

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA DE
LINHAGENS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E
DAS GERAÇÕES G₀ E F₁ DA LINHAGEM GIFT

Autor: Enio Lupchinski Junior
Orientador: Prof. Dr. Lauro Vargas
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Eliane Gasparino

Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Janeiro - 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA DE
LINHAGENS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E
DAS GERAÇÕES G₀ E F₁ DA LINHAGEM GIFT

Autor: Enio Lupchinski Junior
Orientador: Prof. Dr. Lauro Vargas
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Eliane Gasparino

Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Janeiro - 2007

“Pluralitas non est ponenda sine neccesitate”

Da Navalha de Occam
Willian of Ockham, 1285-1349

Ao meu amado pai Enio
À minha amada mãe Vera

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha existência a este incrível Universo, tão amplo e complexo, e até mesmo improvável.

Aos meus pais, que foram fundamentais para o meu êxito em mais esta trajetória e, em muitas outras. Por todo o apoio, que eles sempre me dispensaram...

A segunda esposa do meu pai, a Dona Otília, pela longa convivência, pelo onipresente apoio, e pela paciência. E, também pelo zelo referido ao “Seu Élvio” (alcunha carinhosa dispensada ao pai).

Ao meu orientador Prof. Dr. Lauro Vargas pela convivência de tanto tempo. Pelo apoio incondicional. Pelos incentivos, elogios, e, sobretudo, todas as oportunidades que fez questão de me proporcionar.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões pertinentes, os doutores Alberto, Claudete, Lauro Vargas, Ricardo e Rodolfo. Em especial ao Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro pela colaboração na minha formação, simpatia e postura diferenciada.

Ao pessoal da estação de piscicultura da UEM, Zé Geraldo, Vítor e Cleiton pela colaboração e boa vontade na colheita de nadadeiras das linhagens Bouaké e GIFT.

Aos proprietários e gerência da Aquacultura Tupi, por gentilmente terem cedido suas matrizes da linhagem Chitralada, também para a colheita de nadadeiras.

A intrépida trupe de amplas atividades, os amigos Paulo Prohmann, Danilo, Lenzi, “Wagnão”, Petrônio, Mexia, Geron e, muitos outros...

Ao pessoal da forragem, Prof. Ulysses, Lelê, Cláudio e Miraca, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus companheiros “holandeses” de república, mesmo que por pouco tempo: Guido, Roberto e Jeroen; em uma fase difícil...

Ao Jayme Povh, pela amizade e ajuda na execução das análises. A todos os colegas de laboratório pela compreensão, auxílio e boa vontade sempre demonstrada.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado, fundamental à realização do mesmo.

Ao PPZ por permitir a realização de um sonho...

Um agradecimento especial à Emilyn Midori Maeda, que muito me apoiou, principalmente na reta final deste desafio. Muito Obrigado!!!

Finalmente, a todos que possa ter esquecido de citar, mas que me auxiliaram das mais diversas e imagináveis maneiras... Direta e indiretamente. Consciente e inconscientemente. Agradeço...

BIOGRAFIA

Enio Lupchinski Junior nasceu no dia 06 de maio de 1971 no Hospital da Aeronáutica de Recife-PE. Filho de Enio Lupchinski e Vera Lúcia Larocerie Lupchinski. Àquela época, seu pai, militar e gaúcho, servia no Serviço Regional de Proteção ao Vôo (SRPV-RF).

Graduou-se em Ciências Náuticas pela Escola de Formação de Oficiais da Marinha Mercante no ano de 1993, em Belém-PA.

Graduou-se em Oceanologia pela Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG) no ano de 2001, em Rio Grande-RS.

Pós-graduou-se em 2003, quando concluiu o Mestrado em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá-PR.

Iniciou o doutorado em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá em 2003, o qual foi concluído com a presente Tese de Doutorado, defendida em 31 de janeiro de 2007.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
I-INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1 Tilápias	02
1.2 Marcadores moleculares	05
1.3 Melhoramento genético	12
1.4 Referências	14
II-OBJETIVOS GERAIS	19
III-Avaliação por RAPD da composição genética de três linhagens de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	20
Resumo	20
Abstract	20
Introdução	20
Material e Métodos	22
Resultados e Discussão	25
Conclusões	38
Referências	38
IV-Avaliação das gerações G ₀ e F ₁ da linhagem GIFT de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) por RAPD	43
Resumo	43
Abstract	43
Introdução	43

Material e Métodos	46
Resultados e Discussão	48
Conclusões	57
Referências.....	57
V- CONCLUSÕES GERAIS	61

