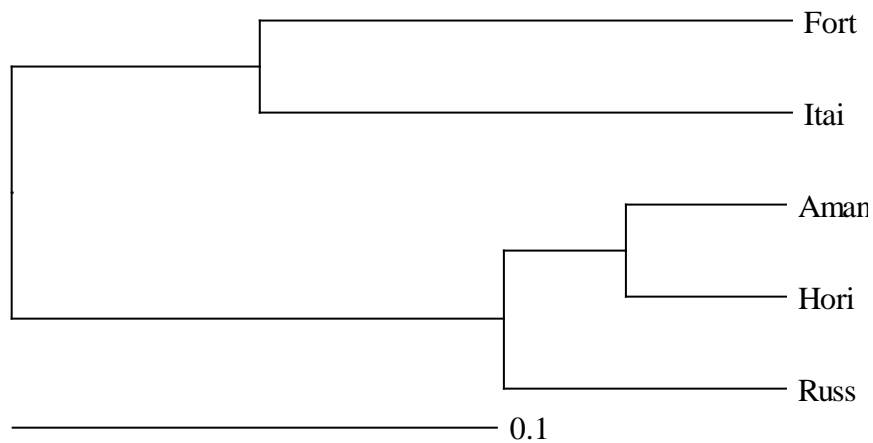
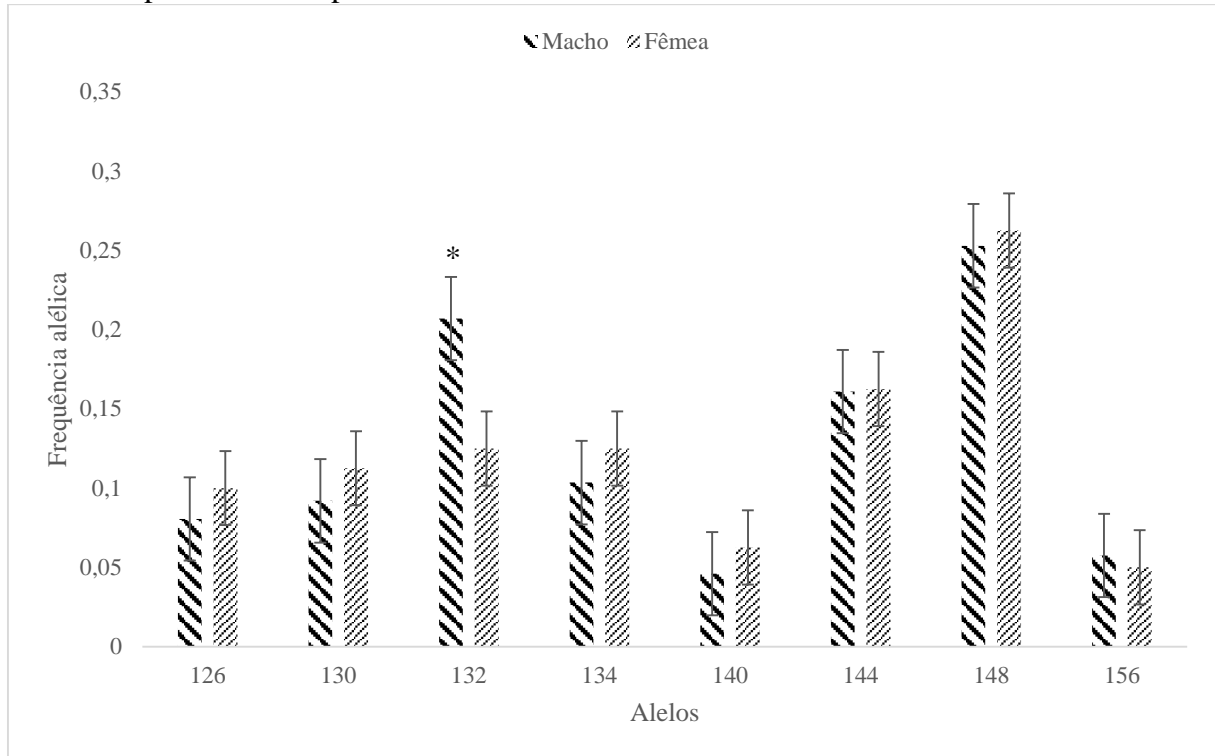
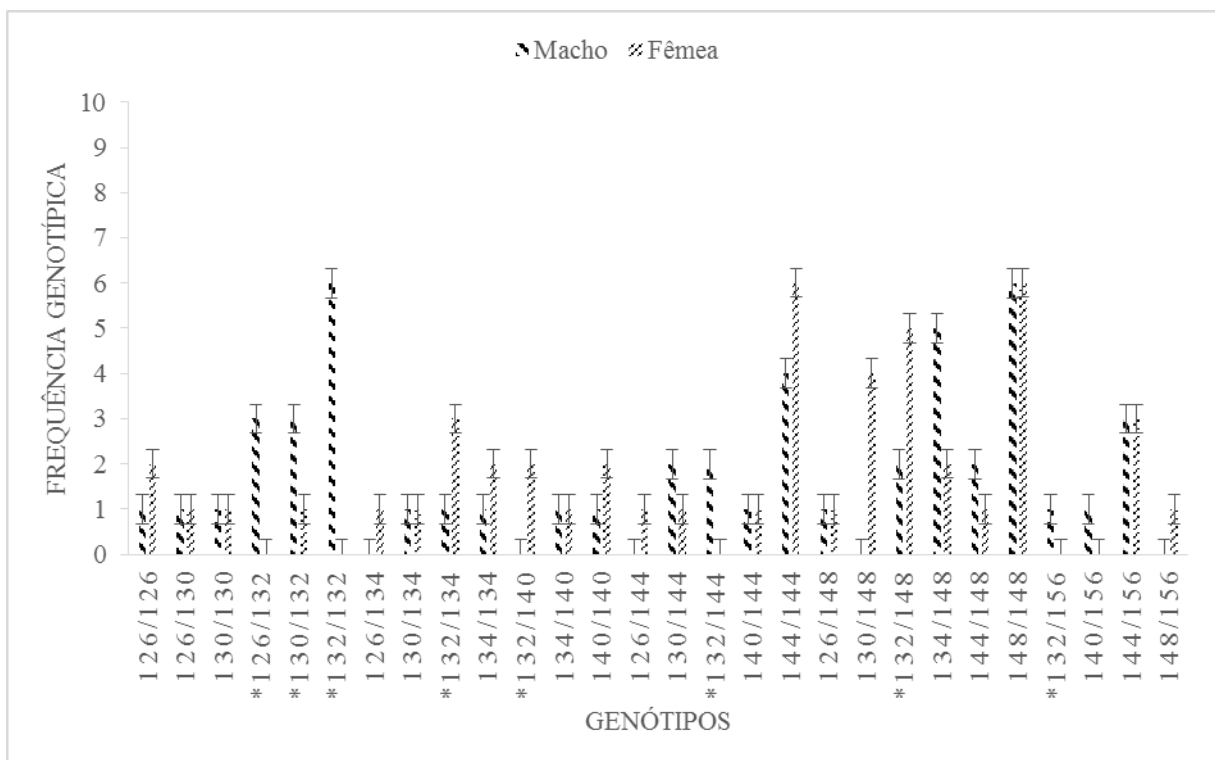


Figura 3- Frequência alélica do marcador UNH104 para macho e para fêmea de tilápia do Nilo com os respectivos erros padrões.



* maior diferença de distribuição alélica.

Figura 4- Frequência genotípica com os do marcador UNH104 para macho e para fêmea de tilápia do Nilo.



*alelo 132 na identificação sexual.

4. DISCUSSÃO

A caracterização genética gerada pelos marcadores de microssatélites utilizados neste estudo mostrou significativos índices de endogamia e moderada diversidade genética entre cinco planteis de tilápia do Nilo, confirmando o histórico de origem dos mesmos. Além disso, mostrou que o marcador *UNH104* apresenta associação do alelo 132 ao sexo masculino na maioria das vezes. No entanto, houve algumas associações entre alguns genótipos ao sexo fenotípico.

