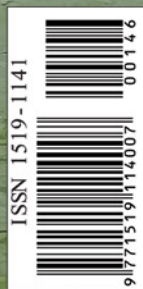


Panorama da **AQUICULTURA**



RAÇÕES PARA CAMARÃO

**A IMPORTÂNCIA DE
AFERIR A QUALIDADE
NUTRICIONAL**





Uso de DNA em programas de melhoramento

Por:

Prof. Dr. Alexandre W.S. Hilsdorf - wagner@umc.br
Universidade de Mogi das Cruzes
Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura

Prof. Dr. Heden Luiz Marques Moreira - heden@ufpel.edu.br
Universidade Federal de Pelotas / Departamento de Zoologia e Genética

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas - rilke@dzo.ufla.br
Universidade Federal de Lavras / Departamento de Zootecnia

Em 1997, a *Panorama da AQUICULTURA* publicou o artigo “Biologia molecular: Uma realidade para Aquicultura” sobre as tecnologias associadas à manipulação da molécula do Ácido Desoxirribonucleico - o DNA, e suas aplicações na aquicultura. Naquele momento, o sequenciamento do genoma humano ainda estava em seus primórdios, e não havia nenhum organismo, seja eucarionte ou procarionte, com seu DNA totalmente sequenciado. Após 18 anos, o quadro mudou a uma velocidade espantosa. A sequência do DNA do genoma humano foi praticamente finalizada, sendo

que diversos organismos desde bactérias até organismos mais complexos já tiveram seus DNAs totalmente sequenciados, incluindo várias espécies de peixes. Para se ter uma ideia dos avanços tecnológicos envolvendo a manipulação do DNA, o consórcio internacional para o sequenciamento total do genoma humano que teve seu início em 1990 e foi finalizado oficialmente em 2003 teve um orçamento inicial de cerca de 2,7 bilhões de dólares. Atualmente este mesmo genoma pode ser sequenciado em uma semana há um custo de aproximadamente US\$ 5.000,00.

As tecnologias aplicadas à manipulação do DNA

A história do desenvolvimento das técnicas relacionadas à manipulação do DNA, conhecido como Tecnologia do DNA Recombinante, obteve seu marco com a publicação em 25 de abril de 1953 da estrutura da molécula de DNA pelo britânico Francis H. C. Crick e pelo americano James D. Watson. A partir do conhecimento da estrutura de dupla hélice helicoidal foi possível entender as propriedades químicas e biológicas do DNA, e com isso, desenvolver tecnologias para o seu isolamento, clonagem e sequenciamento.

O primeiro grande achado após a proposta do modelo da dupla hélice foi a descoberta das enzimas de restrições pelo suíço Werner Arber e os americanos Daniel Nathans e Hamilton Smith no início da década de 1970. As enzimas de restrição são proteínas presentes em bactérias que cortam a molécula de DNA em seqüências de nucleotídeos específicas (**Figura 1**). A descoberta destas enzimas foi fundamental para a manipulação do DNA, permitindo cortá-lo de forma controlada e reprodutível. Muitos pesquisadores passaram a utilizar as enzimas de restrição para mapear regiões específicas de genomas de diversos organismos. Na década de 70, Paul

"De todas as tecnologias associadas à manipulação do DNA, o sequenciamento das bases nitrogenadas que contém as informações para construção de um ser vivo foi a que mais se expandiu nas últimas décadas."

Berg, Herbert Boyer e Stanley Cohen desenvolveram as técnicas de clonagem bacteriana, ou seja, a introdução de fragmentos de DNA em bactérias para que estas pudessem fabricar proteínas de qualquer organismo, como por exemplo, a insulina humana, hoje utilizada por diabéticos.