LISTA DE TABELAS

	Página
<u>Artigo 1:</u>	
TABELA 1. Seqüência de nucleotídeos dos <i>primers</i> de RAPD utilizados, porcentagem G + C, número total de lócus, número de lócus polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para as tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>).	26
TABELA 2. Valores médios de divergência genética das linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT, de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>), obtidos pelos complementos dos coeficientes de Jaccard.....	28
TABELA 3. Valores médios para a diversidade genética de Nei entre populações (G_{st}), e estimativa para o fluxo gênico (N_m) para as linhagens Bouaké em relação à Chitralada (BC), Bouaké em relação à GIFT (BG), e Chitralada em relação à GIFT (CG), de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>).	30
TABELA 4. Índice de Shannon das linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT (<i>O. niloticus</i>).	34
<u>Artigo 2:</u>	
TABELA 1. Seqüência de nucleotídeos utilizados, porcentagem G + C, número total de lócus e tamanho dos fragmentos amplificados para a linhagem GIFT, de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>).	49
TABELA 2. Índices de Shannon para as gerações G_0 e F_1 , da linhagem GIFT.	51
TABELA 3. Valores médios de divergência genética para as gerações G_0 e F_1 , da linhagem GIFT, obtidos pelos complementos dos coeficientes de Jaccard.	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Dendrograma das linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT (<i>O. niloticus</i>), obtido pelo coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA. B1-B23: linhagem Bouaké. C1-C23: linhagem Chitralada. G1-G23: linhagem GIFT.....	36

RESUMO

O desenvolvimento da linhagem GIFT de *Oreochromis niloticus* chamou atenção pelo pioneirismo na história do melhoramento genético em peixes tropicais. No Brasil, a Estação Experimental de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM-CODAPAR) recebeu os primeiros exemplares da linhagem GIFT, em março de 2005. O objetivo do primeiro trabalho foi estimar pela técnica RAPD, a estrutura genética de três linhagens comerciais de tilápia do Nilo (Bouaké, Chitralada e GIFT). Os valores de divergência genética foram de 0,262 para a linhagem Bouaké, 0,366 para a Chitralada, e 0,318 para a GIFT. Os valores de G_{st} e N_m foram de 0,081 e 5,708, 0,106 e 4,238, e 0,070 e 6,656, para a linhagem Bouaké em relação à Chitralada, Bouaké em relação à GIFT, e Chitralada em relação à GIFT, respectivamente. Os valores para o índice de Shannon foram iguais a 0,473 para a Bouaké, 0,544 para a Chitralada, e 0,469 para a linhagem GIFT. Os resultados indicaram que as linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT, não perderam variabilidade ou divergência genética de modo significativo ao longo de seu estabelecimento. O conjunto de dados indicou, ainda, que não houve alterações genéticas importantes em nenhuma das três linhagens de tilápia do Nilo. O objetivo do segundo trabalho foi analisar pela técnica RAPD, a variabilidade e a divergência genética entre as duas primeiras gerações de tilápias GIFT cultivadas no Brasil (G_0 e F_1). A geração G_0 apresentou 69,6% de loci polimórficos e, a geração F_1 , 60,0% de polimorfismo. Os valores do índice de Shannon foram iguais a 0,367 para a geração parental (G_0), e 0,317 para a progênie (F_1). Os valores de divergência genética foram de 0,213 (G_0) e 0,208 (F_1). Os resultados obtidos demonstraram que houve perda da variabilidade genética na passagem da geração G_0 para a F_1 . Também indicaram uma alta variabilidade genética para as gerações G_0 e F_1 . O conjunto de dados indicou, ainda, que a diversidade genética foi mantida durante o estabelecimento da linhagem

GIFT. A técnica RAPD demonstrou ser eficaz para a análise da estrutura genética das linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT; bem como para as duas gerações cultivadas da linhagem GIFT de *O. niloticus*.

Palavras-chave: Variabilidade genética, Divergência genética, Índice de Shannon, linhagem GIFT.