A variação média de alelos efetivos obtido nesta pesquisa (4,83-3,12) mostrou ser similar aos estudos relatados por SUKMANOMON *et al.*, 2012 (4,10-5,24) em quatro linhagens de tilápia do Nilo e por RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2013 (3,24-3,619) em três gerações da linhagem GIFT cultivadas. Por outro lado, HASSANIEN e GILBEY (2005) registraram valores médios maiores (7,22 à 9,42) para populações de tilápias do Nilo selvagens. Esta baixa variação de alelos efetivos em planteis cultivados em relação a população selvagem pode ser consequência de um possível tamanho efetivo reduzido da população, levando a perda de alelos por deriva genética. Como também, a seleção de determinados marcadores moleculares microssatélites que podem evidenciar um quadro de diminuição da variação genética como foi relatado por ROMANA-EGUIA *et al.*, 2005 em duas gerações de linhagem chitralada de tilápia do Nilo.

A ocorrência de 26 alelos privados em planteis de cultivo não mostrou ser incomum, pois valores semelhantes foram encontrados por PETERSEN *et al.*, 2012 em três variedades de tilápias do Nilo (GIFT, vermelha e nilótica comum), utilizando também os marcadores *UNH104* (14 alelos) e *UNH108* (10 alelos). A influência de três alelos privados sobre o índice de diversidade genética como foi registrado por AN *et al.*, 2010 em planteis cultivados de dourada preta (*Acanthopagrus schlegelii*) e CUEVAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014 espécies comerciais de tilápia do gênero *Oreochromis sp.*

Fatores como seleção sobre o locus, endogamia, mistura de populações com diferentes frequências de alelos e a presença de alelos nulos podem afetar no equilíbrio de Hardy-Weinberg (Romana-Eguia *et al.*, 2005 e Kordicheva *et al.*, 2010). Este último fator foi detectado para o marcador *UNH231* na maioria dos planteis estudados. Este marcado afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg pode ter influenciado na redução da heterozigosidade média detectada neste presente estudo. O mesmo fator também foi proposto

por Luvesuto *et al.*, 2007 em estudo da variabilidade genética do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

A redução da variabilidade genética revelada pelo valor significativo de F_{IS} dentro dos planteis estudados pode ser atribuída também ao reduzido número de reprodutores em cada ciclo reprodutivo, correspondente a razão de 3:1 (fêmeas:machos). Adicionalmente, a ausência de manejo genético adequado dentro dos cultivos pode acarretar em um maior grau de parentesco dentro dos planteis e, conseqüentemente, a endogamia (SBORDONI *et al.*, 1986; BORREL *et al.*, 2004; AHO *et al.*, 2006; AN *et al.*, 2011).

Os índices de diferenciação genética (F_{ST}) encontrados para os cinco planteis estudados variou de baixo a moderado. Baixos valores para este índice foram relatados por HASSANIEN; GILBEY, 2005, os quais observaram o $F_{ST}=0,035$ em análise de diversidade e diferenciação de populações selvagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), utilizando dentre os marcadores os loci *UNH104* e *UNH222*. ROMANA-EGUIA *et al.*, 2005 relataram um valor de o valor de $F_{ST}= 0,043$ no estudo de comparação de estoques naturais e selecionados de tilápia do Nilo. Por outro lado, Rutten *et al.*, 2004 observaram valores elevados de F_{st} (0,178) em quatro linhagens de tilápia do Nilo.

Apesar de todos os planteis serem derivados da mesma linhagem Chitralada, tanto as estimativas derivadas de F_{ST} como os índices de identidade genética e distância genética, permitem caracterizar dois grupos, os quais concordam perfeitamente com o histórico de formação dos planteis. Cada plantel teve acesso a um grupo de reprodutores de origem genética distintas.

A maior frequência do alelo 132 no loco *UNH104* para o sexo masculino sugere uma possível associação do marcador a este fenótipo. Em três famílias de tilápia do Nilo estudadas em Stirling, UK apresentaram genótipos com o alelo 132 em maior evidência para os machos (LEE *et al.*, 2003). A associação deste marcador no haplótipo Y também foi relatada em Lee *et al.*, 2004, indicando o alelo 189 na marcação do cromossomo Y para tilápia azul (*Oreochromis aureus*). Porém, mesmo que tenha sido observada uma maior frequência do alelo 132 em machos, a ausência de diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas associadas ao sexo foi atribuída a extensa diversidade genotípica oriunda da origem dos reprodutores estudados, pois estes indivíduos pertenciam a vários planteis de cultivo diferentes. Lee *et al.*, 2003 verificaram diferença significativa na classificação do sexo de acordo com o genótipo, porém a análise das amostras foram realizadas em famílias individualmente cultivadas, compartilhando assim os mesmos alelos, diferente da análise que

foi realizada para este estudo em amostras pertencentes a diferentes históricos de formação de plantéis. Por outro lado o complicado sistema heterogamético masculino XX/XY em tilápia sofre grandes variâncias para diferentes marcadores diante das interações com os fatores ambientais, principalmente a temperatura (SUN *et al.* 2014; PALAIOKOSTAS *et al.* 2013; BEARDMORE *et al.* 2001).

Regiões de determinação sexual (SD), onde atuam vários fatores genéticos para a tilápia do Nilo, foram encontrados nos grupos de ligação 1 e 23 (ESHEL *et al.* 2012; SUN *et al.* 2014 e PALAIOKOSTAS *et al.* 2013). Dentre estas regiões, o marcador *UNH104* é evidenciado por LEE *et al.*, 2003 e LEE *et al.* 2011. Diante do estudo realizado por Palaiokostas *et al.* 2013, houve uma redução da região do locus determinante do sexo da tilápia através do um maior adensamento do mapa de ligação na região SD. Foram encontrados dois marcadores do tipo SNP (*Oni23063* e *Oni28137*) nos quais apresentaram uma elevada associação e maior consistência com o fenótipo sexual. Mesmo assim, o estudo assumiu que houveram várias incoerências nas genotipagens dentro das famílias analisadas.

O estudo aqui desenvolvido serviu como um rastreamento do alelo 132 diante da genotipagem para identificação sexual do loco de microssatélite *UNH104*. Uma maior frequência do alelo 132 no loco *UNH104* indicou uma maior associação ao sexo masculino, corroborando a análise genotípica do homozigoto 132/132, o qual foi observado apenas em machos no presente estudo. Esta observação sugere que estes indivíduos podem ser direcionados para atuar no processo de produção do monosexo. A obtenção de uma maior proporção de machos dentro de um plantel reprodutores, poderia ser alcançado através de cruzamentos que apresentem segregações de genótipos mais frequentes para a determinação do sexo masculino e o acompanhamento de marcadores mais consistentes na identificação e controle do sexo.

REFERÊNCIAS

- AHO, T., RÖNN, J., PIIRONEN, J., & BJÖRKLUND, M. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta L.*) populations. **Aquaculture**, v.253, n.1-4, p.244–248, 2006.
- ALARCÓN JA, MAGOULAS A, GEORGAKOPOULOS T, ZOUROS E, ALVAREZ MC. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v.230, n.1-4, p.65-80, 2004.
- AN, HS. *et al.* Genetic diversity of rock bream *Oplegnathus fasciatus* in Southern Korea. **Genes Genomics**, v.30, n.5, p.451-459, 2008.
- AN, H. S., HONG, S. W., LEE, J. U., PARK, J. Y., & KIM, K.-K. Genetic diversity of wild and farmed black sea bream populations in Jeju. **Animal Cells and Systems**, v.14, n.1, p.37–44, 2010.
- AN, H. S., LEE, J. W., KIM, H. C., & MYEONG, J.-I. Genetic characterization of five hatchery populations of the Pacific Abalone (*Haliotis discus hannai*) using microsatellite markers. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, n.8, p.4836–49, 2011.
- AN, H. S. *et al.* Genetic diversity of wild and farmed black sea bream populations in Jeju. **Animal Cells and Systems**, v. 14, n. 1, p. 37–44, 2010.
- BARRERO, L. *et al.* Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (characiformes: prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema, **Bioscience Journal**, v.24, n.4, p.86–93, 2008.
- BEARDMORE, J.; MAIR, G.; LEWIS, R. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 283–301, 2001.
- BORRELL, Y. J., ÁLVAREZ, J., VÁZQUEZ, E., PATO, C. F., TAPIA, C. M., SÁNCHEZ, J. A., & BLANCO, G. Applying microsatellites to the management of farmed turbot stocks (*Scophthalmus maximus*) in hatcheries. **Aquaculture**, v.241, n. 1-4, p.133–150, 2004.
- CHISTIAKOV, D.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellite and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v.255, n.1–4, p. 1–29, 2006.
- CNAANI, A.; HULATA, G. (2008) Tilapia. In: Kocher TD, Kole C, editors. **Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals**. Berlin Heidelberg: Springer. 101–116. Available: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-73837-4_4.
- COCKERHAM, C.; WEIR, B. Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, v.47, n.3, p.855-863, 1993.