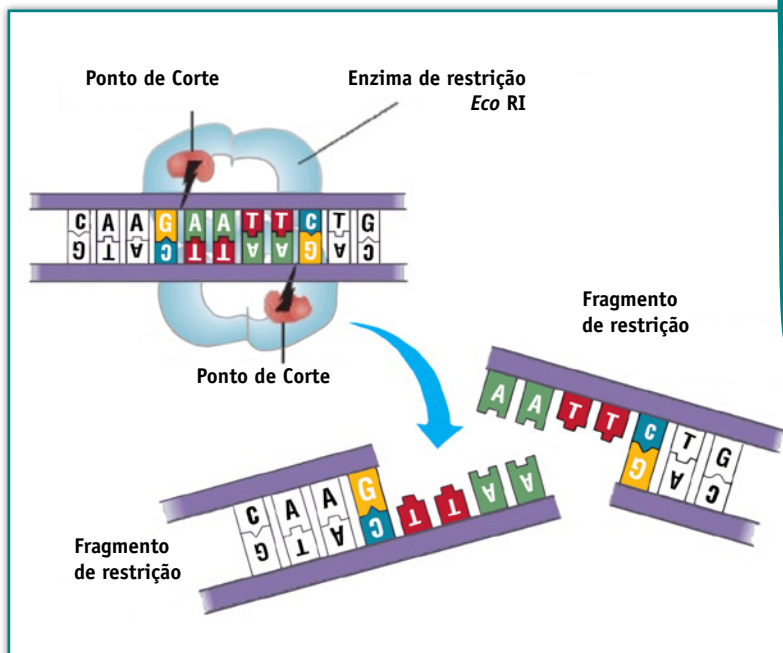


Figura 1. Esquema mostrando o funcionamento da enzima de restrição EcoRI, extraída da bactéria *Escherichia coli* que corta o DNA na região específica GAA/TTC (Fonte: Biologia das populações/ José Mariano Amabis, Gilberto Martho, 2. Ed., São Paulo, Moderna, 2004)

De todas as tecnologias moleculares, o sequenciamento das bases nitrogenadas do DNA foi a que mais se expandiu nas últimas décadas. Entre 1973 e 1977, Allan Maxam and Walter Gilbert desenvolveram um método químico para sequenciamento do DNA e Frederick Sanger desenvolveu um método enzimático que foi a base para os primeiros sequenciadores automáticos de DNA. A partir de 2005, iniciou-se o desenvolvimento de plataformas de sequenciamento conhecidas por Sequenciamento de Próxima Geração (*Next Generation Sequencing* – NGS). Nos últimos anos várias empresas têm se dedicado a desenvolver métodos de sequenciamento com maior capacidade de geração de dados e rapidez (**Figura 2**).

O potencial desta tecnologia pode ser medida pela redução dos custos de sequenciamento que de US\$ 0,01 por base em 2004 passou para US\$ 0,0001 por base nitrogenada sequenciada em 2006. A capacidade de geração de seqüências foi de 1 milhão



Figura 2. Equipamentos da nova geração de sequenciamento de DNA das empresas Illumina (HiSeq), Applied Biosystem (Ion Torrent) e Roche (GS-FLX), respectivamente

de bases por equipamento/dia para mais de 5 bilhões de sequências nos dias atuais. Este alto poder de geração de dados tem possibilitado a disponibilização de sequências integrais de diferentes organismos, incluindo peixes de interesse para aquicultura.

Os marcadores genéticos

Na aquicultura, a seleção de indivíduos com melhores características foi e ainda é baseada em medidas fenotípicas, tais como peso ou comprimento. Estes fenótipos podem ser considerados marcadores, pois ao se selecionar um peixe maior, supõe-se estar selecionando genes que o fazem maior. Contudo, para se conhecer a real variação genética dentro e entre espécies a melhor abordagem é avaliar tal variação diretamente no DNA. Para isto, a estratégia inicial dos geneticistas foi desenvolver marcadores genéticos que os auxiliassem no entendimento da variabilidade genética, fundamental tanto para escolha de uma espécie de organismo aquático para domesticação e uso na aquicultura, como para a escolha de populações geneticamente distintas de uma espécie para sua utilização em programas de melhoramento.

Os primeiros marcadores genéticos foram os baseados em variantes proteicas, as chamadas isoenzimas e aloenzimas. Da mesma forma, que o uso de fenótipos externos e mensuráveis, o uso de variantes proteicas visava prospectar e entender as diferenças genéticas entre indivíduos e populações baseadas nas diferenças de mobilidade de uma proteína causada por mutações na informação genética (DNA). A eletroforese de proteínas se popularizou durante as décadas de 1960 e 1970, e foi muito usada para se entender diferenças entre populações de peixes para uso em conservação, manejo pesqueiro e aquicultura.