ABSTRACT

In tropical fishes, the GIFT strain development of *O. niloticus* called attention by the world's genetic improvement history. In Brazil, the "Estação Experimental de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá" (UEM – CODAPAR) received the first specimens of GIFT strain, in March 2005. The objective of the first study was to estimate, through the RAPD technique, the genetic structure of three commercial Nile tilapia strains (Bouaké, Chitralada and GIFT). The genetic divergence values were 0.262 to Bouaké, 0.366 to Chitralada and 0.318 to GIFT strain. The G_{st} and N_m values were 0.081 and 5.708, 0.106 and 4.238, and, 0.070 and 6.656, for Bouaké related to Chitralada, Bouaké to GIFT, and Chitralada to GIFT strain, respectively. The index of Shannon values were 0.473 to Bouaké strain, 0.544 to Chitralada, and 0.469 to GIFT. The results indicated that the strains did not lose genetic variability or divergence in a significant way. The data group also indicated that there were no significant genetic alterations in any of the three Nile tilapia strains. The aim of the second research study was to analyze, through the RAPD technique, the genetic variability and divergence from the two first GIFT generations raised in Brazil (G_0 and F_1). The polymorphic *loci* percentages were 69.6% to the G_0 generation and 60.0% to the F_1 generation. The Shannon index values were 0.367 to the breeders (G_0) and 0.317 to the offspring (F_1). The values of genetic divergence were 0.213 to G_0 , and 0.208 to F_1 . The results demonstrated that there was a genetic variability loss from G_0 to F_1 generation. Also, indicated a high genetic variability in both G_0 and F_1 generations. The data group indicated, in addition, that the genetic diversity was kept during the GIFT strain establishment. The RAPD technique was a useful tool to the genetic structure analysis of Bouaké, Chitralada and GIFT strains; as well as to the two raised GIFT Nile tilapia generations.

Key words: Genetic variability, Genetic divergence, Index of Shannon, GIFT strain.

I. INTRODUÇÃO

O crescimento da população humana mundial exige um aumento constante na produção de alimentos. Este aumento deve ser realizado utilizando-se preferencialmente métodos de produção que diminuam os custos envolvidos e que utilizem os recursos naturais de modo racional (Dória e Leonhardt, 1995).

A aqüicultura é uma importante fonte alimentar, somada à pesca, é responsável por aproximadamente 15% da proteína animal consumida mundialmente. Tem relevância em várias regiões do mundo, sobretudo nos países asiáticos (FAO, 2002).

A produção aqüícola mundial passou de 26,7 milhões de toneladas em 1996, para 35,6 milhões de toneladas em 2000 (FAO, 2002). Dados mais recentes indicaram que a aqüicultura mundial produziu 59,4 milhões de toneladas em 2004 (FAO, 2006), fatos que denotam o rápido crescimento da atividade.

A América Latina elevou sua produção total aqüícola de 145 mil toneladas em 1988 para 838 mil toneladas em 2000. Juntos, a América Latina e Caribe destacaram-se pela taxa de crescimento anual de 21,3%, a maior taxa de crescimento regional registrada em todo o mundo; para o período de 1950 a 2004 (FAO, 2006).

No Brasil, a aqüicultura produziu aproximadamente 30.000 toneladas no início dos anos noventa, 176.531 toneladas em 2000, e, 278.128 toneladas em 2003 (FAO, 2005). Ainda com referência aos dados da FAO (2005), os peixes cultivados somaram 61% das 278.128 toneladas produzidas, ou seja, representaram 171.187 toneladas de peixes.

A demanda por peixe tem aumentado, acompanhando o crescimento da população humana. A busca de um sustento lucrativo e o conhecimento dos benefícios do peixe como alimento têm sido reconhecidos em todo do mundo (Gupta e Acosta, 2004).

Segundo Bentsen *et al.* (1998), as tilápias são amplamente reconhecidas como as espécies, na aquíicultura de água doce, com maior potencial para diversos sistemas de cultivo, desde o cultivo familiar em pequena escala, até sistemas superintensivos. Entre as diversas espécies de tilápia, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a mais comum na aquíicultura mundial (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998).

Na América Latina e Caribe, o cultivo de tilápias cresceu substancialmente entre 1993 e 2003, este fato está relacionado com o aumento do consumo nos Estados Unidos e na União Européia, e com a abertura de novos mercados. Como reflexo, a produção de tilápias cresceu de 24.100 toneladas em 1993 para 127.000 toneladas em 2004 (FAO, 2005).

O Brasil apresenta um dos crescimentos mais rápidos na indústria da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) nas Américas. A produção de tilápias no país foi de 30.000 toneladas em 1997, com uma projeção de 125.000 toneladas para o ano de 2010 (Fitzsimmons, 2000).

Segundo dados do IBAMA (2005), em 2004 o país produziu cerca de 69.000 toneladas de tilápias. Esta produção de 69.078 toneladas/ano, em 2004, elevou o país a sétima colocação entre os maiores produtores mundiais de tilápias (FAO, 2006).

O estado do Paraná está entre os maiores produtores nacionais de peixes cultivados de água doce produziu mais de 16.500 toneladas na safra de 2004, sendo que tilapicultura foi representada por 11.921,5 toneladas, o que coloca o estado como o segundo maior produtor nacional de tilápias (IBAMA, 2005).