- CUEVAS-RODRÍGUEZ, B. *et al.* Genetic diversity of commercial species of the tilapia genus *Oreochromis* in Mexico, **International Journal of Aquatic Science**, n.5, n.1, p.58–66, 2014.
- DESVIGNES, J. *et al.* Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. **Aquaculture**. v.194, n.3-4 p.291-231, 2001.
- DEINES, A., BBOLE, I., KATONGO, C., FEDER, J., & LODGE, D. Hybridisation between native *Oreochromis* species and introduced Nile tilapia *O. niloticus* in the Kafue River, Zambia. **African Journal of Aquatic Science**, v.39, n.1, p.23–34, 2014.
- ESHEL, O. *et al.* Linkage and Physical Mapping of Sex Region on LG23 of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 2, n. 1, p. 35–42, 2012.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 1996. Essex Longman Group Ltd.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, p.230, 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. FAO, p.243, 2014.
- GARCIA-VALLVE, S. *et al.* Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Molecular Biology and Evolution**, v.9, n.9, p.1125-1134, 1999.
- GOUDET, J. FSTAT (vers.1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v.86, n., p.485–186, 1995.
- GU, D.; MU, X.; SONG, H.; LUO, D.; XU, M.; LUO, J.; HU, Y. Genetic diversity of invasive *Oreochromis spp.* (tilapia) populations in Guangdong province of China using microsatellite markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.55, p.198–204, 2014.
- GUI, J.F., ZHU, Z.Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals. **Chin. Sci. Bull.** v.57, p.1751–1760, 2012.
- HASSANIEN, H. A.; GILBEY, J. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. **Aquaculture Research**, v.36, n.14, p.1450–1457, 2005.
- HICKLING, C. The Malacca tilapia hybrids. **Journal Genetics**. v. 57, n.1, p.1–10, 1960
- HOPKINS, K. D.; SHELTON, W. L.; ENGLE, C. R. Estrogen sex-reversal of *Tilapia aurea*. **Aquaculture** v. 18, n.3, p.263–268, 1979.
- HULATA, G.; WOHLFARTH, G.; ROTHBARD, S. Progeny-testing selection of tilapia broodstocks producing all-male hybrid progenies—preliminary results. **Aquaculture**, v. 33, n.1-4, p.263–268, 1983.

- KOLJONEN, M.L. *et al.* Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. **Aquaculture**, v.212, p.69-92, 2002.
- KORDICHEVA, S. Y.; RUBTSOVA, G. A.; SHITOVA, M. A.; SHAIKHAEV, G. O.; AFANASIEV, K. I.; ZHIVOTOVSKY, L. A. A search for null alleles at the microsatellite locus of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). **Russian Journal of Genetics**, v.46, n.8, p.1019–1022, 2010.
- KUBITZA, F., CAMPOS, J. L., ONO, E. A., Istchuk, P. I. **Panorama da Piscicultura no Brasil**, v. 22, n. 132, 2012.
- LEE, B.-Y. *et al.* Genetic and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine biotechnology**, v. 13, n.3, p.557–62, 2011.
- LEE, B.-Y.; HULATA, G.; KOCHER, T. D. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). **Heredity**, v. 92, n. 6, p. 543–9, 2004.
- LEE, W.-J.; KOCHER, T. D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, v 49, n. 1, p.169–171, 1996.
- LEE, B.-Y., PENMAN, D. J., & KOCHER, T. D. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. **Animal Genetics**, v. 34 n.5, p.379–383, 2003.
- LI, Q. *et al.* Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). **Aquaculture**, v. 235, n.1-4, p.207-222, 2004.
- LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, n. 1-4, p. 1–37, 2004.
- LIU, H.Q., GUAN, B., XU, J., HOU, C.C., TIAN, H., CHEN, H. X. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale breeding of YY super-male and XY all-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson). **Marine Biotechnolgy**, v. 15, n.3, p. 321–328, 2013.
- LUVESUTO, E.; MANOEL, P.; JUNIOR, G. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 1160, p. 1156–1160, 2007.
- MAIR, G. C. 1988. Studies on sex determining mechanisms in *Oreochromis* species. Ph.D. thesis, **University of Wales**, Swansea. 326p.
- MAIR, G.C., Abucay, J.S., Beardmore, J.A., Skibinski, D.O.F. Growth performance trials of genetically male tilapia (GMT) derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L.: on station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. **Aquaculture**, v.137, n.1-4, p.313–323, 1995.

MAIR, G.C., Abucay, J.S., Skibinski, D.O.F., Abella, T.A., Beardmore, J.A. Genetic manipulation of sex ratio for the large scale production of all-male tilapia *Oreochromis niloticus* L. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.54, n.2, p.396-404, 1997.

MCKINNA, E. M. *et al.* An investigation of the possible causes for the loss of productivity in genetically improved farmed tilapia strain in Fiji: inbreeding versus wild stock introgression. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 730–742, 2010.

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P.; TEIXEIRA, C.S.; SOUSA, A.B.; COELHO, E.G.A.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.87-93, 2006.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, 2010, 2012.

MOREIRA, A. A., WAGNER, A., HILSDORF, S., & VIANA, J. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites, v.1, n.4, p.521–526, 2007.

PALAIOKOSTAS, C. *et al.* Mapping and validation of the major sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Using RAD sequencing. **PloS one**, v.8, n.7, p. 368-389, 2013.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v.6, n.1, p.288-295, 2006.

PETERSEN, R. L. *et al.* Análise da diversidade genética de tilápias cultivadas no estado de Santa Catarina (Brasil) utilizando marcadores microssatélites. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, n. 4, p. 313–321, 2012.

POPMA, T.J., ROSS, F.E., NERRIE, B.L., BOWMAN, J.R. The development of commercial farming of tilapia in Jamaica 1979–1983. **Research and Development Series**, n. 31. International Center for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, AL, USA, p. 18, 1984.

KUBITZA, F., CAMPOS, J. L., ONO, E. A., ISTCHUK, P. I. **Panorama da Piscicultura no Brasil**, v. 22, n. 132, 2012.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.

RICE, W. **Evolution**, v.43, n.1, p. 223-225, 1989.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; ALBUQUERQUE, D. M.; GOES, E. S. D. R.; PRADO, O. P. P. DO; RIBEIRO, R. P. Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.10, p.1385–1393, 2013.

ROMANA-EGUIA, M. R. R., IKEDA, M., BASIAO, Z. U., & TANIGUCHI, N. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. **Aquaculture Research**, v.36, n.1, p. 69–78, 2005.

ROSENSTEIN, S., HULATA, G., Sex reversal in the genus *Oreochromis*: optimization of feminization protocol. **Aquaculture Research**, v.25, p. 329–339, 1994.

RUTTEN, M. J. M. *et al.* Genetic characterization of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using microsatellite markers. **Animal genetics**, v. 35, p. 93–7, 2004.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, 1989.

SBORDONI, V. *et al.* Bottleneck Effects and the Depression of Genetic Variability in Hatchery Stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). **Aquaculture**, v.57, p.239-251, 1986.

SCHNEIDER, S., ROESSLI, D., EXCOFFIER, L. Arlequin ver 2.000: A Software for Population genetics data Analysis. **Genetics and Biometry Laboratory**, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SEBRAE & Escola Superior de Propaganda e Marketing – ESPM. Relatório completo. **Aquicultura e pesca: tilápias**. 2008.. Disponível em:
<[http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/77DBF2893A380B398325749E0067E2C5/\\$File/NT00038BEE.pdf](http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/77DBF2893A380B398325749E0067E2C5/$File/NT00038BEE.pdf)> Acesso em 23/01/2015.

SEKINO, M. *et al.* Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v.233, p.163-172, 2004.

SIMBINE, L.; VIANA DA SILVA, J.; HILSDORF, A. W. S. The genetic diversity of wild *Oreochromis mossambicus* populations from the Mozambique southern watersheds as evaluated by microsatellites. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 30, n. 2, p. 272–280, 2014.

SUN, Y.-L. *et al.* Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 433, p. 19–27, 2014.

SUKMANOMON, S., KAMONRAT, W., POOMPUANG, S., NGUYEN, T. T. T., BARTLEY, D. M., MAY, B., & NA-NAKORN, U. Genetic changes, intra- and inter-specific introgression in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand. **Aquaculture**, 324-325, 44–54, 2012.