A partir da década de 1980, inicia-se uma mudança importante no uso de marcadores moleculares para investigar a variabilidade genética de qualquer organismo. A revolução que se avistava para universalização no uso

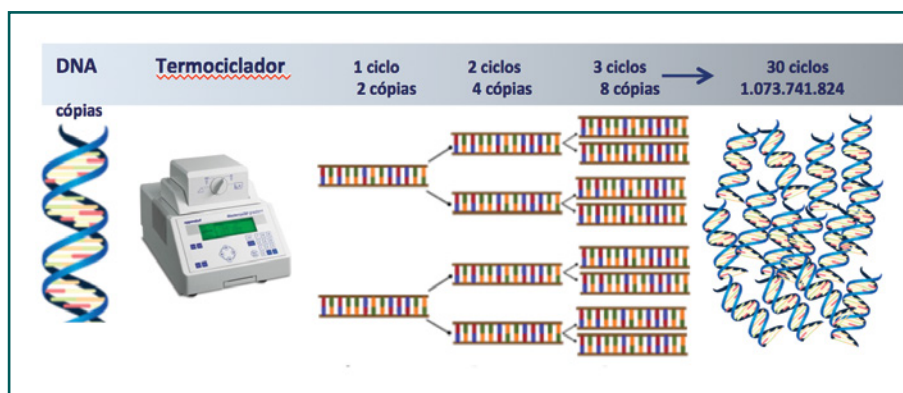


Figura 3. Processo de amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase com a utilização de termociclador

de marcadores moleculares foi sem dúvida o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase - Polymerase Chain Reaction- PCR (**Figura 3**). A técnica da PCR possibilitou o desenvolvimento de diversas técnicas para encontrar mutações sem o sequenciamento direto do DNA. Estas técnicas foram conhecidas como marcadores moleculares e de acordo com o tipo de abordagem usada são conhecidas por seus acrônimos em inglês como, por exemplo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA/Amplificação Randômica de DNA Polimórfico*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism/Polimorfismo de Fragmentos de Restrição*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism/Polimorfismo de Fragmentos Amplificados*), VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats* – minissatélites/Número de Cópias Variáveis em Tandem) e STR (*Short Tadem Repeats* - microssatélites/Repetições Curtas em Tandem) (**Tabela 1**).

Os marcadores moleculares possibilitaram a geração de informações importantes para o manejo dos recursos genéticos de espécies de interesse para aquicultura. Entre eles podemos destacar **(i)** identificação genética de discriminação de populações de espécies aquícolas; **(ii)** monitoramento dos níveis de endogamia e outras mudanças genéticas em plantéis como resultado de programas de seleção; **(iii)** comparação entre populações selvagens e cultivadas; **(iv)** avaliação genética do impacto de escapes de populações cultivadas ou de programas de

Tabela 1. Tipos de marcadores moleculares, suas características e aplicação na avaliação genética de populações de peixes

Tipo de Marcador	Modo de Herança	Informação prévia necessária	Nível de Polimorfismo	Custo de operação	Número de alelos/haplótipos*	Utilização em estudos genético populacional em peixes
Aloenzimas/Isoenzimas	codominante	sim	Baixo	baixo	dois a seis	alto
RAPD	dominante	não	Intermediário	baixo	indeterminado	alto
RFLP	variável	sim	Intermediário	baixo	multialélico ou vários haplótipos	alto
AFLP	dominante	não	Alto	intermediário	dois	baixo
STR- Microssatélites	codominante	sim	Alto	intermediário	multialélico	alto
SNP	codominante	sim	Alto	alto	bialélico	baixo

*haplótipos: aqui o termo haplótipos se refere ao uso do RFLP em estudos genéticos com a utilização do DNA mitocondrial.

FAÇA A DIFERENÇA



Quando você escolhe
uma boa fonte de informação
o mercado escolhe você




**Panorama da
AQUICULTURA**

Assine e estude nas páginas da *Panorama da AQUICULTURA*.

(21) 3547-9979

Quem sabe pode mais. www.panoramadaaquicultura.com.br

repopoamento; (v) avaliação de matriz de parentesco por marcadores moleculares; (vi) identificação de marcadores de DNA associados a genes de interesse econômico.

