



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA**

DÁRCIA GABRIELA BORCEM DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES: PAINEL
DE PRIMERS PARA *Leiarius marmoratus* ATRAVÉS DE SEQUENCIAMENTO
DE PRÓXIMA GERAÇÃO**

BELÉM

2024

DÁRCIA GABRIELA BORCEM DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES: PAINEL
DE PRIMERS PARA *Leiarius marmoratus* ATRAVÉS DE SEQUENCIAMENTO
DE PRÓXIMA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal Rural da
Amazônia, como parte das
exigências do curso de mestrado em
Biotecnologia Aplicada à
Agropecuária: área de concentração
em Biotecnologia, para a obtenção
do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marília
Danyelle Nunes Rodrigues.

BELÉM

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D111d Da Costa, Dárcia Gabriela Borcem
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATELÍTES: PAINEL DE
PRIMERS
PARA *Leizorius marmoratus* ATRAVÉS DE SEQUENCIAMENTO DE PRÓXIMA
GERAÇÃO / Dárcia Gabriela Borcem Da Costa. - 2024.
48 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Biotecnologia Aplicada
à Agropecuária (PPGBAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural
Da Amazônia, Belém, 2024.

Orientador: Profa. Dra. Marília Danyelle Nunes Rodrigues

1. Bagre. 2. Microsatélites. 3. Genoma. 4. Sequenciamento. 5. Primers. I.
Rodrigues, Marília Danyelle Nunes, *orient.* II. Título

CDD 660.6

DÁRCIA GABRIELA BORCEM DA COSTA

DESENVOLVIMENTO E MARCADORES MICROSATÉLITES: PAINEL
DE PRIMERS PARA *Leiarius marmoratus* ATRAVÉS DE
SEQUENCIAMENTO DE PRÓXIMA GERAÇÃO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, para obtenção de título de
mestre.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Marília
Danyelle Nunes Rodrigues.


05/04/2024

Data de Aprovação

BANCA EXAMINADORA:



Orientadora – Prof.^a Dra. Marília Danyelle Nunes Rodrigues
(ISARH – UFRA)



Membro 1 – Prof.^a Dra. Regianne Maciel dos Santos Correa
(ISARH – UFRA)



Membro 2 – Prof. Dr. Oscar Victor Cadenas Alegria
(Universidade Federal do Pará)



Membro 3 - Prof. Dr. Fabio Carneiro Sterzeleck

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por todas as bênçãos, por ter me permitido chegar até esta etapa, por todos os aprendizados vividos no dia a dia, por me fortalecer nos momentos de fraqueza durante minha caminhada acadêmica, por ter me encorajado quando achei que não era capaz, a você Deus todo meu amor.

Agradeço a minha família, por todo o suporte ao longo de minha jornada, por acreditarem no meu potencial desde a infância. Aos meus pais, por me proporcionarem uma boa educação, com valores e princípios que valorizo tanto, obrigada por todo suporte emocional e cada oração durante esses dois anos, mãe, pai, meus irmãos, essa conquista é nossa. Amo vocês.

Toda minha gratidão à prof.^a Dra. Marília Danyelle, por acreditar em mim e no desenvolvimento desse projeto, por toda paciência e dedicação do seu tempo, foi muito satisfatório ter trabalhado e aprendido muito com você, grata por todos os ensinamentos.

A equipe do LGA (Laboratório de genética aplicada), laboratório do prof.^o Igor, grata por todas as contribuições no desenvolvimento do projeto. Aos alunos do grupo de pesquisa da prof.^a Marília, especialmente Dara, Kaio e Dra. Regiane que contribuíram muito, e me auxiliaram no desenvolvimento e escrita do projeto, obrigada pelo conhecimento compartilhado.

Agradeço também ao Prof.^o Dr. Marcus Braga por seus ensinamentos de bioinformática, essenciais na construção do projeto. Meu muito obrigada ao laboratório de engenharia genética da UFPA, ao doutorando Karlos, grata pelos treinamentos, ideias, a doação do seu tempo foi essencial, grata pela ajuda e por compartilhar seu conhecimento.

Também gostaria de demonstrar minha gratidão ao meu namorado Arlem Santos, que compartilhou e caminhou comigo nessa trajetória, segurou minha mão nos momentos difíceis e me motivou, obrigada por tudo. Amo você. Gratidão também a minha amiga Adria Diva, que caminhou comigo durante o desenvolvimento desse projeto, dividindo a orientadora, ideias e conhecimento, você tem uma força incrível.

Obrigada à minha turma de mestrado, pela bonita caminhada que compartilhamos durante esses dois anos, cada um com suas histórias, vocês serão inesquecíveis. Meu agradecimento a secretaria e coordenação do PPGBA, Val, Prof.^o Leonardo e Lene, obrigada por todo suporte, carinho e paciência em sanarem todas as dúvidas nesse período.

*À minha família, e aos amigos.
Aos que me ajudaram a levantar nos momentos que caí e
Estenderam a mão para que continuasse de pé.*

RESUMO

A *Leiarius marmoratus*, denominada popularmente como “jundiá-da-amazônia”, apresenta grande potencial aquícola em programas de melhoramento genético para aumento de desempenho zootécnico relacionado ao vigor híbrido. Estações de piscicultura têm explorado comercialmente o híbrido “pintado-da-amazônia” obtido pelo cruzamento fêmea *Pseudoplatystoma punctifer* x macho *Leiarius marmoratus*. Desse modo, investigações genômicas são cruciais para maior exploração de *L. marmoratus* para desenvolvimento de pacotes tecnológicos. Assim, objetivou-se desenvolver marcadores microssatélites e desenho de *primers* para *L. marmoratus* como ferramenta para estudos populacionais e de melhoramento genético. Inicialmente, amostra de DNA de alto peso molecular foi submetida ao sequenciamento de nova geração pela plataforma Illumina, utilizando o sistema HiSeq™. O produto do sequenciamento foi avaliado pelo programa FastQC, a filtragem de dados foi realizada para controle de qualidade utilizando o trimommetc. A montagem de novo do genoma realizada nos programas SOAPdenovo2 e SPADES, cuja qualidade dos produtos gerados foi verificada pelo programa QUAST. Para identificação dos marcadores microssatélites, foi utilizado o software MISA e o software EasySSR, por fim foi utilizado o BatchPrimer3 para o desenho de *primers* com os parâmetros *deflow* do programa. Diante disso, foi obtido uma montagem com 225.027 *contigs*, um total de 221.273 motivos de SSRS identificados pelo MISA, com maior frequência de pentanucleotídeos, se diferenciando do programa EasySSR que obteve 145.601 microssatélites, com predominância de dinucleotídeos, obtendo também 590 pares *primers* bem-sucedidos. Comprovando a excelente utilidade de metodologias moleculares, para a obtenção de ferramentas biotecnológicas como os SSRs, contribuindo em estudos de genética de populações, no controle da variabilidade genética, mapeamento, análise genômica e comparativa.

Palavras-Chave: Bagre; Microssatélites; Genoma; Sequenciamento; *Primers*.

ABSTRACT

Leiarius marmoratus, popularly known as “Amazon jundiá”, has great aquaculture potential in genetic improvement programs to increase zootechnical performance related to hybrid vigor. Fish farming stations have commercially exploited the hybrid “pintado-da-amazonia” obtained by crossing female *Pseudoplatystoma punctifer* x male *Leiarius marmoratus*. Therefore, genomic investigations are crucial for further exploration of *L. marmoratus* for the development of technological packages. Thus, the objective was to develop microsatellite markers and design primers for *L. marmoratus* as a tool for population studies and genetic improvement. Initially, a high molecular weight DNA sample was submitted to next generation sequencing by the Illumina platform, using the HiSeq™ system. The sequencing product was evaluated by the FastQC program, data filtering was performed for quality control using trimmomatic. The de novo assembly of the genome was carried out in the SOAPdenovo2 and SPAdes programs, the quality of the products generated was verified by the QUAST program. To identify the microsatellite markers, the MISA software and the EasySSR software were used; finally, BatchPrimer3 was used to design primers with the program's flow parameters. Therefore, an assembly with 225,027 contigs was obtained, a total of 221,273 SSR motifs identified by MISA, with a higher frequency of pentanucleotides, differentiating from the EasySSR program which obtained 145,601 microsatellites, with a predominance of dinucleotides, also obtaining 590 successful primer pairs. Proving the excellent usefulness of molecular methodologies for obtaining biotechnological tools such as SSRs, contributing to population genetic studies, controlling genetic variability, mapping, genomic and comparative analysis.

Keywords: Catfish; Microsatellites; Genome; Sequencing; Primers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - “Jundiá-da-amazônia” (<i>Leiarius marmoratus</i>)	14
Figura 2 - “Pintado- da- Amazônia” (<i>Pseudoplatystoma cooruscans</i>).....	15
Figura 3 - Taxonomia e características do Jundiá (<i>Leiarius marmoratus</i>).....	18
Figura 4 - Jundiá-da- Amazônia.....	19
Figura 5 - Estimativa aproximada do número de artigos utilizando marcadores moleculares nos últimos cinco anos.....	26
Figura 6 - Classificação de microssatélites por repetição de nucleotídeos.....	27
Figura 7 - Classificação de arranjo de microssatélites.....	28
Figura 8 - Total de motivos de microssatélites encontrados em <i>Leiarius marmoratus</i> pelo programa MISA.....	34
Figura 9 - Distribuição da frequência de SSRs no genoma de <i>Leiarius marmoratus</i>	35
Figura 10 - Tipos de marcadores microssatélites identificados no genoma de <i>Leiarius marmoratus</i> pelo programa EasySSR.....	36
Figura 11 - Distribuição da frequência de SSR no genoma de <i>Leiarius marmoratus</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exportações brasileiras da piscicultura por espécie, primeiro trimestre de 2022 (em US\$ e em toneladas)	21
Tabela 2 - Importações brasileiras de peixes de cultivo por espécie, primeiro trimestre 2022 (em US\$ mil e em toneladas)	22
Tabela 3 - Microsatélites identificados no genoma da espécie <i>Leiarius marmoratus</i>	34
Tabela 4 - Parâmetros de microsatélites identificados no genoma de <i>Leiarius marmoratus</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	Polymerase Chain Reaction
NGS	Next Geration Sequencing
RAG2	Recombination activating gene 2
GLOB	β -Globina
pH	Potencial Hidrogênico
PEIXE BR	Associação Brasileira de Piscicultura
DNA	Ácido Ribonucleico
Pb	Pares de base
dNTP	Desoxirribonucleotideos fosfato
BGI	Beijing Genomics Institute
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RAPD	Random Amplified Polymorphic
SCAR	Sequence Characterized Amplified Regions
STS	Sequence Tagged Sites
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
<i>L. marmoratus</i>	<i>Leiarius marmoratus</i>
UFRA	Universidade Federal Rural da Amazônia
PA	Pará
RS	Rio Grande do Sul
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
IMEx	Imperfect microsatellite extractor