PAGE, R.D.M. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **CABIOS**, v.12, p.357-358, 1996. Disponível no link:
<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P.F Micro-Checker User Guide. **University of Hull**, 2005.

WANG, X. et al. Identification of two novel female-specific DNA sequences in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. **Aquaculture**, v. 388-391, p. 49–53, 2013.

WASKO, A. *et al.* Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. **Journal of Applied Ichthyology**, v.20, p.48-52, 2004.

WEBER, J. L. Informativeness of Human (dC-dA)_n . (dG-dT)_n, Polymorphisms. **Genomics**, v.7, p.524-530, 1990.

WOHLFARTH, G. W. The unexploited potential of tilapia hybrids in aquaculture. **Aquaculture Fishing Manage.** v. 25, p. 781-788, 1994.

Capítulo 2 – Marcação de fragmentos de PCR com sondas fluorescentes no desenvolvimento de painéis multiplex para análise parental do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura produziu cerca de 70,5 milhões de toneladas de proteína animal aquática para consumo humano em 2013. Apenas no cultivo de crustáceos representou 6,4 milhões de toneladas, aproximadamente 9,4% do total de produção para fins alimentares em 2012. Em relação a valores, esse volume produzido representa 22,4% (FAO, 2014).

O camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) responde por 76% da produção mundial de peneídeos cultivados e representa uma das espécies de crustáceos mais empregadas na carcinicultura atualmente (FAO, 2012). Este organismo é restrito ao oceano Pacífico e sua distribuição natural ocorre do México (Província de Sonora) até o Peru (Sul de Tumbes) (BENZIE, 2000). É considerada a principal espécie exótica de camarão marinho cultivada no Brasil atualmente, com uma produção de 35 mil toneladas em 2012 (MPA, 2012).

As populações aquícolas cultivadas estão sujeitas ao acasalamento entre parentes ou indivíduos relacionados ao mesmo ancestral (FALCONER; MACKAY, 1996). Para o monitoramento e controle da endogamia resultante destas reproduções, o desenvolvimento de marcadores moleculares para a aquicultura tem proporcionado um grande avanço nas pesquisas de variabilidade genética, identificação de espécies e linhagens, relações de parentesco, como também, na construção e um maior adensamento de mapas de ligação para espécies cultivadas (LIU & CORDES, 2004).

Dentre os principais marcadores existentes, os microsatélites se destacam pelas múltiplas cópias em *tandem*, alcançando uma variação de 1 a 6 pares de bases, apresentando característica hereditária codominante, são abundantes no genoma e bastante polimórficos (CHISTIYAKOV *et al.*, 2006). O relativo pequeno tamanho dos loci de microsatélites revela ser de grande importância, pois facilita o processo de PCR e, conseqüentemente, a genotipagem (LIU; CORDES, 2004). Muitos estudos mostraram o sucesso da utilização destes marcadores para a espécie *Litopenaeus vannamei* no caráter de monitoramento da variabilidade genética de estoques selvagens e cultivados ao longo dos anos (GARCIA; ALCIVAR-WARREN 1996; GARCIA *et al.* 1996; WOLFUS *et al.*, 1997; MEEHAN *et al.*, 2003; PÉREZ *et al.*, 2005;

VALLES-JIMENEZ *et al.*, 2005; LUVESUTO *et al.*, 2007; KELLY *et al.*, 2010; MAGGIONI *et al.*, 2013; MONTALDO *et al.*, 2013).

Os marcadores moleculares estão sujeitos ao processo de *slippage* durante o processo de replicação da polimerase, podendo alterar a posição dos alelos gerados em até 2pb (em locus dinucleotídeos) (LIU; CORDES, 2004). Além disso, os amplicons gerados pela PCR para fins de genotipagem são tradicionalmente marcados, dentre os principais os radioisótopos (não mais utilizados) (SAMBROOK *et al.*, 1989) e os fluoróforos (SCHUELKE, 2000), sendo este último utilizado amplamente em microssatélites (NEILAN *et al.*, 1997). A técnica de genotipagem através de sequenciadores automáticos exigem a utilização de *primers* marcados com fluorescência, os quais apresentam um elevado custo, podendo onerar em muito a pesquisa (DINIZ *et al.*, 2007).

Diante disso, Schuelke, 2000 desenvolveu um método em que os produtos de genotipagem apresentavam uma alta performance utilizando uma pequena fração de concentração fluorescente em uma única reação, diminuindo assim os custos. Esta técnica consiste na utilização de uma sequência (cauda), sendo neste estudo o iniciador universal M13(-21) marcado com qualquer tipo de fluorescência, a qual irá flanquear com uma das sequências de *primer* que ficam anexado a extremidade 5' a sequência M13(-21) sem a marcação. Esta técnica proporciona o aumento da robustez de definição dos alelos, reduzindo os custos ligados a marcação de *primers* (YU *et al.*, 2001; DINIZ *et al.*, 2007). No entanto, a utilização destas caudas podem proporcionar um aumento na formação de *hairpins* e dímeros de *primers* (HAUSWALDT; GLENN, 2003 e DINIZ *et al.*, 2007).

Para aumentar ainda mais a eficiência do processo de genotipagem, o sistema de ampliações em multiplex é um segmento de PCR no qual dois ou mais loci são simultaneamente amplificados em uma mesma reação (HENEGARIU *et al.*, 1997). Esta redução do número de reações envolvidas para testar uma amostra em vários marcadores, ajuda a economizar tempo e dinheiro na análise de um grande número de amostras (SINT *et al.*, 2012).

Em estudos voltados para aquicultura, este sistema tem sido empregado em áreas como a determinação de paternidade (MOUSSEAU *et al.*, 1998; VANDEPUTTE *et al.*, 2001; TARIS *et al.*, 2005), para avaliação de diversidade genética em populações de cultivo

(BOUDRY *et al.*, 2002; HARA e SEKINO, 2003; LI *et al.*, 2007; HAMOY *et al.*, 2008) e manejo genético em reprodutores de cultivo (HAMOY; SANTOS, 2012).

Apesar de existir vários fabricantes que ofereçam kits de PCR multiplex, afirmando que não há necessidade de otimização das reações, continua sendo indispensável a otimização das concentrações dos primers e condições de termocilagem para haja estabilidade e reprodutibilidade das reações (SINT *et al.*, 2012).

Na tentativa de tornar o processo de genotipagem mais eficiente, a utilização de *primers* associados a cauda marcada para compor um sistema de painéis multiplex de PCR serão desenvolvidos e validados através da análise de segregação alélica em famílias cultivadas de *Litopenaeus vannamei*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das amostras e extração de DNA

Em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) do estado do Piauí (PI), foram fornecidas oito famílias de irmãos completos com 10 indivíduos cada de *Litopenaeus vannamei* e os respectivos dados genotípicos referentes aos pais de cada família coletada.

As amostras de tecido individuais foram obtidas através da retirada de segmentos abdominais dos camarões, sendo estas imediatamente armazenadas em etanol a 95%.

O DNA foi extraído seguindo o protocolo padrão de PCI-Proteinase K, com algumas modificações (SAMBROOK *et al.* 1989). Cada amostra foi macerada para aumentar a superfície de contato e receberam 700µL de tampão de extração (Tris- HCl 100mM pH 8,5; 1% SDS) e 30µL de proteinase K (10µg/mL). Em seguida, as amostras foram incubadas a 39°C *overnight*. Após esta etapa, foram adicionados 350µL de Fenol e 350µL em solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e misturados por inversão por 5 minutos e centrifugado a 7.000 g por 5 minutos para separação de fases. Foram removidos 650µL da fase aquosa (superior) para um minitubo limpo sem perturbar a interface, utilizando uma pipeta de ponta larga para minimizar a quebra mecânica do DNA. Posteriormente, foram adicionados mais 650µL a solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e misturados por inversão por 5 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 7.000 g por 5 minutos para separar a

fase aquosa e foram removidos 500µL para um minitubo limpo, e em seguida adicionado 1ml (2x a fase aquosa) de etanol absoluto e 50µL (0,1x a fase aquosa) de acetato de sódio (2M) e incubada no freezer por 15 min. O DNA foi centrifugado a 10.000g por 15 min e o sobrenadante foi descartado por inversão. Em seguida, a amostra foi lavada com 500µL de etanol 70% gelado e centrifugada a 10.000 g por 5 min. O etanol foi descartado e o precipitado, invertendo o tubo sobre um papel toalha por 5 min. O DNA foi ressuspenso em 50µL de TE (10mM Tris- HCl pH 8,5; 1mM EDTA) e armazenado em freezer a -20°C.