1.1 Tilápias

Atualmente, a definição de tilápia é usada como o nome comum de um grande número de espécies dentro da tribo de ciclídeos *Tilapiini*, particularmente as espécies dos gêneros *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*; em especial as exploradas pela pesca e utilizadas na aquíicultura (Kubitza, 2000; McAndrew, 2000).

Ainda segundo McAndrew (2000), os tilapíneos são formados por um conjunto de espécies exclusivamente africanas. O gênero *Tilapia* é amplamente distribuído, mas nenhuma população nativa foi reconhecida a leste da cadeia de montanhas africanas *Rift Valley* orientais, ou nos rios que deságuam no Oceano Índico, ao norte do Rio Zambesi. Este gênero é comum nos rios e lagos da África ocidental e central. O gênero *Sarotherodon* reúne quase que exclusivamente espécies presentes na África ocidental.

As espécies do gênero *Oreochromis* são abundantes nos lagos e rios do *Rift Valley* e nos rios que drenam para o Oceano Índico. Elas são raras nas regiões da África ocidental, com exceção de *Oreochromis niloticus* e *O. aureus* na região do Rio Nilo no Sudão. Assim, as espécies dos gêneros *Tilapia* e *Sarotherodon* são mais comuns na África ocidental, enquanto que as de *Oreochromis* tendem a ser encontrada nos corpos d'água da África central e oriental.

A tilapicultura, inicialmente uma atividade em caráter de subsistência, começou a se expandir rapidamente durante a segunda metade do século XX. Esta expansão ocorreu tanto geograficamente como em produção total. Originalmente encontrada na África e Oriente Médio (Stickney, 2000; Romana-Eguia *et al.*, 2004), a tilápia foi introduzida na Ásia tropical nos anos trinta, e continuou a sua expansão para a América do Norte, América Latina, e Europa nos anos cinquenta (Stickney, 2000).

A adaptabilidade e tolerância das tilápias a um grande número de ambientes têm resultado em uma rápida expansão do seu cultivo entre criadores de baixa renda, como ocorreu na Ásia, desde sua introdução na aquicultura daquela região, fato que se intensificou por volta do ano de 1965 (Bentsen *et al.*, 1998). Segundo Eknath *et al.* (1993), o cultivo destas espécies dá sustentação para muitos produtores, e dentre uma ampla variedade de tilápias cultivadas a mais amplamente distribuída é a tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Froese e Pauly (2004) salientaram que, apesar da origem africana, a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) já foi introduzida com sucesso em, pelo menos, 87 países.

A Ásia e o Pacífico representam os maiores produtores mundiais de tilápia. Em 1999, cerca de 80% da produção total pertenceu ao continente asiático, com destaque para a China (Romana-Eguia *et al.*, 2004).

A tilapicultura no Brasil sofreu um avanço substancial nos anos noventa, quando o sistema de produção de monosexo masculino e alimentação peletizada tornaram-se amplamente disponíveis (Lovshin, 2000). Ainda segundo o autor, pelo menos cinco linhagens de tilápia do Nilo foram introduzidas no Brasil, dentre elas destacaram-se as linhagens Bouaké, Chitralada e a tilápia vermelha, híbrido resultante de vários cruzamentos.

Os maiores produtores nacionais de tilápias em 2004 foram os seguintes estados: Ceará, com 18.000 toneladas, Paraná com 11.922, São Paulo com 9.758, Bahia com 7.137, e Santa Catarina com 7.121 toneladas produzidas (IBAMA, 2005).

Segundo Moreira (1999) e Kubitzka (2000) a linhagem de tilápia do Nilo denominada Bouaké é originária da Costa do Marfim, região oeste da África; a

linhagem Chitralada teve origem no Egito, foi levada para o Japão e, posteriormente, importada pela Tailândia, onde passou por várias gerações de cultivo e domesticação.

A primeira linhagem de tilápia do Nilo introduzida no Brasil foi a Bouaké, no estado do Ceará, constituída por 60 exemplares importados da Costa do Marfim, no ano de 1971 (Castagnolli, 1992). A tilápia do Nilo da linhagem Chitralada foi importada posteriormente, chegou ao país em 1996, quando foram adquiridos 20.800 indivíduos por produtores do Paraná (Zimmermann, 1999).

O projeto de pesquisa denominado GIFT (*The Genetic Improvement of Farmed Tilapia* - GIFT), liderado pelo órgão *International Center for Living Aquatic Resources Management* – ICLARM, que posteriormente passou a se chamar *WorldFish Center*, foi fundado e co-financiado pelo Banco de Desenvolvimento da Ásia (ADB) e pelo Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas/Divisão para Programas Inter-regionais e Globais (UNDP/DGIP) e, suas atividades tiveram início em abril de 1988 (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004; Li *et al.*, 2006).