LISTA DE SÍMBOLOS

Kg	Quilograma (s)
Cm	Centímetro (s)
pH	Potencial Hidrogênico
°C	Grau (s) Celsius
β	Beta
%	Porcentagem
US\$	Dolar
°	Grau (s)
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
μL	Microlitro (s)
=	Igual
≥	Maior ou igual

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Biologia da espécie.....	18
3.2 Importância econômica da espécie.....	20
3.3 Biotecnologia Aplicada a espécie.....	22
3.4 Sequenciamento de próxima geração (NGS)	22
3.5 Marcadores moleculares	24
3.5.1 Marcadores microssatélites	26
3.6 Genética de populações e sua importância para espécies amazônicas	27
3.7 Estratégia de melhoramento genético.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Aspectos éticos	30
4.2 Extração do DNA e sequenciamento na plataforma Illumina	30
4.3 Pré-processamento de short reads e montagem de novo	30
4.4 Mineração de SSRs, desenho de primers e PCR in silico	31
5 RESULTADOS	32
5.1 NGS e Montagem de novo	32
5.2 Identificação de marcadores microssatélites	32
5.2.1 Programa MISA	32
5.2.2 Programa EasySSR.....	34
5.3 Primers e PCR in silico	35
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO	40
7 REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A ictiofauna possui relevância para a manutenção do equilíbrio ambiental e para produção de alimentos a nível global, representando considerável parcela da alimentação mundial, principalmente em função das propriedades nutricionais de sua carne (JACYNTHO et al., 2021). A piscicultura no Brasil apresenta tendência de crescimento, cuja estimativa de produção terá aumento de 204 milhões de toneladas até 2030, o que representa 15% a mais em relação aos anos anteriores (FAO, 2021).

O “jundiá-da-amazônia” (*Leiarius marmoratus*) (figura 1), é uma espécie nativa de Bagre de água doce que possui elevado potencial de produção, é endêmica nas Bacias dos Rios Amazonas, Orinoco e Essenquibo (LASSO et al., 2011). Além disso, a espécie possui grande potencial na piscicultura para a produção de espécies de peixes híbridos, como o “pintado-da-amazônia” (*Pseudoplatystoma corruscans*) (figura 2) (KNABA et al., 2017).

Figura 1 – “Jundiá-da-amazônia” (*Leiarius marmoratus*).



Fonte: ALMEIDA, 2014.

Figura 2 - “Pintado- da- Amazônia” (*Pseudoplatystoma cooruscans*)



Fonte: ALMEIDA, 2014

Com o surgimento de tecnologias de biologia molecular, foi possível ampliar investigações a respeito de espécies não-modelo. Um exemplo dessas tecnologias é a *Polimerase Chain Reaction* (PCR), técnica de amplificação de DNA que é base para pesquisas de cunho genético como a detecção da variabilidade genômica, e possibilita o aumento de pesquisas e resultados no ramo da bioinformática (SHARMA et al., 2007).

Assim como a PCR, novas técnicas contribuíram para o desenvolvimento da biologia molecular, como técnicas para o sequenciamento rápido, preciso e de alto rendimento. O sequenciamento de nova geração (NGS), possibilita maior eficiência de sequenciamento a tempo reduzido e baixo, o que ampliou o desenvolvimento de ferramentas genéticas como os marcadores moleculares (YAMAUCHI, 2019).

Os marcadores microssatélites são marcadores moleculares muito utilizados em avaliações a nível populacional como análises de variabilidade genética e endogamia, sobre as quais pode-se atribuir maior eficiência a partir de estratégias utilizando programas computacionais para reconhecimento e caracterização genética de espécies híbridas ou não (MANTOVANI et al., 2022).

A espécie *Leiarius marmoratus*, escolhida para este estudo, atualmente não apresenta dados de pesquisa relacionados ao sequenciamento do seu genoma e marcadores moleculares, por ser uma espécie não modelo. Mantovani (2018) em seu estudo, caracterizou a variabilidade genética de *L. marmoratus* em estoque comercial, utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites, e encontrou que as populações analisadas de diferentes regiões, apresentaram uma baixa variabilidade genética; Hashimoto e colaboradores (2012) analisou a pureza de estoque de algumas espécies de pescados reprodutores cultivados em cativeiro no Estado do Tocantins, incluindo *L.*

marmoratus, utilizando os genes nucleares RAG2 e GLOB como marcadores nucleares, com a finalidade de identificar possíveis híbridos interespecífico e fornecer informações de boas práticas de manejo na sua produção.

Com este projeto busca-se desenvolver ferramentas biotecnológicas, como microssatélites e gerar dados genômicos da espécie, que poderão ser utilizados em programas de melhoramento em prol da sua produção, manejo, controle de reprodução, cultivo e preservação de *L. marmoratus*. Uma vez que sua análise genética é restrita a poucas informações, com ausência de marcadores moleculares a essa espécie, assim dificultando o desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento e cultivo, tanto em cativeiro quanto em seu habitat natural (PANDOLFI et al., 2020).

Desse modo, ferramentas moleculares como marcadores microssatélites agregam e auxiliam na exploração genética de espécies de peixe, contribuindo para a preservação, caracterização da espécie e melhoramento genético, sendo necessário atualização dessas ferramentas para realização de estudos mais eficazes e com melhores resultados para espécies não modelos, principalmente em espécies com características produtivas como a *Leiarius marmoratus* (LAYMAN, et al. 2005).

Assim, com utilização dessas metodologias moleculares e a identificação de microssatélites, será possível realizar o controle dessa espécie, preservando suas características e analisar sua variabilidade genética. Portanto, a presente pesquisa objetivou desenvolver marcadores microssatélites com seus respectivos primers para *Leiarius marmoratus* por meio do uso de sequenciamento de próxima geração.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver marcadores microssatélites para *L. marmoratus* com *primers* específicos para a espécie.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a montagem *de novo* do genoma de *L. marmoratus*;
- Buscar marcadores microssatélites no genoma de *L. marmoratus*;
- Desenvolver *primers* para marcadores microssatélites de *L. marmoratus*;
- Realizar PCR *in silico* para testar os microssatélites desenvolvidos para *L. marmoratus*;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biologia da espécie

A *Leiarius marmoratus* (GILL, 1870) de nomes populares no Brasil como “jundiá- da-amazônia” e “peixe-tigre”, foi classificada por Sciades Marmoratus Gill em 1870, sendo uma espécie de peixe da ordem siluriforme, pertencente a família pimelodidae (figura 3), migrador como outros bagres encontrados na Amazônia (LÓPEZ, 2014). Apresenta grande apreço comercial sendo explorada predominantemente por meio de extrativismo, mas com criação em cativeiro cada vez mais crescente (NAVARRO; PIVATO, 2016).

Figura 3 - Taxonomia e características do Jundiá (*Leiarius marmoratus*).

Taxonomia e características do Jundiá da Amazônia (Leiarius marmoratus)

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae

Gênero: *Leiarius*

Espécie: *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870)

Fonte: MANTOVANI, 2018.

Esta espécie é encontrada em parte da América do Sul, onde encontra-se distribuída principalmente nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco (RAMIREZ; MARTINEAZ, 1997). É caracterizada com uma coloração em marrom com manchas pretas, apresenta nadadeira caudal bifurcada, peso médio de 5Kg, e comprimento em torno de 60 cm (LASSO et al., 2011) (figura 4).

Figura 4 – *Leiarius marmoratus* (Jundiá-da- Amazônia).



Fonte: PORCELLI, 2015.

A espécie *L. marmoratus* é um peixe de água doce, também encontrada em tanques e reservatórios, onde o pH se apresenta de 5,8 a 7,2, com temperatura em torno de 25°C (CÁUPER, 2006). Em ambiente natural, apresenta hábito alimentar piscívoro, se alimentando de outros peixes, quando em cativeiro, apresenta hábito onívoro, e devido a esta característica, é muito utilizado na hibridização com espécies carnívoras, obtendo híbridos com baixa taxa de canibalismo, em sua fase larval (RAMIREZ; MARTINEZ, 1997; CAMPOS et al., 2006).

L. marmoratus é um excelente candidato ao cultivo em sistemas extensivos e semi-intensivos. No entanto, assim como diversas espécies de peixes nativos da América do Sul, a produção, o manejo e a comercialização ocorrem sem a devida rastreabilidade, controle reprodutivo e monitoramento, o que limita o desenvolvimento de criações racionais e a segurança alimentar do mercado consumidor no que tange ao conhecimento de origem do pescado, seja de populações nativas ou selvagens de *L. marmoratus* (MANTOVANI, 2022).

Assim como outros peixes da ordem siluriformes, a espécie *L. marmoratus* é conhecida como migradora, onde sofre influência de eventos meteorológicos, para o início da sua migração reprodutiva (LOPEZ, 2014). Estímulos exógenos como: níveis de concentração de sais dissolvidos na água, turbidez, níveis dos rios e chuvas, estão relacionados com o nível de hormônios sexuais (estradiol – 17 β e testosterona) que se apresentam em alto nível no período que antecede a desova desta espécie em ambiente natural (LUCAS; BARRAS et al., 2001).

Na reprodução em cativeiro, ocorre uma interrupção no seu ciclo de maturação gonadal, não atingindo os níveis adequados de hormônios no período de desova e na maturação final, precisando assim de indução hormonal (LÓPEZ, 2014). A diversidade genética presente na espécie, influencia no seu cultivo em cativeiro, auxiliando na adaptabilidade da espécie em diferentes ambientes (PANDOLFI, et al., 2020).

3.2 Importância econômica da espécie

A espécie *Leiarius marmoratus* apresenta um grande valor econômico, por influência de suas características que são favoráveis ao seu cultivo (LAYMAN, et al., 2005). Por apresentar uma grande variabilidade genética, possui excelente adaptação em ambiente natural e cativeiro, além de ser utilizado na criação de linhagem de híbridos, especialmente por apresentar uma boa aceitação de alimentos em ambientes fechados, e baixo índice de canibalismo, características que contribuem para o seu potencial para o cultivo extensivo. (ARAUJO, et al., 2014).

Apresenta excelentes características organolépticas, como sua carne branca, saborosa e com textura macia (MORA, 2003). A falta de controle reprodutivo e controle da sua variabilidade genética, pode comprometer sua produção, manejo, comercialização e toda a indústria pesqueira, que coloca em risco biológico, espécies em cultivo. Por isso, são necessárias ferramentas biotecnológicas, para o controle genético da espécie em cultivo (HASHIMOTO, 2012).