2.2. *Desenvolvimento do sistema de PCR multiplex*

Os quinze marcadores estudados foram escolhidos baseado no polimorfismos e reprodutibilidade como foi relatado por Cruz *et al.*, 2002, Meehan *et al.*, 2003 e Pérez *et al.*, 2005 (Tabela 1). Todos estes loci receberam na sequência *foward* uma cauda (TGTAACGACGGCCAGT) correspondente a 18pb do iniciador universal M13(-21). Com a adição desta sequência, foi necessário realizar o processo de otimização para a temperatura de anelamento através de testes com gradiente de temperatura. As condições de amplificação dos marcadores individuais por PCR foram realizadas em um volume final de 12,5µL, contendo: 1x PCR Buffer (10mM, Tris-HCl pH 8,3), 1,8mM de MgCl₂, 10mM de cada *primer*, 0,25 mM de cada dNTPs, 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 50ng de DNA. As condições de ciclagem da PCR foram: desnaturação a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento sob gradiente de temperatura de 52°C (no mínimo) a 62°C (no máximo) por 45 segundos e extensão de 72°C por 60 segundos, e um passo final de extensão de 72°C por 60 minutos para tornar homogênea a cauda poli-A. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese de agarose a 1,5% a 120V, 300mA e 60V para verificação da melhor temperatura de anelamento e o tamanho dos amplicons gerados.

Com base no tamanho dos amplicons, evitando sobreposições, a temperatura de anelamento em comum e a verificação da formação de *hairpins* e dímeros de *primers* foram analisados através dos programas Multiplex Manager v1.2 (HOLLELEY; GEERTS, 2009) e Autodimer v1.0 (VALLONE; BUTLER, 2004) que permitiram várias combinações e testes com o desenvolvimento de conjuntos de marcadores. Cada conjunto de *primers* formado, recebeu uma cauda fluorescente M13(-21) (PET, 6-FAM, HEX ou NED). Estes conjuntos seguiram as diretrizes relatadas no Multiplex PCR Handbook 09/2002 (Qiagen), porém com modificações nas concentrações dos primers e a cauda fluorescente. Baseado em Schuelke, 2000, foram realizados alguns testes de concentração destas sequências.

As ampliações foram realizadas em um volume final de 10 μ L, contendo: 0,2 X Qiagen Multiplex PCR Master Mix (3 mM MgCl₂, pH 8.7), 0,3 μ M do 10x primer mix (2,94 μ M para o *forward*, 3 μ M para o *reverse* e 0,06 μ M para cauda M13(-21) fluorescente) e 200ng de DNA genômico. O protocolo de ciclagem seguiu as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94° por 30 segundos, temperatura de anelamento de 56°C (temperatura em comum para os conjuntos obtidos) por 45 segundos e extensão de 72°C por 60 segundos, para a incorporação da cauda, seguiram oito ciclos de anelamento de 53°C a 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos e um passo de extensão final de 72°C por 30 segundos. Os produtos obtidos foram genotipados no sequenciador automático capilar ABI3500 (Applied Biosystems, CA, USA.) com o marcador de peso molecular GS-600 LIZ[®].

Os conjuntos que apresentaram todos os marcadores com os seus respectivos alelos foram selecionados para a continuação do estudo e submetidos ao programa Micro-checker v.2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2005) para verificação de alelos nulos.

2.3. Validação dos conjuntos de PCR multiplex

Os conjuntos formados foram validados através da comparação dos genótipos dos pais com os respectivos genótipos das oito famílias obtidas. Para verificar se a migração alélica da prole observada correspondeu a segregação de alelos do cruzamento dos pais esperado, foi adotado o teste do qui-quadrado. O cálculo para este teste adotou o seguinte número de classes genóticas esperada pelos pais e seguiu a equação com o seu respectivo grau de liberdade (gl):

$$X^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O - E)^2}{E}$$

$$gl = k - 1$$

Onde O é o número de indivíduos observados na classe genotípica, E é o número esperado de indivíduos na mesma classe genotípica, e k é o número de classes genóticas. A não diferença estatística verificada significou que a frequência genotípica da prole obedeceu a proporção genotípica esperada pelo cruzamento dos pais. Por outro lado, a diferença significativa indicava a frequência genotípica apresentada pela prole foi diferente da proporção genóticas apresentada pelos pais.

Tabela 1- Marcadores testados para o desenvolvimento de painéis multiplex para *Litopenaeus vannamei*.

Primer	N° de acesso	Repetição	Sequências (Cauda M13-Foward)	pb	pbo	N° de alelos
CNM-MG 339	Pérez <i>et al</i> , 2005 (não citado)	(ACAAA)4	F 5'TGTAAAACGACGGCCAGTAAACAACATATTGCAGTTC3'	180	155-181	9
			R 5'AAGCGTCAGATTCCAG3'			
CNM-MG 380	Pérez <i>et al</i> , 2005 (não citado)	(ATT)3 GTT (ATT)5	F 5'TGTAAAACGACGGCCAGTCGAGCGTTATCAAATG3'	266	255-278	11
			R 5'GAAATGATGGGGAAGA3'			
CNM-MG384	Pérez <i>et al</i> , 2005 (não citado)	(AAACA)5	F 5'TGTAAAACGACGGCCAGTATCGGGAATACAATCG3'	245	245-265	12
			R 5'AACCCTAACAAACAATAAG3'			
CNM-MG421	Pérez <i>et al</i> , 2005 (não citado)	(AAT)5	F 5'TGTAAAACGACGGCCAGTTTTCTGCCACGGAGTT3'	162	166-181	2
CNM-MG437	Pérez <i>et al</i> , 2005 (não citado)	(CAA)6	F 5'TGTAAAACGACGGCCAGTCAACCAGGAAATAGAACAG3'	153	151-153	3
			R 5'GCAGCCTTACCACGAC3'			
TUMXL5.27	AF360022	...(TC)4...(CT)4... (TC)3...(CT)3...(TC)5...	F 5'TGTAAAACGACGGCCAGTCAGACCCTAAATCTCCGTGC3'	193	178-202	11
R 5'TGGAAAGGTCAGAGGTCACG3'						
TUMXL5.38	AF360024	...(TC)8...(CT)4...(TC)4...	F 5'TGTAAAACGACGGCCAGTCCTTTATGACTTCCCCCGAC3'	233	218-246	14
			R 5'CCGTACAGAAACGGAACGTC3'			

TUMXL V8.193	AF360069	...(AT)3...	F 5' TGTA AAAACGACGGCCAGT GATGTACACA ACTGTACTTCG3' R 5' GAGATGATAAGAGAACGAAAG3'	187	192- 196	4
TUMXL V8.2	AF360070	...(AT)3...(AT)3...(AT) 3...(AT)3...(AT)3... (AC)3...(AT)3...(AT)3.. . (AT)3...(AT)3...	F 5' TGTA AAAACGACGGCCAGT CCTCCTGTCCATTCAGCAG3' R 5' GGTCAGATATGTATTTCGAGTRCGG3'	262	245- 261	5
TUMXL8. 256	AF360076	...(AAT)4...	F 5' TGTA AAAACGACGGCCAGT GGACTCACACTTCTGGTTC3' R 5' GGCTGCACCTTGTAAGTC3'	184	152- 184	8
TUMXL8. 32	AF360080	...(CA)3...(TA)4...	F 5' TGTA AAAACGACGGCCAGT TTACCGCCTAAGAGCGAATG3' R 5' TGTCCTTTCGTACCAGTCAAG3'	238	234- 246	6
PVAN0013	AY062929	(TA)5 ... (AT)4	F 5' TGTA AAAACGACGGCCAGT TGCTCTGGTAACGACAAACG3' R 5' AGACCTGTGGCGAAGTGC3'	302	289- 307	5
PVAN1003	AY062927	(GT)9 GC (AT)2 (GT)6	F 5' TGTA AAAACGACGGCCAGT ATATTTTCATGCGTTCCGAGG3' R 5' GACTATCTCACGCGCCTCTC3'	167	165- 169	3
PVAN1758	AY062928	(T)10(TC)7...(T)4(TC)	F 5' TGTA AAAACGACGGCCAGT ATGCTCGTTCCCTTTGCTT3' R 5' TTGAAGGAAAAGTGTTGGGG3'	181	199- 210	3
PVAN 1815	AY062925	(T)7(CT)2(CTTT)4...(CT)6	F 5' TGTA AAAACGACGGCCAGG ATCATTCGCCCTCTTTT3' R 5' ATCTACGGTTCGAGAGCAGA	158	141- 151	18

3. RESULTADOS

3.1. *Desenvolvimento do sistema de PCR multiplex*

Nos testes de genotipagem em multiplex, a maioria dos loci apresentaram temperatura de anelamento de 56°C em comum. A intensidade da fluorescência gerada pela incorporação da sonda M13(-21) nas amplificações tiveram uma melhor performance na concentração da sequência *foward* em 2,94µM, da sonda M13(-21) em 0,06µM e da *reverse* em 3µM (Tabela 2), pois proporcionaram uma melhor definição na formação de picos alélicos.