Os microssatélites

Um marcador molecular que podemos destacar e que tem sido muito utilizado em organismos de interesse para aquicultura são os chamados microssatélites. O público em geral conhece indiretamente tal marcador, pois é o mesmo utilizado em testes de paternidade em humanos. Microssatélites são repetições de nucleotídeos que ocorrem no genoma. Por exemplo, podemos encontrar em diferentes regiões do genoma de uma espécie qualquer uma sequência de nucleotídeos repetida, como ATATATATATAT, este é um exemplo de um microssatélite dinucleotídico AT. Da mesma forma, outras repetições como di (AT ou CG ou CT, etc.), tri (ATC, ATG, CCT, etc.), tetra (AATT, ACTG, ATCG, etc.) até repetições hexanucleotídicas podem ser encontradas em um genoma (Figura 4).

No entanto, o que faz destas repetições importantes para serem usadas em testes de paternidade ou mesmo em avaliações genéticas de populações? Estes marcadores moleculares são muitos polimórficos, isto é, cada indivíduo pode carregar microssatélites diferentes quanto ao número de repetições. Em organismos diploides que possuem um conjunto de cromossomos herdados da mãe e outro do pai, um indivíduo pode receber de um progenitor um cromossomo que contenha 10 repetições AT e de outro progenitor outro cromossomo com 15 repetições AT, por exemplo. Assim, este indivíduo é considerado um heterozigoto para este locus AT (AT10 AT15) e pode ser diferente de outro indivíduo que carregue um genótipo AT11AT14 e, assim, por diante.

Nos organismos de maneira geral encontramos microssatélites que para serem usados devem ser identificados para uma dada espécie. Após a identificação de um painel de microssatélites, estes são testados na espécie para escolha dos que apresentem maior variação (polimorfismo). Vários têm sido os trabalhos que utilizam marcadores microssatélites em programas de avaliação genética de espécies de interesse para aquicultura (ver recomendação para leitura). Estes trabalhos de forma geral utilizam os microssatélites para estabelecer os núcleos de cruzamentos com populações geneticamente divergentes nos programas de melhoramento. Os microssatélites podem ser também utilizados para avaliar os níveis de endogamia em um estoque reprodutor, principalmente quando não se tem um controle de parentesco dos cruzamentos. Assim, o produtor que deseje verificar o grau de endogamia de seus reprodutores pode solicitar a um laboratório que preste tal serviço para, com isto, proceder a renovação de seus reprodutores no caso de encontrar uma alta taxa de endogamia (ver artigo desta série, na Revista *Panorama da AQUICULTURA*, edição 144).

Os microssatélites são geralmente encontrados em regiões não codificantes do genoma, isto é, regiões que não contenham genes. Contudo, podemos encontrar repetições microssatélites em regiões do DNA que codifica uma proteína como também em regiões regulatórias, como os promotores que ligam e desligam um gene. Streelamn and Kocher (2002) evidenciaram que a presença de um microssatélite na região do promotor do gene da prolactina está associada a diferenças de expressão deste gene. O aumento da expressão do gene da prolactina



Figura 4. Exemplo de um microssatélite com repetições de trinucleotídeos (ATG)

aumenta a resistência de tilápias a águas mais salinas em cruzamentos entre tilápias moçambicana e nilótica. Trabalhos vêm mostrando também este mesmo polimorfismo no promotor do hormônio do crescimento que, da mesma forma como demonstrado para prolactina, altera a expressão na produção do hormônio de crescimento podendo com isto

"Nos últimos anos diversos trabalhos têm sido publicados com a descrição de painéis de locus microssatélites. Locus para pintado, cachara, tambaqui, pacu entre outras espécies estão disponíveis para o uso em programas de melhoramento."

pode incrementar o crescimento de peixes em sistemas de criação. Esta abordagem de encontrar regiões genômicas cujo polimorfismo apresente um impacto direto em fenótipos de interesse econômico, é o que chamamos de *Seleção Assistida por Marcadores*.

Nos últimos anos diversos trabalhos têm sido publicados com a descrição de painéis de locus microssatélites. Locus para pintado, cachara, tambaqui, pacu entre outras espécies neotropicais estão disponíveis para o uso em programas de melhoramento.

As técnicas para genotipagem de microssatélites estão cada vez mais disponíveis e os custos têm sido reduzidos nos últimos anos. Assim, laboratórios em universidades e empresas privadas já disponibilizam tais serviços para produtores interessados em utilizar estes marcadores moleculares para um melhor manejo de seus plantéis de reprodutores.