Algumas vezes, por sua aparência e podendo atingir tamanho diferenciado de outras espécies, o “peixe- tigre” também pode ser comercializado, e encontrado em aquários, porém, não com muita frequência. A *Leiarius marmoratus*, é uma espécie de Bagre menos popular e comercializada, quando comparada a outras espécies desta mesma família como a *Brachyplatystoma filamentosum* e *Brachyplatystoma vaillantii*, e apresentam importância econômica maior na indústria da piscicultura no Brasil (MATHEUS, et al., 2021). No entanto a produção voltada para os Bagres, vem ganhando cada vez mais espaço no mercado sul-americano, por possuírem uma textura agradável semelhante a pescados exóticos já conhecidos no mercado, além de apresentar um bom rendimento em posta e filé, após ser processada e passar pela indústria de beneficiamento (INOUE, et al., 2009).

De acordo com anuário publicado pelo PEIXE BR (Associação Brasileira de Piscicultura) em 2022, os Bagres, foram uma das espécies mais exportadas pelo Brasil,

com US\$ 14,352, representando um aumento de 63%, ficando somente atrás da Tilápia e Tambaqui (tabela 1).

Tabela 1– Exportações brasileiras da piscicultura por espécie, primeiro trimestre de 2022 (em US\$ e em toneladas).

Espécies	Unidade	1º trim	Participação (%)	Varição 1º trim 2022/2021 (%)
Tilápia	FOB US\$	6.864.317	97%	166%
	Toneladas	2.473	99%	80%
Tambaqui	FOB US\$	153.702	2%	-24%
	Toneladas	27	1%	-69%
Bagres	FOB US\$	14.352	0%	63%
	Toneladas	4	0%	59%
Surubins	FOB US\$	10.105	0%	165%
	Toneladas	3	0%	117%
Bejupirá	FOB US\$	9.706	0%	17%
	Toneladas	1	0%	-6%
Outros	FOB US\$	4.117	0%	-99%
	Toneladas	1	0%	-100%
Total	FOB US\$	7.056.299	100%	119%
	Toneladas	2.509	100%	46%

Em 2022, também foi publicado pela Associação Brasileira de Piscicultura, que os Bagres foram as espécies mais importadas pelo Brasil no ano (tabela 2). Só no primeiro trimestre de 2022, os Bagres ocuparam o segundo lugar, com US\$ 29 milhões, que representa um aumento de 36% comparado ao primeiro semestre de 2021.

Tabela 2- Importações brasileiras de peixes de cultivo por espécie, primeiro trimestre 2022 (em US\$ mil e em toneladas).

Categoria de produto	Unidade	1º trim	Participação (%)	Varição 1º trim 2022/2021 (%)
Salmões	FOB US\$	216.135.507	87%	66%
	Toneladas	25.945	70%	-1%
Bagres	FOB US\$	29.794.132	12%	36%
	Toneladas	10.246	28%	-3%
Curimatás	FOB US\$	1.072.211	0%	-33%
	Toneladas	715	2%	-35%
Trutas	FOB US\$	472.476	0%	-
	Toneladas	56	0%	-
Piaus	FOB US\$	98.047	0%	44%
	Toneladas	48	0%	18%
Esturjão	FOB US\$	13.418	0%	-11%
	Toneladas	0	0%	-77%
Traíra	FOB US\$	2.000	0%	98%
	Toneladas	1	0%	-99%
Total	FOB US\$	247.587.791	100%	61%
	Toneladas	37.011	100%	-3%

3.3 Biotecnologia Aplicada a espécie

Existem algumas pesquisas relacionadas a espécie *Leiarius marmoratus*, porém a quantidade de dados e informações genéticas e biológicas, ainda são insuficientes, para se ter um controle da linha dessa espécie (MANTOVANI, 2018). Estudos voltados para cultivo, reprodução e melhoramento genético do jundiá-da-Amazônia, são os mais populares encontrados na literatura. Desenvolvimento de protocolo para a reprodução de *L. marmoratus*, utilizando indução hormonal em cativeiro para programas de conservação, foi o objeto de estudo de López (2014), onde obteve-se resultados satisfatório para a utilização de parâmetros reprodutivos na produção da espécie em programas de conservação e controle.

A biotecnologia voltada para a reprodução de Jundiá amazônico, é muito utilizada e estudos para a sua reprodução em cativeiro, produção de híbridos, como pintado-da-Amazônia, diminuiu o intenso canibalismo na criação de larvas, para seu cultivo na piscicultura (RAMIREZ; MARTINEZ, 1997; CAMPOS et al., 2006).

3.4 Sequenciamento de próxima geração (NGS)

O sequenciamento NGS (*Next generation sequencing*), ou sequenciamento de próxima geração, também chamado de segunda geração, referem-se a um conjunto de metodologias para sequenciamento do DNA e RNA (FREITAS, 2021). Esta tecnologia tornou o sequenciamento de nucleotídeos, mais rápido, barato, e eficiente do que o sequenciamento Sanger, assim, revolucionou o estudo da genômica e da biologia molecular. A plataforma de sequenciamento NGS surgiu em 2005, devido ao crescente estímulo para a criação de novas tecnologias de sequenciamento mais vigorosos, após o início do programa de iniciativa a redução de gastos do sequenciamento do genoma humano (SILVA, 2018).

O NGS, diferente do método Sanger, que é uma tecnologia de sequenciamento de primeira geração, sequencia fragmentos curtos de DNA (reads) que costumam variar de 50 a 300 nucleotídeos de comprimento. Diferente de um sequenciador de eletroforese capilar, que consegue sequenciar no máximo 96 fragmentos por vez. Os sequenciadores

de nova geração realizam leituras de bilhões de fragmentos simultaneamente, podendo sequenciar genomas inteiros ou sequências específicas de interesse (FREITAS, 2021).

O avanço do sequenciamento de próxima geração, apresentou novos métodos e formas de sequenciamento que dependem da determinação da ordem das bases, alinhamento de sequências e montagem do genoma. Sua vantagem comparada a métodos anteriores na detecção de mutações, é apresentar a capacidade de sequenciamento de múltiplos genes de identificar milhões de variantes ao mesmo tempo, além de revolucionar a velocidade da genômica e alavancar estudos envolvendo mecanismos moleculares, descrevendo novos métodos de sequenciamento NGS, que engloba diversas plataformas de sequenciamento de segunda geração, abrindo espaço para a terceira e quarta geração (LOHMANN, 2014; PERVEZ, 2022).

O sequenciamento de próxima geração, NGS ou também chamado de sequenciamento de segunda geração inclui diversas plataformas populares, como Roche Life Sciences, Thermo Fisher Scientific, Illumina e Applied Biosystems, permitindo que bilhões de processos de sequenciamento ocorram simultaneamente. Quando comparadas a métodos de primeira geração, apresentam um alto rendimento e baixo custo, gerando leituras de 50 pb a 300 pb de comprimento. As plataformas NGS são classificadas em dois grupos de acordo com seus métodos de sequenciamento, por hibridização e sequenciamento por síntese (QUAIL, et al. 2012).

A Roche, foi a empresa que incorporou 454 Life Sciences, empresa responsável pelo desenvolvimento dos primeiros sequenciadores de segunda geração, liderada por Jonathan Rothburg (HEATHER, et al., 2016). Seu método baseia-se na detecção do pirofosfato, liberado durante a amplificação de sequências de DNA (BATISTA, 2023).

A Illumina é a mais popular das NGS, foi fundada em 1998 em San Diego, onde produz diversas plataformas de sequenciamento como, sequenciadores de bancadas e sequenciadores em escala de produção, tendo seu método baseado em sequenciamento por síntese. Seu sistema de reação é uma mistura de DNA polimerase, primers e 4 dNTP com marcadores fluorescentes específicos de base, os dados obtidos por este método de sequenciamento apresentam o mesmo comprimento, e as taxas médias de erro das plataformas são de 1- 1,5% (LAHENS, et al., 2017; CAO, et al., 2017).

A GenapSys, é uma plataforma de sequenciamento de segunda geração pertencente a empresa Stanford Genome Technology Center desenvolvida em meados de 2010, melhorando a técnica de sequenciamento por síntese, onde incorporou a detecção

térmica de adição de nucleotídeos. É uma excelente plataforma, com ótimo custo benefício e praticidade (PERVEZ, et al., 2022). A Ion Torrent desenvolveu em 2011 uma tecnologia NGS, também utilizando o método de sequenciamento por síntese, aplicando medições de pH gerando sequências de nucleotídeos, na qual a duração de suas leituras geradas podem variar e seus equipamentos não realizam sequenciamento de nenhuma extremidade de fragmento (LAHENS, et al., 2017; ROTHBERG, et al., 2011)

A QIAGEN apresenta a GeneReader como ferramenta de NGS, na qual obtém dados de sequenciamento através da identificação de nucleotídeos por sinais de fluorescência, amplificados clonalmente pelo GeneRead QIAcube. Seu sistema contribui em todas as etapas de sequenciamento, desde a extração do DNA a análise de dados de bioinformática (DORWANT, et al., 2017; KOITZSCH, et al., 2017). Em 2006 foi fundada a Complete Genomics, popularmente reconhecida por sua especialidade no sequenciamento do genoma humano, adquirida em 2013 pelo BGI-Shenzhen, instituição líder mundial no fornecimento de serviços genômicos, onde o BGI oferece uma série de sequenciamentos e tecnologias para análise de dados de pesquisas em diversas áreas de estudos. A Complete Genomics foi responsável pelo desenvolvimento do sequenciamento por hibridização e ligação ou DNA nanoball (DRMANAC, et al., 2010).