Dos quinze marcadores testados, nove marcadores apresentaram em conjunto amplificações consistentes e sem formação de dímeros, sob a seguinte forma: *Conjunto 1* (TUMXLV5.38, TUMXLV5.27, CNM-MG437), *Conjunto 2* (TUMXLV8.256, TUMXLV8.32, PVAN0013) e *Conjunto 3* (CNM-MG421, CNM-MG384, PVAN1003), marcados com as fluorescências PET, HEX e 6-FAM respectivamente, totalizando assim três conjuntos de PCR multiplex (Tabela 2).

3.2 *Validação dos conjuntos de PCR multiplex*

Os genótipos dos machos foram inferidos de acordo com o genótipo da fêmea e da prole para a respectiva família associada. Devido a detecção de alelos nulos para os loci TUMXL8.256, TUMXL8.32 e PVAN0013, todos pertencentes ao conjunto 2, as famílias analisadas por estes loci apresentaram casos em que os descendentes foram classificados como portador de alelo nulo: família D e J para o loco TUMXL8.32 e família J no loco PVAN0013 (Tabela 3). Para o loco TUMXL8.256 a maioria dos genótipos foram homozigotos em grande parte das famílias (Tabela 3).

A maioria dos alelos identificados no sistema de PCR multiplex para a prole foram também identificados na comparação alélica com os seus devidos genitores (Tabela 3). Muitas famílias apresentaram proporções genóticas muito próximas e iguais aos modelos esperados pelo cruzamento do macho e da fêmea, sendo este último caso evidenciado quando a prole e os parentais são homozigotos. Constatação esta verificada pela maioria das famílias genotipadas não apresentarem diferença significativa no teste do qui-quadrado (Tabela 3).

No entanto, o comportamento geral de cada loco nas famílias apresentou distorção na distribuição de genótipos em relação a proporção mendeliana esperada (Tabela 3). Esta evidência foi indicada pelos valores do qui-quadrado, os quais apresentaram diferença

significativa da proporção genotípica da prole com os parentais (Tabela 3). Esta evidência pode ser explicada pelas incoerências apresentadas na segregação de genotípica da prole em relação ao modelo de segregação esperada.

Com exceção dos loci CNM-MG437, CNM-MG421 e PVAN1003, todos os marcadores apresentaram dentro de algumas famílias genótipos de indivíduos que não correspondem aos cruzamentos dos seus respectivos genitores: **Conjunto 1** para o loco TUMXLV5.27 (famílias C, E, G e J), loco TUMXLV5.38 (famílias C e E); **Conjunto 2** para o loco TUMXLV8.256 (famílias B, C, G e J), loco PVAN0013 (famílias B e E); **Conjunto 3** para o loco CNM-MG384 (famílias C, D, G, I), sendo que neste loco a família C apresentou cinco alelos diferentes, fugindo das leis de segregação mendeliana (Tabela 3). Este último caso pode estar correlacionado com erro de genotipagem ou com inconsistência do marcador CNM-MG384, pois a amplificação deste loco em PCR comum não houve alelos correspondentes aos gerados por multiplex. Portanto, juntamente com os outros loci, acabou contribuindo também para as distorções apresentadas na distribuição de genótipos observados na prole em relação ao esperado.

Tabela 2 – Conjunto de painéis multiplex com concentração de *primers* para cada marcador e marcação fluorescente

Multiplex	Concentração do primer F/R (μM)	Concentração da cauda M13(-21) (μM)	Cor	Temperatura de anelamento ($^{\circ}\text{C}$)
<i>Conjunto 1</i>				
CNM-MG437	2,94/3	0,06	PET (vermelho)	56
TUMXL5.27	2,94/3	0,06	PET (vermelho)	56
TUMXL5.38	2,94/3	0,06	PET (vermelho)	56
<i>Conjunto 2</i>				
TUMXL8.256	2,94/3	0,06	HEX (verde)	56
TUMXL8.32	2,94/3	0,06	HEX (verde)	56
PVAN0013	2,94/3	0,06	HEX (verde)	56
<i>Conjunto 3</i>				
CNM-MG421	2,94/3	0,06	NED (amarelo)	56
PVAN1003	2,94/3	0,06	NED (amarelo)	56
CNM-MG384	2,94/3	0,06	NED (amarelo)	56

Tabela 3 – Frequência genotípica entre oito famílias de *Litopenaeus vannamei* de irmãos completos e valores de X^2 para proporções de segregação mendeliana esperada

Conjunto	Loco	Família	Genótipos		Modelo	n	X^2	
			Parental					Progênie
			Macho	Fêmea				
1	CNM-MG 437	A	151/151	151/151	151/151 (10)	1	10	0
		B	151/151	151/151	151/151 (10)	1	10	0
		C	148/151	151/151	151/151 (5) 148/151 (5)	1:1	10	0
		D	151/151	151/151	151/151(10)	1	10	0
		E	151/151	151/151	151/151 (10)	1	10	0
		G	151/151	151/153	151/151(9) 151/153 (1)	1:1	10	6,40*
		I	148/151	151/151	151/151 (3) 148/151 (7)	1:1	10	1,60
		J	151/151	151/151	151/151 (10)	1	10	0

	TUMXLV5.27	A	190/194	192/198	194/198 (4) 190/198 (4) 190/192 (2) 192/194 (0)	1:1:1:1	10	4,40
		B	192/192	188/192	192/192 (4) 188/192 (6)	1:1	10	0,40
		C	192/192	188/194	188/192 (3) 192/194 (4) 186/184 (1) [†] 184/192 (1) [†] 184/186 (1) [†]	1:1	10	0,14
		D	190/192	184/190	190/192 (6) 184/190 (3) 190/190 (1) 184/192 (0)	1:1:1:1	10	8,40*
		E	192/195	192/199	195/199 (2) 192/194 (4) 199/194 (0) 192/199 (0) 192/192 (2) [†] 192/195 (1) [†] 186/192 (1) [†]	1:1:1:1	10	5,00
		G	190/199	192/192	192/199 (4) 190/192 (4) 192/195 (1) [†]	1:1	9	0,00
		I	190/192	186/190	186/192 (2) 186/190 (3) 190/192 (5) 190/190 (0)	1:1:1:1	10	5,20
		J	188/190	192/192	188/192 (4) 190/192 (5) 196/196 (1) [†]	1:1	10	0,11
	TUMXLV 5.38	A	229/229	226/226	226/229 (8)	1	8	0
		B	224/226	226/230	226/226 (3) 224/226 (3) 226/230 (4) 224/230 (0)	1:1:1:1	10	4
		C	218/234	218/227	218/227 (2) 218/234 (3) 218/218 (1) 227/234 (0) 227/227 (1) [†] 222/225 (2) [†]	1:1:1:1	9	3,33
		D	222/229	226/226	226/229 (4) 222/226 (6)	1:1	10	0,40
		E	224/236	224/224	224/236 (4) 224/224 (4) 228/228 (1) [†]	1:1	9	0