SNP – a nova geração de marcadores moleculares

SNP é a sigla em Inglês para *Single Nucleotide Polimorphism*, que em Português significa Polimorfismo de Nucleotídeo Único ou Polimorfismo de Sítio Único (**Figura 5**). Os SNP's são mutações de substituição, isto é, uma mudança no genoma que troque um dos quatro nucleotídeos, por exemplo, uma Adenina por uma Guanina (ou o inverso), Timina por uma Citosina (ou o inverso) (mutações do tipo Transição) ou Adenina por uma Timina, Adenina por uma Citosina, Guanina por uma Timina e Guanina por uma Citosina (ou o inverso em todas as trocas) (mutações do tipo Transversão). Nem toda mutação de ponto pode ser considerado um SNP. Para uma mutação de ponto ser considerada um SNP, esta deve estar presente em pelo menos 1% das populações que compõe uma espécie.

A importância deste marcador molecular nos genomas tem sido cada dia mais estudado por cientistas. Por exemplo, no genoma humano há cerca de um SNP a cada 300 nucleotídeos. Isto significa que carregamos 10 milhões de SNPs em nossos três bilhões de nucleotídeos. Em seres humanos, os SNPs estão envolvidos em diversas doenças, principalmente aquelas controladas por muitos genes, como doenças coronárias, e particularmente na resposta a medicamentos. Em se tratando de produção animal, qual seria a importância dos SNPs?

O objetivo de programas de melhoramento genético é selecionar os melhores fenótipos para obter por cruzamentos dirigidos os genótipos que apresentem os melhores desempenhos, isto é, aqueles que tenham os melhores desempenhos. Até o advento das modernas técnicas de manipulação do DNA, a escolha dos melhores fenótipos se resumia exclusivamente pela medida direta da característica de interesse. As características de interesse econômico são em sua grande maioria de herança quantitativa (ver artigo desta série, na Revista *Panorama da AQUICULTURA*, edição 139). Desta forma, temos que ter em mente que uma característica como, por exemplo, ganho de peso, é controlada por muitos genes, e que tais genes podem apresentar diferentes SNPs. Estes SNPs de alguma forma podem influenciar a expressão dos referidos genes, e que no conjunto da expressão de todos os genes envolvidos podem incrementar ou não o ganho de peso final do animal. Sendo assim, se SNPs no genoma de uma espécie puderem ser mapeados, as variações dos mesmos podem ser avaliadas para se medir o seu impacto sobre características de interesse econômico.

Esta abordagem já tem sido amplamente utilizada na bovinocultura de corte e de leite. Com o sequenciamento do genoma bovino, empresas do setor criaram metodologias para genotipar um conjunto de SNPs. Esta metodologia consiste em um “chip” que contém cerca de 50.000 SNPs (**Figura 6**) que são avaliados por equipamentos que irão determinar a presença ou não de determinada SNP de interesse. Apesar de ainda ser um campo de discussão entre os melhoristas sobre a real eficácia da utilização de seleção de animais baseada em SNPs, tal metodologia tem sido intensamente usada, pois permite a seleção de indivíduos ainda na fase inicial de vida, apenas utilizando-se de uma amostra de sangue para obtenção do DNA.

Em qual estágio esta tecnologia está sendo usada para organismos de interesse para aquicultura? O avanço encontrado em animais terrestres ainda não tem se refletido nas diversas espécies atualmente utilizadas na

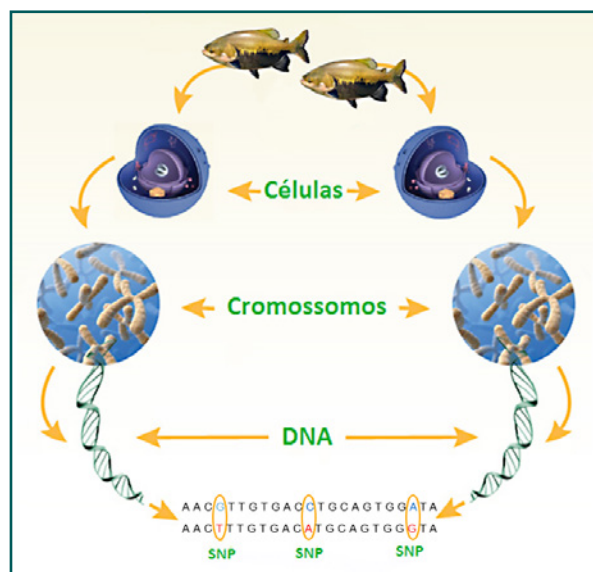


Figura 5. Dois indivíduos que possuem SNPs distintos em seus genomas (Adaptado de Basf Plant Science Company website)