3.5 Marcadores moleculares

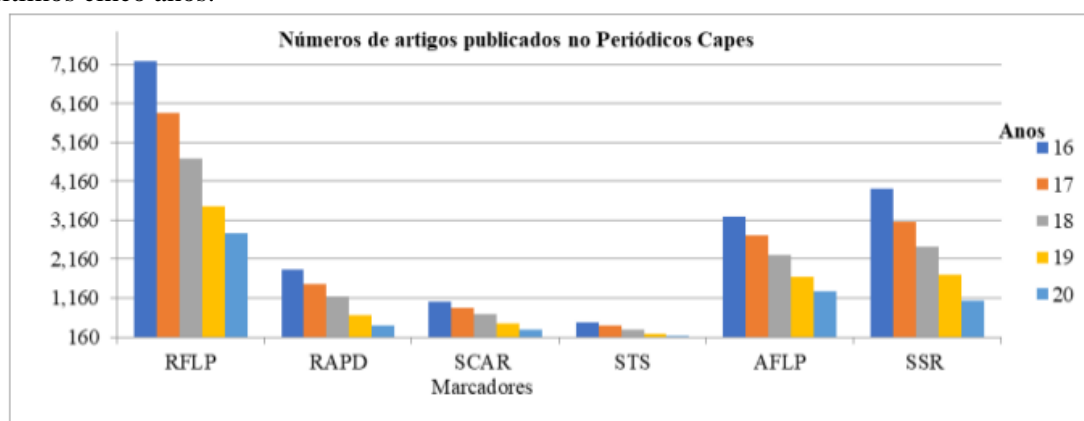
Marcadores moleculares, são fenótipos de genes expressos e segmentos de DNA (EMBRAPA, 2000). Apresentam característica de identificação, de informações genéticas moleculares de uma região específica do DNA, podem apresentar modificações em suas sequências, do tipo evoluções lentas, que são utilizadas em estudos intraespecíficos, ou do tipo evoluções rápidas, utilizadas em estudos de populações, indivíduos e famílias (SOUSA, 2019).

Essas ferramentas moleculares, podem ser provenientes de diferentes métodos, onde cada técnica utiliza diferentes metodologias para detectar polimorfismos genéticos, onde podem se diferenciar pela quantidade que está presente no genoma, o nível do polimorfismo encontrado, o custo, o tipo de técnica, e o tipo de locus (MONDINI, et al., 2009). São classificados por duas metodologias obtidas por hibridização como, os RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e os marcadores minissatélites. Outra metodologia utilizada para se obter marcadores, é através da amplificação do DNA, onde

são obtidos os RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), STS (Sequence Tagged Sites), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e SSR ou microssatélites (Simple Sequence Repeats) (OLIVEIRA, et al., 2021).

O uso de técnicas e ferramentas de biologia molecular apresentaram um grande crescimento na década de 80, o que popularizou ainda mais estudos voltados para a utilização do DNA. Oliveira e colaboradores (2021), realizaram um estudo de revisão bibliográfica e verificaram a quantidade de publicações de artigos que utilizaram marcadores moleculares, entre o período de 2016 a 2020 (figura 5).

Figura 5 – Estimativa aproximada do número de artigos utilizando marcadores moleculares nos últimos cinco anos.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2021.

Na década de 80, foram desenvolvidos os primeiros trabalhos envolvendo regiões repetitivas em tandem presentes no genoma de eucariotos, as quais foram definidas como microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs) por Diethard e Renz (1984), que são sequências simples de DNA de uma ou mais repetições sucessivas de nucleotídeos.

A identificação de regiões de microssatélites no genoma humano por Litt e Luty (1989) foi realizada por meio da técnica de PCR. A partir disso, esse tipo de marcador se popularizou no ramo da pesquisa por apresentar alto grau de polimorfismo e permitir a distinção entre indivíduos e populações, sendo muito utilizado para testes de paternidade (MADESIS; GANOPOULOS; TSAFTARIS, 2013).

Os marcadores microssatélites são muito utilizados na piscicultura para avaliações de variabilidade genética e, assim, montar estratégias reprodutivas em programas de melhoramento genético. Dessa forma, garantindo a sustentabilidade e maior controle de

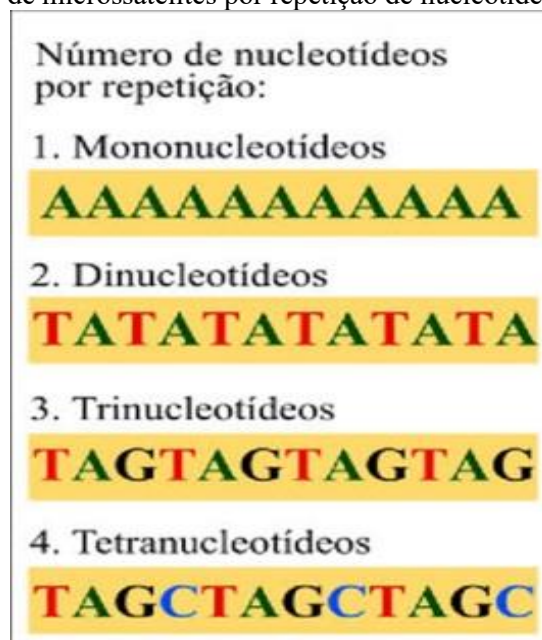
sistemas de criação voltados para reprodução e estratégias de melhoramento genético (MUGNAINI, 2017).

3.5.1 Marcadores microssatélites

Microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs), são sequências simples repetidas do genoma de eucariotos e procariotos. No genoma de eucariotos são frequentemente encontrados, se destacando por seu elevado conteúdo de informação genética e natureza multialélica. Devido as suas características é muito utilizado em estudos de genética de populações, como diversidade genética, melhoramento, análise de endogamia e distanciamento genético (ROSSAROLA, 2016).

Os SSRs são classificados de acordo com suas sequências ou motivos, que são identificados de acordo com a quantidade de nucleotídeos presentes, que podem variar de 1-6 nucleotídeos repetidos em tandem. O grau de polimorfismo presente nesses marcadores, pode ser identificado a partir da diferença no número de repetições presente nos motivos de microssatélites (figura 6) (WALTER, 2021).

Figura 6 – Classificação de microssatélites por repetição de nucleotídeos.



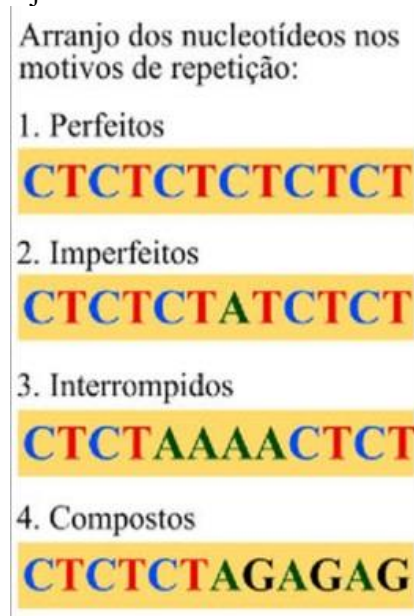
Fonte: FARIAS, et al. 2021.

Cada motivo de microssatélite, é constituído por um locus gênico com alta capacidade de mutação, sendo multialélico, além de carregar bastante informação genética e ser muito eficiente, o que faz desses marcadores moleculares uma importante

ferramenta biotecnológica para estudo de genética e genômica (FREITAS, 2019).

Esses marcadores são encontrados em todas as regiões do genoma, codificante e não codificante, estão presente com abundância no DNA, sendo divididos em quatro grupos, além da sua classificação por número de nucleotídeos apresentados, onde o grupo dos microssatélites perfeitos não apresentam interrupções na sequência repetitiva; os imperfeitos apresentam bases interrompendo a sequência; microssatélites com repetições compostas, quando mais de duas classes de SSRs estão dispostas de maneira adjacentes; microssatélites de repetição simples, quando apresentam apenas uma classe de repetição (figura 7) (CAIXETA, et al., 2016).

Figura 7 – classificação de arranjo de microssatélites.



Fonte: FARIAS, et al. 2021.

Esses marcadores moleculares são obtidos através de PCR, que amplifica o DNA de interesse de estudo com auxílio de *primers*, desenvolvidos para a espécie alvo ou outra espécie relacionada, para as regiões que flaqueiam os microssatélites. Esses *primers* são desenhados após a realização do sequenciamento dos fragmentos de DNA, onde ocorre a identificação de microssatélites (FREITAS, 2019).

3.6 Genética de populações e sua importância para espécies amazônicas

Genética de populações, são estudos voltados para a estrutura genética de espécies ou populações analisando suas mudanças ao longo do tempo, ou seja, sua variabilidade genética buscando compreender como essas populações acabam sofrendo seleção natural,

migração e deriva genética, visando exemplificar a variação genética e a evolução molecular em espécies pouco estudadas. Esses fatores são fundamentais para a compreensão do fundamento da genética populacional, que está presente na evolução de espécies (LYNCH, 2007; CHARLES WORTH, 2010; CASILLAS E BORBADELLA, 2017).

Estudos voltados a genética de populações com espécies amazônicas são fundamentais para preservação da sua grande diversidade de espécies presente nesta região, ou seja, a aferição de variabilidade genética é necessária devido a ocorrência de fatores como a migração, onde ocorre a mistura de material genético entre populações, elevando a taxa da variabilidade genética (GUERREIRO, 2019). Esta é uma informação importante tanto para a preservação das espécies, como também para estudos de melhoramento (BRANDÃO, 2005; ASHIKAGA, et al., 2015; BARROSO, 2003; GUERREIRO, 2019).

A utilização de dados genéticos como ferramenta para programas de melhoramento, tem cada vez mais se intensificando na piscicultura em estoques naturais de espécies. A identificação genética de populações e estudos sobre a variabilidade genética de espécies em estoque naturais, são essenciais para a sua produção comercial ou para o seu repovoamento de populações naturais (CALCAGNOTTO e TOLEDO FILHO, 2000; GUERREIRO, 2019).

3.7 Estratégia de melhoramento genético

Em alguns cultivos e produção de matéria-prima de origem animal e vegetal, pode ocorrer algumas perdas de variabilidade genética, o que pode ocasionar em caso de reprodução de espécies de elevado grau de parentesco e baixa variabilidade genética, alterações de características nas gerações descendentes, ocasionando alterações morfológicas (HASHIMOTO et al., 2012).

Melhoramento genético é um área da ciência, que apresenta um conjunto de técnicas para a produção de indivíduos com características seletivas. Estas técnicas são muito utilizadas na agricultura e pecuária. Na piscicultura, o melhoramento genético tem influenciado consideravelmente na produção, cultivo e economia de alevinos, obtendo ao longo dos anos, espécies com características mais produtivas (HILSDORF; ORFÃO, 2011). A hibridização também é outra técnica de melhoramento genético, desenvolvida

tanto em animais quanto em plantas, voltada para o controle reprodutivo de espécie com características genéticas diferentes, produzindo descendentes com características de combinações genéticas desejáveis (ALMEIDA; SOUZA et al., 2019).

A seleção genética é uma técnica de melhoramento genético, onde ocorre uma seleção de indivíduos de uma determinada espécie com característica genética elevada e de interesse para sua produção. Para se utilizar um método de seleção deve ser feito um levantamento das características específicas que se quer adquirir, como os traços alvo nos reprodutores, a quantidade de gerações que herdarão essas características escolhidas e a facilidade na reprodução da espécie (GJEDREM; BARANSKI, 2009).