		G	237/227	221/227	221/227 (2) 221/237 (5) 227/237 (0) 227/227 (2)	1:1:1:1	9	5,67	
		I	227/237	227/227	227/237(4) 227/227 (5)	1:1	9	0,11	
		J	222/222	222/222	222/222 (9)	1	9	0	
2	TUMXLV8.256	A	175/199	169/169	169/175 (2) 169/199 (8)	1:1	10	3,60	
		B	169/174	169/174	174/174 (5) 169/169 (3) 169/174 (0) 167/167 (1) †	1:2:1	9	9,00*	
		C	169/175	169/175	169/169 (6) 169/175 (1) 175/175 (1) 175/178 (1) † 180/180 (1) †	1:2:1	10	10,75*	
		D	169/172	169/169	169/172 (4) 169/169 (6)	1:1	10	0,40	
		E	169/172	169/172	169/172 (4) 169/169 (5) 172/172 (1) †	1:2:1	10	1,80	
		G	166/169	166/169	169/169 (3) 166/169 (1) 166/166 (5) 172/172 (1)	1:2:1	10	6,33*	
		I	166/166	166/166	166/166 (10)	1	10	0	
		J	169/172	169/172	172/172 (2) 169/172 (1) 169/169 (6) 169/175 (1) †	1:2:1	10	9,00*	
		TUMXLV8.32	A	239/239	236/236	236/239 (10)	1	10	0
			B	236/236	236/236	236/236 (10)	1	10	0
			C	236/238	236/238	238/238 (4) 236/238 (1) 236/236 (5)	1:2:1	10	1,80
	D		NULO	236/238	236/236 (5) 236/238 (0) 238/238 (5)	1:2:1	10	10,00*	

		E	234/234	234/234	234/234 (7) 238/238 (2) [†] 236/236 (1) [†]	1	10	0
		G	234/236	234/236	234/234 (1) 234/236 (2) 236/236 (7)	1:2:1	10	10,80*
		I	236/236	230/236	230/230 (0) 230/236 (6) 236/236 (4)	1:2:1	10	3,60
		J	NULO	234/236	234/234 (5) 234/236 (0) 236/236 (5)	1:2:1	10	10,00
	PVAN0013	A	291/291	291/291	291/291 (10)	1	10	0
		B	287/297	287/297	297/297 (4) 287/297 (3) 287/297 (0) 285/285 (3) [†]	1:2:1	10	7,29
		C	297/297	297/297	297/297 (9)	1	9	0
		D	295/297	297/297	297/297 (6) 295/297 (4)	1:1	10	0,40
		E	285/291	285/291	285/291 (1) 285/285 (1) 291/291(0) 297/297 (7) [†]	1:2:1	9	2,00
		G	NULO	295/297	297/297 (5) 295/297 (0) 295/295(5)	1:2:1	5	10,00*
		I	291/297	291/297	291/291 (3) 291/297 (4) 287/287 (3)	1:2:1	10	0,40
		J	297/297	297/297	297/297 (10)	1	10	0
	3	CNM-MG 421	A	157/157	157/157	157/157 (10)	1	10
B			157/157	157/159	157/159 (6) 157/157 (4)	1:1	10	0,40
C			157/157	157/159	157/157 (4) 157/159(6)	1:1	10	0,40

		D	157/159	157/157	157/159 (8) 157/157 (2)	1:1	10	3,60
		E	244/246	244/246	244/244 (4) 244/246 (4) 246/246 (1)	1:2:1	9	2
		G	157/157	157/157	157/157 (10)	1	10	0
		I	157/159	157/157	157/157 (2) 157/159 (8)	1:1	10	3,60
		J	151/151	151/151	151/151 (10)	1	10	0
	PVAN1003	A	165/165	165/165	165/165 (10)	1	10	0
		B	163/165	163/165	165/165 (5) 163/165 (4) 163/163 (1)	1:2:1	10	3,60
		C	165/165	163/163	163/165 (9)	1	9	0
		D	165/165	163/163	163/165 (10)	1	10	0
		E	163/167	165/167	163/165 (6) 167/167 (4) 165/167 (0) 163/167 (0)	1:1:1:1	10	10,80*
		G	165/165	165/167	165/167 (8) 165/165 (2)	1:1	10	3,60
		I	165/165	163/163	163/165 (10)	1	10	0
		J	163/165	163/163	163/163 (2) 163/165 (8)	1:1	10	3,60
	CNM-MG384	A	248/248	248/248	248/248 (10)	1	10	0
		B	242/252	252/255	252/252 (4) 242/255 (3) 242/252 (2) 252/255 (0)	1:1:1:1	9	3,89
C		244/246	244/246	244/244 (3) 244/254 (2) 244/246 (0) 252/252 (3) † 246/246 (2)	1:2:1	10	5,40	

	D	246/250	243/250	250/250 (3) 243/250 (2) 246/250 (1) 243/246 (0) 239/239 (1) † 239/246 (2)	1:1:1:1	9	3,33
	E	244/246	244/246	244/244 (4) 244/246 (4) 246/246 (1)	1:2:1	9	2,11
	G	236/248	248/248	248/248 (1) 236/248 (2) 236/256 (2) † 250/250 (2) † 256/256 (2) †	1:2:1	9	0,33
	I	254/254	242/252	242/254 (4) 252/254 (1) 242/252 (0) 254/254 (0) 246/246 (3) †	1:1:1:1:1	8	8,60*
	J	256/256	254/256	254/256 (2) 256/256 (6)	1:1	8	2,00

P<0,05

† Indivíduos que apresentaram genótipos diferentes da prole resultante do cruzamento dos pais.

4. DISCUSSÃO

Este presente trabalho culminou no desenvolvimento de painéis multiplex de marcadores de microssatélites, seguidos pelo processo de validação desta ferramenta através da aplicação de parentesco de famílias cultivadas de *Litopenaeus vannamei*.

A importância do planejamento de um painel multiplex é primordial para um bom desempenho na sua aplicação. A precaução de seleção de marcadores que não apresentassem sobreposição de amplicons, temperatura de anelamento em comum, mesma performance em uma PCR comum e em um sistema multiplex sem formação de dímeros e a fidelidade na classificação alélica foram medidas fundamentais para o processo de formação dos três conjuntos de marcadores dos quinze loci estudados para o desenvolvimento de painéis multiplex. Estes processos básicos são comuns em trabalhos que envolvem a aplicação do sistema multiplex, como foi mostrado por Sint *et al.*, 2012 ao aplicar este sistema na investigação de interações alimentares em uma comunidade de artrópodes, como também, na variabilidade genética mostrado por Hamoy e Santos, 2012 para o tambaqui *Colossoma macropomum*, Hamoy *et al.*, 2008 para o pirarucu *Arapima gigas* e Li *et al.*, 2007 para o camarão tigre asiático *Pennaeus monodon*.

A melhor definição dos picos alélicos não seguiu as proporções mencionadas em Schuelke, 2000 em seu estudo na implementação do método de marcação com a cauda M13 fluorescente nos fragmentos de PCR. O autor propôs a quantidade de $\frac{1}{4}$ da sequência *foward* em relação a sequência *reverse* e a mesma concentração com a sonda M13. Neste estudo, o melhor resultado foi revelado com a proporção de $\frac{1}{4}$ da sonda M13 em relação a sequência *reverse*, para a complementação da sequência *foward*. Estas concentrações testadas permitiram uma melhor definição dos amplicons como também, uma intensidade de brilho suficiente para a definição dos picos alélicos. Testes de otimização de PCR e sensibilidade dos primers em um sistema multiplex e incorporação de sondas fluorescentes, como a cauda M13 foram usados nos estudos promovidos por Sint *et al.*, 2012; Diniz *et al.*, 2005 e Boutin-Ganache *et al.*, 2001).

Apesar da ocorrência de alelos nulos para o **Conjunto 2** não apresentar um padrão consistente para todas as famílias estudadas, como também foi relatado por Maggioni *et al.*, 2013, utilizando os marcadores TUMXLv5.27, TUMXLv5.38, TUMXLv8.2, TUMXLv8.32, TUMXLv8.183, TUMXLv8.256, Pvan1003, Pvan0013, Pvan1758 e Pvan1815 para planteis cultivados *Litopennaeus vannamei*. Este fato levou a darmos continuidade na pesquisa para este conjunto de marcadores. Então, inferimos ao pai ser o portador do alelo nulo devido ao genótipo da mãe ser conhecido.

Acreditamos que a não conformidade da segregação mendeliana oriunda da prole em relação aos pais confirmada pelo teste do qui-quadrado em todos os loci, pode ter sido atribuída além da presença de alelos nulos, erros de marcação de amostras durante a coleta, como também, o número de indivíduos amostrados por família (10) que pode ter favorecido alguns genótipos.