aquicultura. A geração de chips de SNPs para serem usadas em programas de melhoramento de certa forma depende do valor da espécie no mercado, pois a produção destes chips e seu uso ainda representa um custo elevado. Atualmente, chips comercialmente disponíveis podem ser encontrados para truta arco-íris, bagre americano de canal (channel catfish) e salmão. Em termos de aplicabilidade, a salmicultura é a atividade aquícola que mais tem se beneficiado com a utilização de chips de SNPs em programas de melhoramento genético. Empresas como Illumina e Affymetrix disponibilizam diferentes chips de SNPs prontos para uso em escala comercial em programas de seleção para salmão. Também há empresas que fornecem serviços customizados de produção de chips para qualquer espécie uma vez que possuam um painel de SNPs caracterizados.

As primeiras abordagens moleculares que buscavam localizar no genoma regiões que estivessem associadas a um fenótipo específico como QTL (*Quantitative Trait Loci* – Locus de Caracteres Quantitativos) foram usadas para localizar no genoma alvos para seleção assistida por marcadores (MAS – *Marked-Assisted Selection*). A abordagem por QTL foi de certa forma o primeiro passo na aplicação das metodologias moleculares em programas de melhoramento genético. Com o avanço no sequenciamento



Figura 6. Exemplos de chips de DNA para genotipagem de SNPs

de genomas e com a utilização de metodologias laboratoriais que possibilitem o isolamento de SNPs (ver recomendação de leitura), a maior cobertura dos SNPs em todo o genoma permite avaliar a associação de diversos genes na expressão de um fenótipo de interesse, já a seleção assistidas por marcadores (MAS) está limitada por uns poucos QTLs que apresentem associação significativa com marcadores genéticos do tipo AFLP e microssatélites. Desta forma, atualmente tem se utilizado a terminologia GS (*Genomic Selection* – Seleção Genômica) para diferenciar as diferentes abordagens utilizadas entre MAS baseada em QTLs e GS baseada em SNPs.

Sequenciamento de genomas de peixes: até onde chegamos

O primeiro genoma integralmente sequenciado de um vertebrado não humano foi o de um peixe em 2003. O peixe em questão pertence à espécie *Fugurubripes*, também conhecido como torafugu, um tipo de baiacu muito apreciado na culinária japonesa. Depois desta espécie, uma série de outras espécies de peixes de interesse como modelo biológico foi incluída em projetos de sequenciamento integral de genomas, tais como: *Oryzias latipes* (medaka), *Latimeria chalumnae*, (celacanto), *Danio rerio*, (zebrafish ou paulistinha), *Xiphophorus maculatus* (platyfish – peixe ornamental), *Takifugu rubripes* (puffer fish) e outras espécies de diferentes ordens.

Entre as espécies de interesse para aquicultura, iniciativas no sentido de produzir o sequenciamento completo de genomas tem se concentrado em espécies, como salmão do Atlântico, truta arco-íris, tilápia do Nilo, bagre americano de canal, *European sea bass* (robalo europeu), *gilthead sea bream* (dourada) e bacalhau (*Gadus morhua*). Destas espécies, dois projetos de sequenciamento do genoma devem ser destacados. Em junho de 2014, em uma conferência em Vancouver, foi tornado público o genoma do salmão do Atlântico um esforço internacional entre a Noruega, Chile e Canadá. Além da importância da salmicultura para indústria aquícola no mundo, o sequenciamento do genoma do salmão foi um grande desafio técnico, pois enquanto a maioria dos organismos possuem duas cópias de cada cromossomo, os salmões passaram por um processo de tetraploidização em sua evolução e possuem quatro cópias de cada cromossomo, sendo assim, um gene pode estar presente em quatro cópias o dificultou a montagem final do genoma do salmão.

Outra espécie de grande importância econômica, inclusive para o Brasil, cujo genoma está em processo de sequenciamento é a tilápia do Nilo. Este projeto está sendo conduzido pelo Instituto Broad do Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT) e pela Universidade de Harvard. A liberação das sequências completas do genoma do salmão e da tilápia será um passo importante para vários grupos de pesquisa e empresas da área de aquicultura que terão em mãos informações importantes para se entender melhor o processo de seleção e usar melhor as informações contidas no genoma para produzir variedades genéticas mais produtivas, mais resistentes a doenças, com melhor conformação corporal entre outras características produtivas.