Os Marcadores moleculares são muito utilizados em programas de melhoramento genético, especialmente por favorecer análises de rastreamento em linhagens de espécies, além de permitir o acesso a regiões específicas do genoma, identificação das relações de parentesco, e a realização de estudos envolvendo mapeamento genético-molecular, buscando estimar parâmetros genéticos, como a herdabilidade, interações entre ambiente e endogamia (VIEIRA, 2022).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto foi realizado em conformidade com os preceitos da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, sendo dispensado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia (Belém, PA, Brasil), com protocolo nº 4663010323, uma vez que utilizou apenas as sequências obtidas em projetos parceiros com a Universidade Federal de Pelotas (Pelotas, RS, Brasil).

4.2 Extração do DNA e sequenciamento na plataforma Illumina

As amostras de nadadeira caudal de *Leiarius marmoratus*, foram oriundas do Rio Grande do Sul, Brasil, extraídas no laboratório de engenharia genética animal da Universidade Federal de Pelotas. Foram coletadas conforme protocolo CEUA-UFRA nº 4663010323. Para extração de DNA, utilizou-se o kit comercial Wizard® Promega (Promega Bio Sciences, LLC. San Luis Obispo, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific), a concentração de DNA das amostras foi calculada pelo índice de absorbância das bases a 260 nm e padronizadas para concentração de 100 ng/μl.

Amostra de DNA de alto peso molecular foi submetida ao sequenciamento de nova geração pela plataforma Illumina, utilizando os adaptadores Illumina Universal Adapter, Illumina Small RNA 3' Adapter, Illumina Small RNA 5' Adapter e Nextera no sistema HiSeq™, sequenciador de leituras curtas que utiliza química de sequenciamento por síntese com capacidade de gerar 25 milhões de leituras com comprimento de 2x 300 pb (SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018).

4.3 Pré-processamento de short reads e montagem de novo

A análise de qualidade das reads foi feita utilizando o programa FastQc (ANDREWS, 2010), considerando os parâmetros de qualidade média total por base, qualidade média por read e conteúdo GC das sequências. A filtragem foi baseada no score

de Phred mínimo de 20 para controle de qualidade de bases e remoção de adaptadores, realizado pelo programa trimommetc.

Posteriormente, as reads foram submetidas à montagem de novo. Para isso, foram selecionados valores de k-mer dos dados obtidos pelo programa KmerGenie (CHIKHI; MEDVEDEV, 2014). A seleção para a escolha do montador, foi feita por meio de teste de montagem do genoma utilizando os programas SOAPdenovo2 (LUO et al., 2012) e SPAdes (BANKEVICH; et al., 2012). A comparação de qualidade da montagem foi mediada pelo programa QUAST (GUREVICH; et al., 2013), levando em consideração a distribuição e tamanho de contigs e os valores estatísticos de N50 e L50.

4.4 Mineração de SSRs, desenho de primers e PCR in silico

Para a busca dos marcadores microssatélites da espécie, foi utilizado o programa MISA (BEIER, et al., 2017) com os parâmetros de busca de 1 a 6 *motifs* de repetição, com no máximo 10 bases interrompendo 2 microssatélites em um SSR composto, número mínimo de repetições para cada motivo de repetição foi de (1/10) (2/5) (3/4) (4/3) (5/2) (6/2). E o EasySSR com os parâmetros pré-definidos pelo programa.

A mineração de SSRs foi realizada utilizando dois programas computacionais para a comparação dos dados. Utilizou-se o programa EasySSR, que utiliza o IMEx (Imperfect Microsatellite Extractor) para extração de microssatélites e automatiza a análise da entrada dos dados para caracterização dos marcadores na amostra (ALVES et al., 2023).

O BatchPrimer3, programa baseado em outros programas de desenho de *primers* como, Primer3, Primer3Web e Primer3Plus, desenhou os melhores *primers* SSR para *Leiarius marmoratus* com os parâmetros deflow do programa adaptados: tamanho de *primers* de 15-30 bp, conteúdo GC% 40-50, temperatura de anelamento de 55°C, com diferença de até 3°C entre *primers*. Além de desenhar os *primers*, o BatchPrimer3 realiza o PCR *in silico*, já que sua linha de comando consegue otimizar uma série de parâmetros ao disponibilizar os *primers* como o tamanho do produto, temperatura de fusão, conteúdo GC, comprimento do primer, estabilidade final 3', autocomplementaridade e possibilidade de dímeros (YOU et al., 2008).

5 RESULTADOS

5.1 NGS e Montagem de novo

A partir do sequenciamento Illumina foram obtidas 5.445.926 *reads* e após a realização do controle de qualidade realizado pelo programa FASTQC foram obtidas 648.977 *reads* com comprimento de 36 a 151pb. O tratamento de filtragem das bases atendeu a pontuação de qualidade $Q \geq 20$, a qualidade média por *read* apresentou $Q = 38$ e o conteúdo GC 41%, que representam dados de parâmetros de qualidade das *reads* obtidas.

O SPAdes foi o montador que apresentou melhor desempenho, gerando *contigs* de tamanhos maiores que os gerados pelo SOAPdenovo2, com 225.027 *contigs* gerados e um N50 de 644. Já o SOAPdenovo2 obteve um N50 de 554, um valor inferior.

5.2 Identificação de marcadores microssatélites

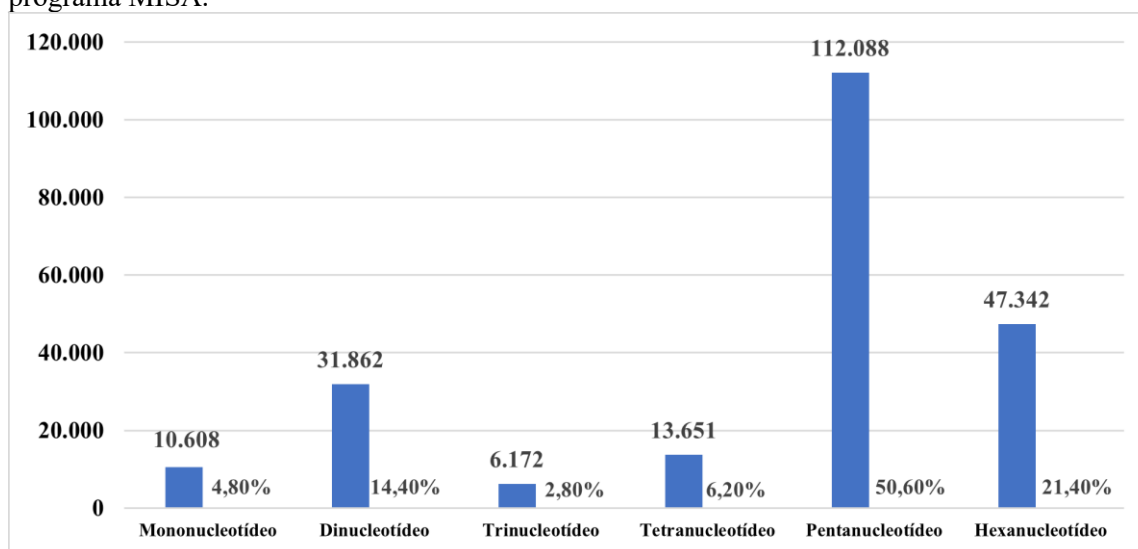
5.2.1 Programa MISA

De acordo com os resultados obtidos pelo programa MISA, 127.082 sequências apresentaram microssatélites, onde 54.841 sequências apresentaram mais de 1 SSR. No total, foram identificados 221.273 microssatélites em todo o genoma de *Leiarius marmoratus* (Tabela 3), os mais abundantes foram os pentanucleotídeos com 50,6%, e os trinucleotídeos foram encontrados em quantidade reduzida no genoma, com percentual de 2,8 %, (Figura 8).

Tabela 3. Microssatélites identificados no genoma da espécie *Leiarius marmoratus*.

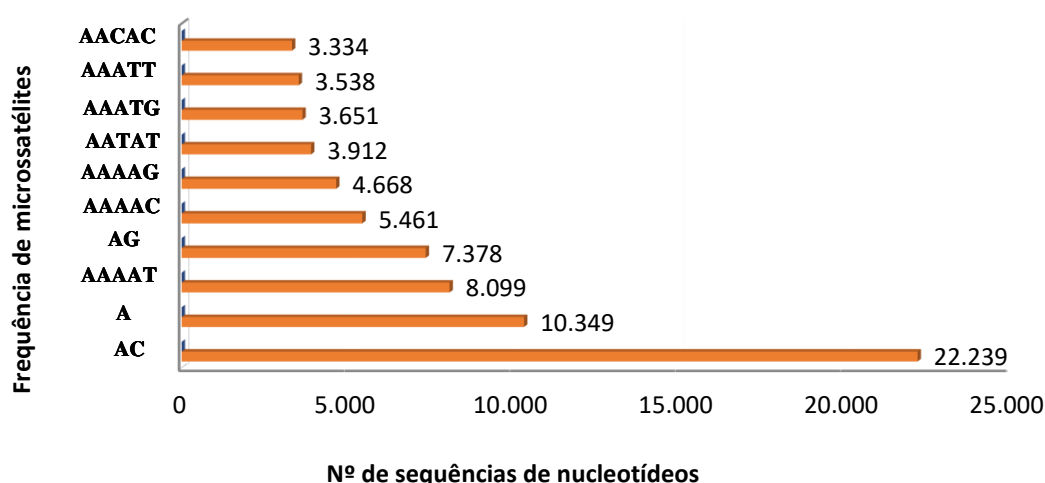
PARÂMETROS DE SSRs	Nº
Total de sequências examinadas	225.027
Total de sequências analisadas (pb)	74.171.373
Total de SSRs identificados	221.723
Sequências contendo SSRs	127.082
Sequências contendo mais de 1 SSR	54.841

Figura 8. Total de motivos de microssatélites encontrados em *Leiarius marmoratus* pelo programa MISA.



Os microssatélites que foram identificados da maior à menor frequência nas sequências do genoma de *Leiarius marmoratus*, podem ser visualizados na (figura 9). Onde pode-se observar que o motivo de repetição que se destacou com a maior frequência foi o AC, aparecendo 22.239 vezes. A foi o segundo identificado 10.349 vezes, seguido de AAAAT (8.099), AG (7.378), AAAAC 5.461, AAAAG (4.668), AATAT (3.912), AAATG (3.651), AAATT (3.538), AACAC (3.334).

Figura 9. Distribuição da frequência de SSRs no genoma de *Leiarius marmoratus*.



Os motivos de repetições mais longos também foram identificados e classificados de acordo com a sua frequência, onde observou-se que as classes de mono e dinucleotídeos apresentaram os motivos mais longos em todo o genoma. Na classe de

mononucleotídeos, o motivo mais longo foi o (G)₇₈, em dinucleotídeos os motivos foram iguais, assim como nas classes de trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos.