O projeto GIFT começou por comparar as taxas de crescimento de quatro linhagens comerciais de tilápias cultivadas na Ásia, e quatro linhagens silvestres de tilápias de origem africana, em vários ambientes diferenciados, nas Filipinas (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004). Eknath *et al.* (1993) afirmaram que um dos objetivos iniciais do projeto GIFT foi tornar bem documentado o germoplasma de tilápias da África e Ásia, para o estabelecimento da população base a partir da qual a linhagem de tilápias geneticamente melhoradas seria desenvolvida.

A intenção de formar uma ampla base genética antes de começar o programa de melhoramento genético (Gupta e Acosta, 2004), e também o intuito de testar o desempenho relativo dos genótipos frente a diferentes ambientes de cultivo, somaram-se durante a avaliação das oito precursoras da linhagem GIFT (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998). Posteriormente, o *WorldFish Center* e seus parceiros na Noruega e Filipinas elaboraram as bases do seu programa de reprodução seletiva, este programa foi baseado em dados colheitados nesta fase inicial do projeto GIFT (Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004).

O desenvolvimento da linhagem melhorada GIFT de *O. niloticus* chamou a atenção pelo pioneirismo na história do melhoramento genético em peixes tropicais. Entretanto, o *WorldFish Center* e seus parceiros reconhecem que este é apenas o começo, pois a linhagem, desenvolvida sob condições ambientais típicas das Filipinas,

precisa ter sua performance avaliada em diferentes condições agro-ecológicas, e até mesmo em diversos países, antes de sua disseminação plena (Gupta e Acosta, 2004).

O *WorldFish Center* exerce uma política de transferência da linhagem e tecnologia GIFT a diferentes países, sobretudo os denominados “em desenvolvimento”. Dentre os países da América Latina, o Brasil foi identificado como o primeiro candidato para este empreendimento. Neste sentido, a Estação Experimental de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM-CODAPAR) recebeu os primeiros exemplares da linhagem GIFT, em março de 2005. Foram recebidos indivíduos oriundos de 30 famílias da linhagem GIFT, a partir de um projeto elaborado em conjunto com o *WorldFish Center*, com o apoio da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca – SEAP.

1.2 Marcadores moleculares

Desde a redescoberta dos princípios de Mendel, no início do século XX, o foco de atenção dos geneticistas passou a ser o gene, como unidade fundamental da variação biológica. Com o desenvolvimento da genética de populações, surgiu o conceito da utilização de genes individuais como marcadores, com a finalidade de fazer inferências sobre as características de uma população. Além disto, a possibilidade de analisar a segregação de genes marcadores, para localizar e estimar o efeito de poligenes que controlam características de interesse para o melhoramento de espécies, fomentou o estudo de marcadores (Regitano, 2001a).

Entretanto, o pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem reduzia a probabilidade de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e caracteres de importância econômica (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Ou seja, só eventualmente eram identificados os marcadores morfológicos ligados a genes de importância econômica.

Segundo Regitano (2001a), marcadores genéticos apresentam herança mendeliana simples, isto possibilita a inferência do genótipo a partir do fenótipo do indivíduo, permitindo que a segregação do gene marcador seja acompanhada. A análise da segregação necessita da presença de pelo menos duas formas alélicas, ou seja, a existência de polimorfismo no locus marcador.

Até meados dos anos 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como por exemplo, nanismo ou coloração

(Ferreira e Grattapaglia, 1996). Entretanto, segundo Marques *et al.* (2002), apesar desta forma de análise morfológica ainda poder ser empregada na geração de importantes informações, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular cada vez mais tem aumentando sua contribuição para os estudos genéticos tradicionais.

Além destes aspectos, marcadores morfológicos apresentam a desvantagem de ser identificado, em sua maioria, no indivíduo adulto ou bem desenvolvido (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Por outro lado, marcadores moleculares, principalmente de DNA, permitem que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão antes mesmo da expressão do seu fenótipo. Em outras palavras, pode-se determinar o potencial genético de um embrião sem que seja necessário avaliar a sua produção ou de sua progênie (Coutinho e Regitano, 2001).

As técnicas empregadas atualmente na biologia molecular permitiram aos geneticistas e melhoristas que trabalham com peixes, estudar diretamente as variações em nível de DNA, podendo analisar todo o genótipo dos animais (Moreira, 2001). McManus e Bowles (1996) afirmaram, ainda, que a análise da seqüência de DNA oferece uma abordagem mais direta para a caracterização de distintas espécies, subespécies e linhagens.