A ocorrência de genótipos da prole que não foi esperada pelo cruzamento dos genitores de cada família, não foi restrita apenas nesta pesquisa. Resultados mostraram que em Jerry *et al.*, 2004 em seu estudo com *Penaeus japonicus* este fato foi atribuído aos erros de genotipagem, do que a ocorrência de uma mutação na linhagem maternal, pois uma fêmea peneídeo pode produzir milhares de descendentes em uma única desova e para garantir sucesso na fecundação recorre-se ao processo de inseminação artificial que pode proporcionar o recebimento de mais de um espermatóforo para cada fêmea. Fato este sendo mais provável de ocorrência. Por isso, pode proporcionar o aparecimento de alelos pertencentes a mais de um pai. Além disso, Valles-Jimenez *et al.*, 2005 afirmaram que os marcadores de microssatélites para camarões peneídeos podem muitas vezes serem difíceis para classificar, validar e observar frequentemente a presença de alelos nulos.

O comportamento dos marcadores selecionados para o sistema multiplex e a sua validação genotípica através das relações de parentesco revelou que nem todos os marcadores utilizados neste estudo foram suficientemente informativos na proporção de genótipos da prole aos seus respectivos parentais. Situação parecida foi encontrada por Jerry *et al.*, 2006 que encontraram dificuldades de amplificação, definição de alelos, probabilidade de alelos nulos para muitos loci na utilização de microssatélites em estudos de análise de ascendência para o *Penaeus japonicus*. Portanto, para uma melhor análise de segregação de alelos da prole em relação aos seus genitores, seria necessário um maior número de marcadores a serem estudados para a aplicação deste estudo.

REFERÊNCIAS

- BENZIE, J. A. H. Population genetic structure in penaeid prawns. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 1, p. 95–119, 2000.
- BOUDRY, P., COLLET, B., CORNETTE, F., HERVOUET, V., BONHOMME, F. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. **Aquaculture**, v. 204, p.283–296, 2002.
- BOUTIN-GANACHE, I.; RAPOSO, M.; RAYMOND, M.; DESCHEPPER, C. F. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. **Biotechniques**, v.31, p.24-28, 2001.
- CHAMBERLAIN, J.S., R.A. GIBBS, J.E. RANIER AND C.T. CASKEY. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy, p. 272-281. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.), PCR Proto- cols. A Guide to Methods and Applications. **Academic Press**, San Diego, 1990.
- CHISTIAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 1–29, 2006.
- CRUZ, P.; MEJIA-RUIZ, C. H.; PEREZ-ENRIQUEZ, R.; IBARRA, A. M. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Molecular Ecology Notes**. v.2, p. 239–241, 2002.
- DINIZ, F. M. et al. Microsatellites in the overexploited spiny lobster, *Panulirus argus*: Isolation, characterization of loci and potential for intraspecific variability studies. **Conservation Genetics**, v. 6, n. 4, p. 637–641, 2005.
- DINIZ, F. M. *et al.* Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. v. 384, p. 380–384, 2007.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 1996. Essex Longman Group Ltd.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, p.230, 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, p.243, 2014.
- GARCIA, D.K.; ALCIVAR-WARREN, A. Identification and organization of microsatellites in *Penaeus vannamei* shrimp. In: **Proceedings of the XXVth International Conference on Animal Genetics**, 1996, Tours, France. Abstract C061, 113.
- GARCIA, D.K.; DHAR, A.K.; ALCIVAR-WARREN, A. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**. v. 5, p.71-83, 1996.

- HAMOY, I. G.; SANTOS, E. J. M.; SANTOS, S. E. B. Rapid and inexpensive analysis of genetic variability in *Arapaima gigas* by PCR multiplex panel of eight microsatellites. **Genetics and molecular research : GMR**, v.7, n. 1, p. 29–32, 2008.
- HAMOY, I. G.; SANTOS, S. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the tambaqui, *Colossoma macropomum*, developed as a tool for use in conservation and broodstock management. **Genetics and molecular research : GMR**, v.11, n.1, p.141–6, 2012.
- HARA, M., SEKINO, M. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. **Aquaculture**, v.217, n.1-4, p.107–114, 2003.
- HAUSWALDT, J. S.; GLENN, T. C. Microsatellite DNA loci from the Diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). **Molecular Ecology Notes**, v.3 , n. 2, p. 174–176, 2003.
- HENEGARIU, O., HEEREMA, N.A., DLOUHY, S.R., VANCE, G. H., VOGT, P. H. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **BioTechniques**, v.23, p.504–511, 1997.
- HOLLELEY, C. E.; GEERTS, P. G. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. **BioTechniques**, v.46, n.7, p.511-517, 2009.
- JERRY, D. R.; PRESTON, N. P.; CROCOS, P. J.; KEYS, S.; MEADOWS, J. R.; LI, Y. Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate). **Aquaculture**, v.235, n.1-4, p.237–247, 2004.
- JERRY, D. R.; PRESTON, N. P.; CROCOS, P. J.; KEYS, S.; MEADOWS, J. R. S.; LI, Y. Application of DNA parentage analyses for determining relative growth rates of *Penaeus japonicus* families reared in commercial ponds. **Aquaculture**, v.254, n.1-4, p.171–181, 2006.
- LI, Y. *et al.* Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. **Aquaculture**, v. 266, n. 1-4, p. 279–288, 2007.
- LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, n. 1-4, p. 1–37, 2004.
- LUVESUTO, E.; MANOEL, P.; JUNIOR, G. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. v. 1160, n.4, p. 1156–1160, 2007.
- MAGGIONI, R. *et al.* Genetic variability of marine shrimp in the Brazilian industry. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 968–974, 2013.
- MEEHAN, D. *et al.* High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea:Decapoda]. **Marine biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 311–30, 2003.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, 2010. Brasília, 2012.

- MONTALDO, H. H. *et al.* Evaluation of genetic variability loss in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 4, 2013.
- MOUSSEAU, T.A., RITLAND, K., HEATH, D.D. A novel method for estimating heritability using molecular markers. **Heredity**, v.80, p.218–224, 1998.
- NEILAN, B. A.; WILTON, A. N.; JACOBS, D. A universal procedure for primer labelling of amplicons. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 14, p.2938-2939, 1997.
- PÉREZ, F. *et al.* Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus biridy*. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v.7, n.5, p. 554–69, 2005.
- SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, 1989.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments: A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. **Nature America**, v.18, n. February, p. 1–2, 2000.
- SINT, D.; RASO, L.; TRAUOGOTT, M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. **Methods in ecology and evolution / British Ecological Society**, v.3, n.5, p. 898–905, 2012.
- TARIS, N., BARON, S., SHARBEL, T., SAUVAGE, C., BOUDRY, P. A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture Research**, v.36, p.516–518, 2005.
- VALLES-JIMENEZ, R.; CRUZ, P.; PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. **Marine Biotechnology**, v.6, n.5, p. 475–84, 2005.
- VALLONE, P.M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **BioTechniques**, v.37,n.2, p.226-231, 2004.
- VANDEPUTTE, M., DUPONT-NIVET, M., CHATAIN, B., CHEVASSUS, B. Setting up a strain-testing design for the seabass, *Dicentrarchus labrax*: a simulation study. **Aquaculture**, v.202, n.3-4, p.329–342, 2001.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P.F Micro-Checker User Guide. **University of Hull**, 2005.
- WOLFUS, G. M.; GARCIA, D. K.; ALCIVAR-WARREN, A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. **Aquaculture**, v. 152, n. 1-4, p.35–47, 1997.

YU, K.; HAFFNER, M.; POYSA, V. Tailed primer base excision sequence scanning (TP-BESS) for detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs). **Plant Molecular Biological Reporter**. v.19, n.49-54, 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

Os marcadores do tipo microssatélites revelaram ser capazes de analisar o quadro da distribuição da variabilidade genética, da identificação sexual e parental das principais espécies cultivadas no Ceará.

Os planteis estudados de tilápia do Nilo apresentaram altos níveis de endogamia, corroborando com o histórico de formação dos mesmos. Na identificação sexual, o loco *UNH104* nos leva a considerar que a presença do alelo 132 no estado homozigótico 132/132 identifica o sexo masculino, justificando seu efeito aditivo.

A marcação de fragmentos gerados por *primers* para o camarão branco do Pacífico junto ao sistema de PCR multiplex mostrou ser uma técnica eficaz e de bom desempenho. Entretanto, os marcadores utilizados para a associação parental não apresentaram uniformidade nos dados obtidos, apesar destes já pertencerem a literatura. Por isso, há necessidade de formação de novos conjuntos de marcadores.