5.2.2 Programa EasySSR

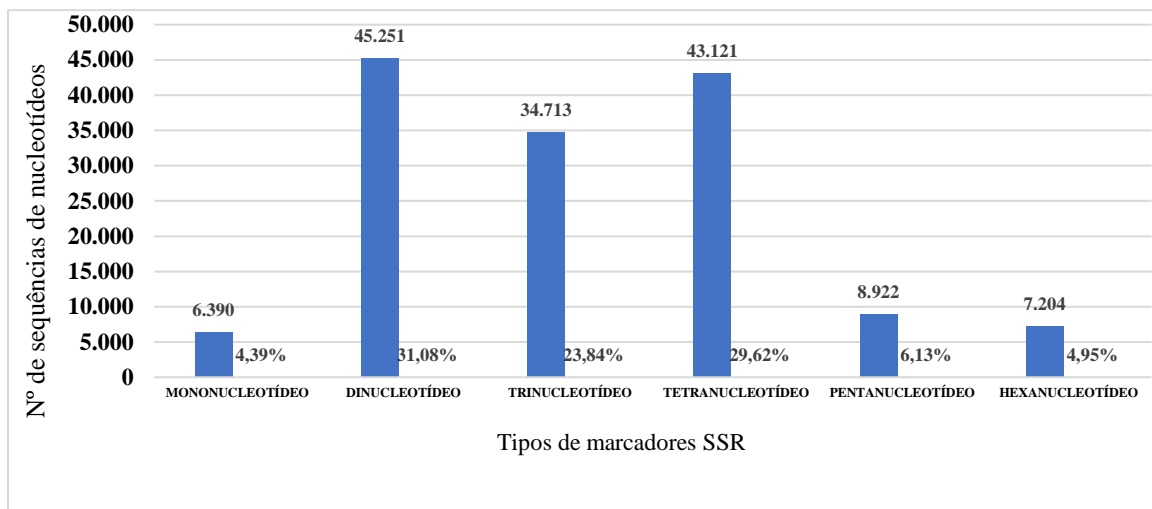
De acordo com o programa EasySSR, em toda a região do genoma analisado foi identificado o total de 145.601 microssatélites (Tabela 4), com porcentagem de 0,2% de SSR por pares de bases. Do total de microssatélites identificados, 92,34% são classificados como imperfeitos e 7,66% perfeitos, além de todos os 145.601 SSRs estarem presentes em regiões não codificantes.

Tabela 4. Parâmetros de microssatélites identificados no genoma de *Leiarius marmoratus*.

Parâmetros de SSR	Nº
Tamanho do genoma (BP)	74.171.373
Total de SSR	145.601
SSR por bp (%)	0,2
Total de SSRs em regiões codificantes	0
Total de SSRs em regiões não codificantes	145.601
SSR perfeitos	11.149 (7,66%)
SSR imperfeitos	134.452 (92,34%)

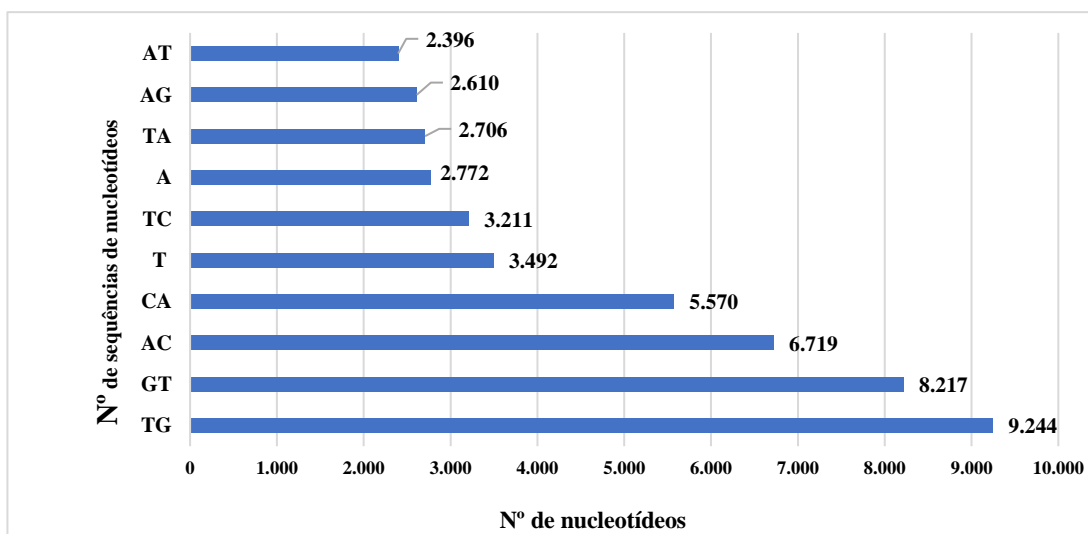
Dos 145.601 marcadores microssatélites identificados, a classe de maior predominância foi de dinucleotídeos, com 31,8% (45.251), seguido de tetranucleotídeos, com 29,62% (43.121) (Figura 10).

Figura 10. Tipos de marcadores microssatélites identificados no genoma de *Leiarius marmoratus* pelo programa EasySSR.



Os microssatélites mais frequentes no genoma de *L. marmoratus* foram TG (9.244,) e GT (8.217) (Figura 11).

Figura 11. Distribuição da frequência de SSR no genoma de *Leiarius marmoratus*.



5.3 Primers e PCR *in silico*

A partir do BatchPrimer3 foi realizado o desenho de *primers* e o PCR *in silico*, e obteve-se 590 pares de *primers*, nos quais foram utilizadas 501 sequências, sendo 255 sequências com pares bem-sucedidos e 245 sequências não apresentaram *primers* bem-sucedidos. O PCR *in silico* é realizado pelo programa de forma automática durante o

processo de desenho dos *primers*, pois apresenta uma linha de comando que consegue otimizar uma série de parâmetros importantes nas características de ótimos *primers*. O programa gerou um relatório com todos os dados obtidos (borcem, darcia gabriela (2023), “Primers identified through microsatellite mining from *Leiarius marmoratus*”, <https://data.mendeley.com/datasets/r4ztj33y35>).

O BatchPrimer3 também identificou os microssatélites mais frequentes a partir das 501 sequências analisadas, identificando um total de 721 SSR, onde 274 são do tipo dinucleotídeos (mais frequentes), seguido da classe de tetranucleotídeos (242), trinucleotídeos (120), pentanucleotídeos (56) e hexanucleotídeos (29).

5 DISCUSSÃO

Os constantes avanços em tecnologias de sequenciamento de DNA tem possibilitado estudos mais abrangentes e complementares na área da aquicultura. Entre as técnicas de análise de diversidade genética, os marcadores moleculares ocupam papel de destaque devido ao grande potencial discriminativo entre indivíduos, populações, raças e espécies, além de potencial de associação fenotípica com ampla aplicabilidade ao melhoramento genético (ZHAG et al., 2006; PANDOLFI et al., 2020).

Os dados obtidos após a etapa de processamento do genoma, obtiveram boa qualidade para a realização de anotações genômicas, apresentando semelhança com os dados obtidos por Lu, Zhao e Li (2020) que realizaram montagem e anotação do genoma de alta qualidade do peixe Mandarin-olho-grande (*Siniperca kneri*), onde ambos os dados obtiveram proximidade no valor do conteúdo GC entre 40% e 41%.

Estudo realizado na espécie de peixe *Ramdia quelen* também conhecida como Jundiá, nativa do estado do Rio Grande do Sul (Brasil) pertencente a mesma família e ordem do Jundiá da Amazônia (*Leiarius marmoratus*). Onde nesse estudo foram obtidas cinco milhões de leituras através do sequenciamento illumina (HiSeq), semelhante a espécie *Leiarius marmoratus* que obteve 5.445.926 reads, os valores de Q (qualidade média por leitura) foram semelhante com Q=38, já os valores de identificação de microssatélites foram discrepantes dos valores encontrados pelos programas utilizados neste estudo (RODRIGUES, et al. 2015).

Em estudo realizado com a espécie de peixe *Pogonophryne albipinna*, da subordem perciforme Notothenioidei que habitam águas costeiras e profundas do Oceano Antártico, os resultados de qualidade foram de 378.174.042 reads obtidas, valores de qualidade $Q \geq 20$, apresentando valores em torno de 90%, o que significa que alcançaram uma qualidade melhor, e conteúdo GC% 41,7%, bem próximo a espécie *Leiarius marmoratus*, que obteve 41% de conteúdo GC. Entretanto, com relação aos dados de montagem o número de contigs foi maior, com 571.624 (JO, et al. 2021).

Na mineração de microssatélites do genoma do *Leiarius marmoratus*, com o programa MISA, obteve-se um total de 127.082 sequências com a presença de regiões repetitivas, com um total de 221.223 SSRs identificados com a predominância do tipo pentanucleotídeo (50,6%), que diverge de outras espécies de peixe como o Bagre-amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*) que apresentou em seu genoma 82.794 microssatélites, sendo o dinucleotídeo, a repetição que apresentou maior abundância (65,14%), tipos de

microsatélites que são predominantes em espécies de peixe (ZHANG, et al. 2014).

Já a mineração realizada a partir do programa EasySSR, outro programa utilizado para realizar a comparação dos dados de mineração de microsatélites encontrados no genoma de *Leiarius marmoratus*, foram semelhantes ao estudo citado anteriormente sobre Bagre-amarelo, onde se obteve a predominância de SSRs do tipo dinucleotídeos, divergindo dos dados obtidos pelo MISA.

O motivo mais frequente identificado pelo EasySSR foi o TG seguido de GT/AC, diferente do MISA que identificou somente AC/GT, semelhante ao encontrado em estudo no genoma da Carpa-comum (*Cyprinus carpio*), que identificou 60,2% de AC/GT (JI et al. 2012). No Bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) a porcentagem de AC/GT foi um pouco menor, mas também foram os motivos predominantes com 50,7%, já na Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) foi 53,8% (SOMRIDHIVEJ, et al., 2008; SOLER, et al. 2010). Essa quantidade de dinucleotídeos do tipo AC/GT interfere na quantidade de eventos de recombinação homóloga sofrida pelo organismo biológico de estudo, já que estudos relatam que AC/GT pode afetar na recombinação homóloga em eucariotos (Gendrel; Boulet; Dutreix 2000).

Assim como em outros estudos envolvendo a identificação de microsatélites em pescados, bem como os realizados em *Aconthogobius ommaturus*, *Pseudosciaeno crocea* e *Megalobrama amblycephala*, de acordo com a frequência de motivos de SSRs identificados, as repetições de dinucleotídeos também apresentaram o maior número e tipos de repetições (Zeng, et al. 2013; Li, et al. 2014; Chen, et al. 2020).