No Brasil projetos de sequenciamento de espécies neotropicais também estão oficialmente em andamento. A EMBRAPA está liderando dentro da Rede Genômica Animal o sequenciamento completo de duas espécies de importância para aquicultura nacional; o tambaqui e a cachara. O Brasil possui massa crítica científica na

área molecular e de bioinformática para gerar genomas de outras espécies tanto de importância econômica como biológica. O que outrora era um trabalho hercúleo de alto custo se tornou ao alcance de grupos que possuam expertise na área.

Naturalmente, o tema genômica é um tanto árduo e muitas vezes de difícil entendimento. De qualquer forma, é de reconhecimento de todos os envolvidos no setor aquícola que a incorporação das modernas metodologias genéticas na produção de peixes é fundamental para o futuro da aquicultura.

Estamos chegando ao fim de nossa jornada pelo mundo da genética. Em nosso último próximo artigo, vamos apontar e discutir alguns caminhos para o melhoramento genético na aquicultura no Brasil. Até a próxima. ■

Glossário

Chip de DNA: é uma superfície sólida, como uma lâmina de microscópio, que contém milhares de pontos nos quais são presos sequências de DNA de forma ordenada. Cada sequência de DNA é conhecida previamente, de maneira a se ligar a sequências de uma amostra de DNA de um indivíduo e com isto se estudar a expressão de um gene ou a presença ou ausência de um SNP.

QTL (*Quantitative Trait Loci*): são trechos de DNA que contêm um gene ou genes que estejam envolvidos em características de interesse econômico (caracteres quantitativos). A localização de tais regiões é feita indiretamente por marcadores moleculares tais como AFLP ou microssatélites.

Tetraploidização: processo de geração de indivíduos tetraploides, isto é, com 4 cópias de cada um dos cromossomos de uma espécie. Pode ser feito um processo no processo evolutivo com no caso de salmões ou por manipulação cromossômica em laboratório.

Recomendações para leitura:

- Almuly, R. Poleg-Danin, Y., Gorshkov, S., Gorshkova, G., Rapoport, B., Soller, M., Kashi, Y., Funkenstein, B. 2005.** Characterization of the 5' flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter. *Fisheries Science* 71: 479-490.
- Borrell, Y.J., Álvarez, J., Vázquez, E., Pato, C. F., Tapia, C.M., Sánchez, J.A., Blanco, G. 2004.** Applying microsatellites to the management of farmed turbot stocks (*Scophthalmus maximus* L.) in hatcheries. *Aquaculture* 241: 133-150.
- Davey, J.W., Hohenlohe, P.A., Etter, P.D., Boone, J.Q., Catchen, J.M., Blaxter, M.L. 2011.** Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 12: 499-510.
- Liu, S., Sun, L., Li, Y., Sun, F., Jiang, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Feng, J., Kaltenboeck, L., Huseyin Kucuktas, H., Liu, Z., 2014.** Development of the catfish 250K SNP array for genome-wide association studies. *BMC Research Notes* 7:135 (1-12).
- Liu, Z.J., Cordes, J.F. 2004.** DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Moreira, A.A., Hilsdorf, A.W.S., Silva, J.S., Souza, V.R., 2007.** Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 521-526.
- O'connell, M., Wright, J.M. 1997.** Microsatellite DNA in Fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 331-363.
- Ozerov, M., Vasemagi, A., Wennevik, V., Diaz-Fernandez, R., Kent M, et al. 2013.** Finding Markers that Make a Difference: DNA Pooling and SNP-Arrays Identify Population Informative Markers for Genetic Stock Identification. *PLoS ONE* 8(12): e82434.
- Streelman, J.T., Kocher, T.D. 2002.** Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia. *Physiology Genomics* 9: 1-4.
- Van Bers, N.E., Crooijmans, R.P., Groenen, M.A., Dibbits, B.W., Komen, J. 2012.** SNP marker detection and genotyping in tilapia. *Molecular Ecology Resources* 12: 932-941.
- Xiao-Gu, Z., Jin-Gou, T., Bang-Xi, X. 2006.** Applications of microsatellite markers in studies of genetics and breeding of fish. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 3: 83-87