Especificamente em relação a peixes, Mia *et al.* (2005) afirmaram que vários tipos de marcadores genéticos estão sendo desenvolvidos com potencial de aplicação tanto na pesca quanto na aqüicultura. O uso adequado destes marcadores permite a diferenciação entre populações, espécies e indivíduos.

A aplicação da técnica da reação em cadeia da enzima polimerase (PCR- *Polymerase Chain Reaction* - Saiki *et al.*, 1985; Mullis e Fallona, 1987), permite que uma pequena quantidade de material genético seja muitas vezes amplificada, e isto possibilitou o desenvolvimento dos estudos de genética molecular (McManus e Bowles, 1996).

A observação da diversidade do genoma pode ser determinada por métodos baseados em PCR (Monnier *et al.*, 1996). E, a propriedade de amplificar seletivamente uma região específica do genoma, a partir de uma pequena amostra de DNA, fez da técnica de PCR uma poderosa ferramenta para aplicação nos estudos ligados à genética (Monis e Andrews, 1998).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), a PCR causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos

fundamentais, como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e o melhoramento genético de plantas e animais.

O uso de marcadores moleculares que empregam PCR representa uma importante redução no tempo despendido para a identificação de genótipos, além de permitir a sua identificação a partir de quantidades mínimas de material biológico, como por exemplo, biópsia de embriões e evidências forenses (Regitano, 2001a).

Várias estratégias para a geração de marcadores moleculares estão sendo empregadas, muitas destas para analisar a estrutura da população de organismos aquáticos (Yan *et al.*, 2005). Entre elas, a utilização de isoenzimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), DNA *fingerprinting* com sondas multifocais, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites (Coutinho e Regitano, 2001; Yan *et al.*, 2005).

Segundo McManus e Bowles (1996) e Ferreira e Grattapaglia (1996), na técnica de RAPD, uma variação da técnica de PCR tradicional, bandas distintas ou fragmentos podem servir como marcadores moleculares de uma espécie, linhagem ou grupo de indivíduos. Sendo que a principal vantagem da técnica é que não há necessidade de um conhecimento prévio do genoma dos organismos (McManus e Bowles, 1996; Dahle *et al.*, 1997; Rollinson *et al.*, 1997; Chambers *et al.*, 1998; Barman *et al.*, 2003). A técnica de RAPD envolve o uso de *primers* randômicos curtos, geralmente com 10 bases, em um protocolo de PCR de baixa seletividade: os *primers* se anelam a diversos locais homólogos no genoma para gerar fragmentos de DNA através da amplificação subsequente. Diferentes *primers* geram dados de diferentes regiões do genoma, fazendo desta, a técnica ideal para investigação da variação genética (Rollinson *et al.*, 1997). Com este método, há a possibilidade do uso de um número praticamente ilimitado de *primers*, cada um detectando a variação em diversas regiões do genoma (Dahle *et al.*, 1997; Oliveira, *et al.*, 2002).

As reações de PCR-RAPD permitem a amplificação “aleatória” de múltiplos fragmentos de DNA, com a cobertura de praticamente todo o genoma (Chambers *et al.*, 1998; Monis e Andrews, 1998). Os fragmentos são separados pela eletroforese, e, o padrão de bandas resultante pode ser usado como *fingerprinting* para comparar diferentes linhagens (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Monis e Andrews, 1998), sendo considerada uma metodologia simples e de rápida execução (Kaukas *et al.*, 1994; Dahle *et al.*, 1997; Bártfai *et al.*, 2003).

A técnica de RAPD representa um método alternativo na análise de variações inter e intra-específicas, sendo mais econômica e consumindo menos tempo em relação a outros métodos, como RFLP e o sequenciamento do DNA (Chambers *et al.*, 1998). Os dados são obtidos de todo genoma, e não apenas de genes específicos, e incluem tanto fragmentos pequenos de rápida migração quanto fragmentos maiores. Este método parece ser mais adequado para a análise das relações filogenéticas de espécies intimamente relacionadas.

Dias Neto (1993) confirmou a utilidade da técnica de RAPD para a segregação e identificação de linhagens e espécies de parasitas do gênero *Schistosoma*. Bem como Singh (1997), que afirmou que esta técnica permite a análise da variação genética e a obtenção de *fingerprinting* de diversas linhagens de parasitas, como *Leishmania*, *Cryptosporidium*, *Tripanosoma* e *Giardia*.