Como nos estudos citados anteriormente, a frequência das repetições diminui de forma exponencial de acordo com a duração das repetições, visto que a taxa de mutação está ligada ao comprimento das mutações presentes nas repetições, mutações com longas repetições apresentam alta taxa de mutação (KATTI, RANJEKAR e GUPTA, 2001).

Em outra pesquisa envolvendo a identificação de microsatélites em genomas de peixes, foi desenvolvido uma base de dados de sequências de microsatélites de 41 espécies pertencentes a 15 famílias do subcontinente indiano, a maioria dos microsatélites predominantes nas 41 espécies, foram do tipo di- e trinucleotídeos (NAGPURE, et al. 2013). Com relação à divergência no tamanho do genoma e nos tipos de microsatélites, estas podem ser explicadas pela diferença genética entre as espécies e suas populações, grupos e subgrupos taxonômicos, além da variabilidade nas características das plataformas utilizadas (SRIVASTAVA et al., 2019).

O BatchPrimer3 também fez a identificação de microssatélites, semelhante aos programas MISA e EasySSR, onde apresentou similaridade com os dados gerados pelo EasySSR, que identificou a maior presença de dinucleotídeos nas sequências do genoma de *L. marmoratus*, se diferenciando dos dados gerados pelo MISA que identificou microssatélites do tipo pentanucleotídeos como os mais frequentes no genoma. O BatchPrimer3 gerou 590 pares de *primers* que, de acordo com os parâmetros do programa, são considerados potencialmente amplificáveis, podendo ser utilizados em estudos de genética de populações, bem como no melhoramento genético da espécie.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que as ferramentas moleculares utilizadas ao decorrer do projeto, foram eficazes para o seu desenvolvimento de ferramenta genética e compreensão de dados envolvendo a espécie *Leiarius marmoratus*, onde o objetivo de desenvolvimento de microssatélites e seus respectivos primers foi alcançado. E pode-se observar, que as divergências no tamanho de genomas, os tipos e a quantidade de microssatélites entre espécies, pode ser explicado pela diferença entre espécies ou populações, grupos, subgrupos taxonômicos, além das diferenças nas características ou parâmetros das plataformas.

REFERÊNCIAS

A pesca e a aquicultura são críticas para a transformação dos sistemas agroalimentares globais. Organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura (FAO), 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1371997/>

ALEKSEYEV YO, FAZELI R., YANG S., et al. Uma cartilha de sequenciamento de próxima geração – como funciona e o que pode fazer. *Patologia acadêmica*. 2018; 5: pág. 2374289518766521. Doi: 10.1177/2374289518766521.

AL-KHAYRI, J., M., JAIN, S. MOHAN., JOHNSON, D. V. (Eds.). *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools* (1st ed. 2015.). **Springer International Publishing**. 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22521-0>

ALMEIDA, R., A. Desempenho de juvenis de pintado-da- Amazônia (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de proteína bruta. 2014. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

ALSHAHNI, M., M., YAMADA, T. Genetic Manipulations in Dermatophytes. *Mycopathologia*. 182(1-2):33-43. 2017. doi:10.1007/s11046-016-0039-y

ALSHAHNI, M., M.; YAMADA, T. Genetic Manipulations in dermatophytes. *Mycopathologia Springer Netherlands*, v. 182, n. 1-2, p. 33-43, 2017.

ALVES, S., I., A., FERREIRA, V. B. C., DANTAS, C. W. D., DA SILVA, A. L. D. C., RAMOS, R. T. J. EasySSR: a user-friendly web application with full command-line features for large-scale batch microsatellite mining and samples comparison. *Front Genet*. Aug 24; 14:1228552. 2023. doi: 10.3389/fgene.2023.1228552.

ANDREWS S. **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

ASHIKAGA, F. Y.; ORSI, M. L.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. The Endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority Areas for conservation. *Environmental Biology of Fishes*, v. 98, n. 7, p. 1845-1855. 2015.

BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., GUREVICH, A. A., DVORKIN, M., KULIKOV, A. S., LESIN, V. M., NIKOLENKO, S. I., PHAM, S., PRJIBELSKI, A. D., PYSHKIN, A. V., SIROTKIN, A. V., VYAHHI, N., TESLER, G., ALEKSEYEV, M. A., PEVZNER, P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 19(5):455-477. 2012. doi:10.1089/cmb.2012.0021

BARBOSA, C., T., C., S. Níveis de proteína bruta na dieta para o híbrido – *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus* na fase inicial. 2016, p. 49.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós- Graduação em ciência animal, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2016.

BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. M.; GJUIMARAES, S. E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Identification and Characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 2, p. 297-298. 2003.

BATISTA, M., C. Desenvolvimento de uma ferramenta para análise de dados de sequenciamento por phage display. 2023. p, 82. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em recursos naturais, universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

BEIER, S., THIEL, T., MÜNCH, T., SCHOLZ, U., Mascher, M. MISA-web: a web server for microsatellite prediction. **Bioinformatics**. 33(16):2583-2585. 2017. doi:10.1093/bioinformatics/btx198

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. D. C.; CHAGAS, E. C.; ARAÚJO, L. D. D.; SILVA, A.L. F. D. Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque Rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p. 299-303mar. 2005.

CAIXETA, E., T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. **Marcadores Moleculares** (Ed.). Viçosa, MG: Ed. UFV, 2016.

CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO-FILHO, S. Loss of genetic variability at the Transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Genet Mol Res**, v. 23, n. 1. 2000.

CAO Y., FANNING S., PROOS S., JORDAN K., SRIKUMAR S. Uma revisão sobre as aplicações de tecnologias de sequenciamento de próxima geração aplicadas a estudos de microbiomas relacionados a alimentos. **Fronteiras em Microbiologia**. 2017; 8: pág. 1829. Doi: 10.3389/fmicb.2017.01829.

CASILLAS S., BARBADILLA A. Molecular Population Genetics. **Genetics**. 2017 Mar;205(3):1003-1035. Doi: 10.1534/genetics.116.196493. Erratum in: **Genetics**. 2019 Oct;213(2):721-722. PMID: 28270526; PMCID: PMC5340319.

CHARLESWORTH, B. Molecular population genomics: a short history. **Genet Res (Camb)**. 2010 Dec;92(5-6):397-411. doi: 10.1017/S0016672310000522.

CHEN B, SUN Z, LOU F, GAO TX, SONG N. Genomic characteristics and profile of microsatellite primers for *Acanthogobius ommaturus* by genome survey sequencing. **Biosci Rep**. 2020 Nov 27;40(11): BSR20201295. doi: 10.1042/BSR20201295.

CHEN M., TAN Z., ZENG G. E PENG J. (2010) Análise abrangente de repetições de sequência simples em pré-miRNAs. **Mol. Biol. Evol.** 27, 2227–2232 10.1093/molbev/msq100.

CHIKHI R., MEDVEDEV P. Informed and automated k-mer size selection for genome assembly. *Bioinformatics*. v. 30, n.1: p. 31-37. 2014.

DARWANTO A., HEIN AM, STRAUSS S., et al. Utilização do sistema QIAGEN GeneReader NGS para detecção de mutações KRAS, validado pelo kit QIAGEN Therascreen PCR e plataforma NGS alternativa. **Câncer BMC**. 2017; 17 (1):1–8. Doi: 10.1186/s12885-017-3328-z.

DEY, P., RAY, S. D., PRAMOD, P., SINGH, R. P. Dataset from genome sequencing, assembly and mining of microsatellite markers in barred-button quail (*Turnix suscitator*). *Data in brief*, 48, 109288. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.109288>

DRMANAC R., SPARKS A., B., CALLOW MJ, et al. Sequenciamento do genoma humano usando leituras de base desencadeada em nanoarranjos de DNA automontados. **Ciência**. 2010; 327 (5961):78–81. Doi: 10.1126/science.1181498.

FARIAS, IZENI & ROBERTO, IGOR & MUNIZ, FÁBIO & HERNÁNDEZ RANGEL, SANDRA & SENNA BITTENCOURT, PEDRO & CAMPOS, ZILCA & HRBEK, TOMAS. (2021). Genética da conservação dos crocodilianos no Brasil.

FAZZI-GOMES P, AGUIAR J, CABRAL GF, MARQUES D, PALHETA H, MOREIRA F, et al. (2021) Abordagem genômica para conservação e manejo sustentável de espécies ameaçadas de extinção da Amazônia. **PLoS UM** 16(2): e0240002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240002>

FISHMICROSAT: a microsatellite database of commercially important fishes and shellfishes of the Indian subcontinent. *BMC genomics*, 14, 630. 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-630>

FREITAS, C., R. Identificação de marcadores microssatélites correlacionados à atividade antioxidantes em *Lactuca sativa* L. 2019, p. 89. Dissertação (mestrado) – programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, universidade Federal de Uberlândia, Pato de Minas, 2019.

GENDREL CG, BOULET A, DUTREIX M. (CA/GT) (n) microsatellites affect homologous recombination during yeast meiosis. *Genes Dev*. 2000;14(10):1261-1268.

GUERREIRO, S., L., M. Diversidade genética de populações selvagens de *Brycon melanopterus* (Cope, 1871) da bacia Amazônica. 2019, p, 60. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em recursos aquicultura e recursos aquáticos tropicais, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.

GUREVICH, A., SAVELIEV, V., VYAHHI, N., TESLER, G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 29(8):1072-1075. 2013. doi:10.1093/bioinformatics/btt086

HASHIMOTO, D. T.; et al. Monitoramento genético dos estoques de reprodutores de peixes cultivados em uma piscicultura do Tocantins. Embrapa pesca e aquicultura (CNPASA). 2012. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/64705/1/R0463-1.pdf>.

HEATHER, J. M. et al. The sequence of sequencers: the history of sequencing dna. **Genomics**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 1±8, jan. 2016.
<https://doi.org/10.5897/AJB2014.14116>

HUNKAPILLER T., KAISER RJ, KOOP BF, HOOD L. Determinação automatizada e em grande escala da sequência de DNA. **Ciência**. 1991; 254 (5028):59–67. Doi: 10.1126/science.1925562

JI, P., ZHANG, Y., LI, C., ZHAO, Z., WANG, J., LI, J., XU, P., SUN, X. High throughput mining and characterization of microsatellites from common carp genome. **International journal of molecular sciences**, 13(8), 9798–9807. 2012.
<https://doi.org/10.3390/ijms13089798>

JO E, CHO YH, LEE SJ, CHOI E, KIM J, KIM JH, CHI YM, PARK H. Genome survey and microsatellite motif identification of Pogonophryne albipinna. **Biosci Rep**. Jul 30;41(7):BSR20210824. 2021. doi: 10.1042/BSR20210824.