Esta técnica pode ser empregada em uma diversa gama de organismos (Rollinson e Stothard, 1994). Segundo Chambers *et al.* (1998) tem sido usada regularmente para detectar variações intra-específicas, e também variações específicas, em protozoários, gastrópodes e peixes. Também tem sido usada como ferramenta na análise de linhagens de ratos, e, entre diferentes espécies de peixes e moluscos (Dahle *et al.*, 1997). De fato, tem sido amplamente utilizada para detectar a diversidade genética em plantas, animais e microorganismos (Barman *et al.*, 2003).

A análise por RAPD tem sido também utilizada para a identificação de espécies e subespécies de peixes, como por exemplo, no lebiste *Poecilia reticulata* (Dinesh *et al.*, 1993), em tilápias do gênero *Oreochromis* (Bardakci e Skibinski, 1994; Dinesh *et al.*, 1996), salmonídeos (Elo *et al.*, 1997), ictalurídeos (Liu *et al.*, 1998) e carpas indianas, da família Cyprinidae (Barman *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005).

No Brasil, diversos trabalhos estão sendo realizados com o uso de marcadores moleculares em peixes. Oliveira *et al.* (2002) utilizaram RAPD para estimar a diversidade genética em populações silvestres, o que permitiu isolar com êxito duas espécies do gênero *Steindachnerina* da bacia do Rio Paraná.

Prioli *et al.* (2002) realizaram a identificação da espécie *Astyanax altiparanae* com a utilização de marcadores moleculares baseados em DNA mitocondrial e RAPD. O conjunto de dados demonstrou que a espécie anteriormente denominada *Astyanax bimaculatus* pertence, na realidade, a espécie *Astyanax altiparanae*. A similaridade genética entre as três populações analisadas foi tão elevada, que não é consistente afirmar que existem duas espécies do gênero *Astyanax* naquele trecho do Rio Paraná.

Ou seja, a técnica RAPD pode ser usada com sucesso para complementar os estudos de filogenia e sistemática em populações naturais de peixes, nos níveis específicos e subespecíficos (Almeida *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Prioli *et al.*, 2002).

Em peixes cultivados, Povh *et al.* (2005) avaliaram a divergência genética nas linhagens Bouaké e Chitralada, de tilápia do Nilo (*O. niloticus*). E, concluíram que a técnica por RAPD foi eficaz para diferenciar estas duas linhagens. Assim como Lopera Barrero *et al.* (2007) consideraram a técnica uma ferramenta poderosa para a análise genética da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) cultivada em duas localidades no sudoeste do estado de São Paulo.

Dahle *et al.* (1997) reafirmaram que o marcador RAPD é útil para a identificação em nível específico e para a diferenciação entre populações assemelhadas, principalmente em casos onde os caracteres morfológicos não permitem uma distinção precisa ou uma rápida identificação. Ferramentas moleculares associadas a análises morfológicas têm sido aplicadas efetivamente na definição do relacionamento entre peixes em diferentes níveis, incluindo gênero e espécie (Prioli *et al.*, 2002).

Resumidamente, as vantagens na aplicação do método incluem: a pequena quantidade de DNA genômico necessária, quando comparada a outros métodos baseados em PCR, a ausência de conhecimento prévio do genoma em questão, a geração de uma grande quantidade de polimorfismo distribuído por todo o genoma, a visualização direta das bandas nos géis; e, em contraponto, não necessita de experiência aprofundada, nem tampouco instalações de laboratório sofisticadas para sua execução (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

Apesar dos ensaios de RAPD estarem sendo usados desde seu desenvolvimento, nos anos noventa (Welsh e MacClelland, 1990; Willians *et al.*, 1990), para elucidar problemas de ordem taxonômica em muitos organismos (Rollinson e Stothard, 1994; Barman *et al.*, 2003), este marcador apresenta algumas limitações. Estas limitações incluem: sua natureza randômica, a sensibilidade das condições de reação, a não caracterização dos múltiplos lócus genômicos; a natureza dominante dos marcadores e a possibilidade de co-migração de fragmentos diferentes no produto amplificado (Barman *et al.*, 2003; Loeffler e Morden, 2003).

A qualidade dominante do polimorfismo gerado por RAPD, em conjunto com a alta sensibilidade às condições de amplificação e a possível dificuldade de comparação dos resultados entre laboratórios, podem dificultar o uso deste marcador para a análise de populações (Dahle *et al.*, 1997). Monis e Andrews (1998) reafirmaram que a

reprodutibilidade dos padrões do produto de amplificação é muito sensível às condições empregadas e pode variar de acordo com equipamentos ou reagentes, entre distintos laboratórios.

Segundo diversos autores, há uma clara dificuldade de se estabelecer padrões de herança através do marcador RAPD, devido à natureza dominante desta técnica (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Dahle *et al.*, 1997; Todd *et al.*, 1997; Barman *et al.*, 2003; Loeffler e Morden, 2003).