KATTI, M. V., RANJEKAR, P. K., GUPTA V., S. (2001) Distribuição diferencial de repetições de sequências simples em sequências do genoma eucariótico. **Mol. Biol. Evol**. 18, 1161–1167 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003903

KNABAH, N. W. et al. Protocolo de criopreservação seminal de jundiá amazônico (Leiarius Marmoratus) associando BTS e Dimetilsulfóxido. XXVI Congresso de iniciação científica, 2017.

KOITZSCH U., HEYDT C., ATTIG H., et al. Utilização do Sistema GeneReader NGS em laboratório de patologia clínica: um estudo comparativo. **Jornal de Patologia Clínica**. 2017; 70 (8):725–728. Doi: 10.1136/jclinpath-2017-204342

LAHENS NF, RICCIOTTI E., SMIRNOVA O., et al. Uma comparação das plataformas de sequenciamento Illumina e Ion Torrent no contexto da expressão gênica diferencial. **Genômica BMC**. 2017; 18 (1):1–13. Doi: 10.1186/s12864-017-4011-0.

LASSO, C. A.; GUTIERREZ, F. P.; MORALES- BETANCOURT, M. A; et al. Catalogo de los recursos pesqueros continentais de Colombia. Série editorial recursos hidricos y pequenos continentales de colombia. Instituto de investigacion de recursos biológicos. [S. l.: s. n.], 2011.

LAYMAN, CA; WINEMILLER, KO; ARRINGTON, DA; JAPSEN, DB (2005). Tamanho corporal e posição trófic em uma cadeia alimentar tropical diversificada. **Ecologia**, 86(9), 2530-2535. DOI: <https://doi.org/10.1890/04-1098>

LI Q., LI Z., DAI G., CAO Y., CHEN X., CHEN L. ET AL. (2014) Isolamento e caracterização de onze locos microssatélites no rockfish marmorizado, *Sebastes marmoratus* (Scorpaenidae). **Conservar. Geneta. Recurso** 6, 53–55 10.1007/s12686-013-0001-y

LOHMANN K., KLEIN C. Sequenciamento de próxima geração e o futuro do diagnóstico genético. *Neuroterapêutica*. 2014; 11 (4):699–707. Doi: 10.1007/s13311-014-0288-8.

Lu, L., Zhao, J., Li, C. (2020). High-Quality Genome Assembly and Annotation of the Big-Eye Mandarin Fish (*Siniperca kneri*). *G3 (Bethesda, Md.)*, 10(3), 877–880. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400930>

LUNDBERG, J. G., LITTMANN, M. W. Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ. (Eds) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. *Edipucrs, Porto Alegre*, 432–446. 2003.

LUO, R., LIU, B., XIE, Y., LI, Z., HUANG, W., YUAN, J., HE, G., CHEN, Y., PAN, Q., LIU, Y., TANG, J., WU, G., ZHANG, H., SHI, Y., LIU, Y., YU, C., WANG, B., LU, Y., HAN, C., CHEUNG, D. W., WANG, J. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *GigaScience*, 1(1), 18. 2012. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-18>

LYNCH M., 2007. As Origens da Arquitetura do Genoma. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

MANTOVANI, L. S. C., SOUZA, F. P. DE, CAMPOS, E. C., LEWANDOWSKI, V., BARRERO, N. M. L., RIBEIRO, R. P. Genetic diversity in Amazonian jundiá (*Leiarius marmoratus*) stocks using heterologous primers. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, vol. 44, i. 52657, 2022.

MIGNARDI M., NILSSON M. Sequenciamento de quarta geração na célula e na clínica. *Medicina do Genoma*. 2014; 6 (4):31–34. Doi: 10.1186/gm548.

NADEEM, M. A., NAWAZ, M. A., SHAHID, M. Q., DOĞAN, Y., COMERTPAY, G., YILDIZ, M., BALOCH, F. S. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285. 2018.

NAGPURE, NS, RASHID, I., PATI, R. *ET AL*. FishMicrosat: um banco de dados de microssatélites de peixes e mariscos comercialmente importantes do subcontinente indiano. *BMC Genômica* 14, 630 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-630>

PEIFENG, J., et al. Mineração de alto rendimento e caracterização de microssatélites do genoma da carpa comum. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(8): 9798–9807

PERVEZ M., T., HASNAIN MJU, ABBAS S., H., MOUSTAFA M., F., ASLAM N., SHAH S., S., M. A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. *Biomed Res Int*. 2022 Sep 29; 2022: 3457806. Doi: 10.1155/2022/3457806.

PORCELLI, D. iNaturalist, 2015. Acesso em: <https://www.biodiversity4all.org/photos/100331442>

QUAIL MA, SMITH M., COUPLAND P., et al. Uma história de três plataformas de sequenciamento de próxima geração: comparação dos sequenciadores Ion Torrent, Pacific Biosciences e Illumina MiSeq. **Genômica BMC**. 2012; 13: pág. 341. Doi: 10.1186/1471-2164-13-341.

RODRIGUES, M., D., N., MOREIRA, C., G., A., GUTIERREZ, H., J., P., ALMEIDA, D., B., STREIT, J., R., & MOREIRA, H., L., M. (2015). Desenvolvimento de marcadores microssatélites para uso na criação de bagres, *Rhamdia sp.* **African Journal of Biotechnology**, 14(5), 400-411.

ROSSAROLA, M., D. Desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites e análise da diversidade genética de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P M. 2016, p. 87. Dissertação (mestrado) – programa de Pós-Graduação em recursos genéticos vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

ROTHBERG J., M., HINZ W., REARICK T., M., et al. Um dispositivo semicondutor integrado que permite o sequenciamento não óptico do genoma. **Natureza**. 2011; 475 (7356):348–352. Doi: 10.1038/nature10242.

SAKIYAMA, N. S., RAMOS, H. C. C., CAIXETA, E. T., PEREIRA, M. G. Plant breeding with marker-assisted selection in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 54–60, mar. 2014.

SCHMIEDER, R., EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**. 27(6):863-864. 2011. doi:10.1093/bioinformatics/btr026

SLATKO, B. E., GARDNER, A. F., AUSUBEL, F. M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. Apr;122(1):e59. 2018. doi: 10.1002/cpmb.59.

SOLER, L., CONTE, M. A., KATAGIRI, T., HOWE, A. E., LEE, B. Y., AMEMIYA, C., STUART, A., DOSSAT, C., POULAIN, J., JOHNSON, J., DI PALMA, F., LINDBLAD-TOH, K., BAROILLER, J. F., D'COTTA, H., OZOUF-COSTAZ, C., KOCHER, T. D. Comparative physical maps derived from BAC end sequences of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **BMC genomics**, 11, 636. 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-636>

SOMRIDHIVEJ, B., WANG, S., SHA, Z., LIU, H., QUILANG, J., XU, P., LI, P., HU, Z., LIU, Z. Characterization, polymorphism assessment, and database construction for microsatellites from BAC end sequences of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): A resource for integration of linkage and physical maps. **Aquaculture**. Mar 31;275(1-4):76-80. 2008. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.01.013

SPICA, L. N., SANCHES, E. A., JUNIOR, D. P. S., FILHO, R. A. C. C., DE OLIVEIRA BRASILEIRO, L., RODRIGUES, R. B., KASAI, R. Y. D., & POVH, J. A. Successive seminal collections from *Leiarius marmoratus* during the reproductive period. **Animal reproduction science**, 234, 106852. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106852>

SRIVASTAVA, S., AVVARU, A. K., SOWPATI, D. T., MISHRA, R. K. Patterns of microsatellite distribution across eukaryotic genomes. *BMC Genomics*. 20, 153 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5516-5>

TAVARES, R. A., PIEDRAS, S. R. N., NUNES, M. D., ALMEIDA, D. B., MOREIRA, C. G. A., FERNANDES, J. M., FREITAS, S. F., MOREIRA, H. L. M., POUHEY, J. L. O. F., DIONELLO, N. J. L. (2014). Identificação de loci microssatélites com potencial de amplificação na espécie de Peixe-Rei (*Odontesthes humensis*). *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 66(6), 1941–1945. <https://doi.org/10.1590/1678-7444>

TIAN, C. X., LIANG, X. F., YANG, M., DOU, Y. Q., ZHENG, H. Z., CAO, L., YUAN, Y. C., ZHAO, C. New microsatellite loci for the mandarin fish *Siniperca chuatsi* and their application in population genetic analysis. *Genetics and molecular research: GMR*, 13(1), 546–558. 2014. <https://doi.org/10.4238/2014.January.22.1>

TIMP W., MIRSAIDOV UM, WANG D., COMER J., AKSIMENTIEV A., TIMP G. Sequenciamento Nanopore: medições elétricas do código da vida. *Transações IEEE sobre Nanotecnologia*. 2010; 9 (3):281–294. Doi: 10.1109/TNANO.2010.2044418.

VARSHNEY, R. K., GRANER, A., SORRELLS, M. E. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends in plant science*, 10(12), 621–630. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.004>

VARSHNEY, R. K., HOISINGTON, D. A., TYAGI, A. K. Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. *Trends in biotechnology*, 24(11), 490–499. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.08.006>

WALTER, F., H., B. Seleção em famílias de irmãos-completos de goiabeira via modelos mistos e marcadores microssatélites. 2021, p. 85. Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do norte fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

WILLNER, D., THURBER, R. V., ROHWER, F. Metagenomic signatures of 86 microbial and viral metagenomes. *Environmental microbiology*, 11(7), 1752–1766. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01901.x>

YOU, F. M., HUO, N., GU, Y. Q., LUO, M. C., MA, Y., HANE, D., LAZO, G. R., DVORAK, J., ANDERSON, O. D. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC bioinformatics*, 9, 253. 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-253>

ZENG C., GAO Z., LUO W., LIU X., WANG W., ZHANG X. et al. (2013) Características de microssatélites em sequências EST de dourada (*Megalobrama amblycephala*) usando 454 FLX. *Acta Hidrobiol. Pescado*. 37, 982–988

ZHANG, B., LI, Z. J., TONG, J. G., LIAO, X. L. Isolation and characterization of 18 polymorphic microsatellite markers in Chinese mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky). *Mol. Ecol. Notes* 6: 1216-1218. 2006.

ZHANG, J., MA, W., SONG, X., LIN, Q., GUI, J. F., MEI, J. Characterization and development of EST-SSR markers derived from transcriptome of yellow catfish. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(10), 16402–16415. 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules191016402>