Apesar das limitações, Monis e Andrews (1998) consideraram que esta técnica está sendo cada vez mais utilizada para caracterização de uma variedade de organismos, sobretudo em conjunto com outros métodos que empregam técnicas variantes da PCR. Barman *et al.* (2003) salientaram que se deve ter cuidado em conclusões sistemáticas baseadas apenas em análises por RAPD, porém elas podem ser de grande utilidade para as observações iniciais sobre variação genética, particularmente em espécies em que pouca informação está disponível.

Nos genomas dos eucariotos é observada grande quantidade de DNA repetitivo, classificado de acordo com o número de nucleotídeos e sua complexidade (Regitano, 2001a). Entre estes tipos de elementos estão as seqüências microssatélites. O alto polimorfismo destas seqüências é uma importante característica para estudo de indivíduos dentro e entre populações, no estudo de parentesco e na construção de mapas genéticos de alta precisão que possibilitam, por exemplo, a identificação de loci associados à doenças monogênicas e traços quantitativos (Regitano, 2001b; Yan *et al.*, 2005).

As características deste tipo de marcador o tornam ideal para o mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos para estudos de genética populacional. Sob o ponto de vista da biologia molecular, os marcadores microssatélites são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo por locus (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Alam e Islam (2005) reiteraram que estes marcadores são muito úteis na detecção de altos níveis de polimorfismo e alelos raros.

Segundo Regitano (2001a), esta técnica é de grande utilidade na identificação de indivíduos ou linhagens. Entretanto, a aplicação em estudos de populações pode ser dificultada por uma elevada variação intrapopulacional, dificultando o estabelecimento de um perfil característico, principalmente para aquelas populações que possuem uma ampla base genética.

Bártfai *et al.* (2003) compararam geneticamente duas variedades de carpa comum (*C. carpio*), por marcadores RAPD e microssatélite. Estes pesquisadores afirmaram que, como esperado, os marcadores microssatélite forneceram informações mais detalhadas do que os marcadores RAPD, sobre a diversidade genética e isolamento de alelos particulares. Porém, tanto a frequência das bandas (RAPD), quanto a frequência de alelos (microssatélite), foram muito similares, o que denota a utilidade de ambos os métodos na investigação da estrutura genética de carpas.

Os mesmos resultados foram obtidos por Yan *et al.* (2005), os quais afirmaram que, apesar do marcador microssatélite ter revelado informações mais detalhadas sobre a diversidade genética das carpas por eles estudadas, os resultados obtidos para os marcadores RAPD e microssatélite forneceram dados que levaram a conclusões semelhantes.

A filogenia e sistemática baseadas em métodos moleculares ocupam um papel crescente e privilegiado nos estudos atuais, especialmente nos casos em que os métodos tradicionais não podem ser aplicados (Monis, 1999). Como Prioli *et al.* (2002) destacaram, ferramentas moleculares associadas com análises morfológicas têm sido efetivamente aplicadas na definição do relacionamento entre peixes em diferentes níveis taxonômicos.

Os marcadores moleculares representam a metodologia mais realística para a pesquisa e monitoramento do *status* genético em fazendas de alevinagem e cultivo (Alam e Islam, 2005). Segundo Romana-Eguia *et al.* (2004), a maioria dos exemplares domesticados e melhorados dos estoques de tilápia do Nilo não foi geneticamente caracterizada, nenhum dos marcadores moleculares disponíveis foi devidamente aplicado.

Coutinho e Regitano (2001) afirmaram que o desenvolvimento destes marcadores deverá ter um papel de destaque, pois eles são ferramentas fundamentais no processo de seleção, desenvolvimento e aplicação em programas de melhoramento e, poderão determinar o êxito de um projeto neste mercado altamente competitivo. Ainda segundo os autores (Coutinho e Regitano, 2001), a piscicultura deverá seguir a mesma tendência, sobretudo em situações de cultivo intensivo e superintensivo.

Em conclusão, Monis e Andrews (1998) e Monis (1999), consideraram que os métodos baseados em marcadores moleculares podem ser usados com confiabilidade e precisão, desde que passem por testes e desenvolvimentos adequados e, obviamente, quando forem aplicados sob as limitações pertinentes a cada método.

1.3 Melhoramento genético

A biotecnologia possibilita a utilização de novas ferramentas para orientar o processo de melhoramento animal. Aliadas aos métodos tradicionais, as novas técnicas deverão acelerar o progresso genético observado nos animais domésticos (Coutinho e Regitano, 2001).

Além disso, a possibilidade de analisar a segregação de genes marcadores, e associá-los com características de interesse, permitindo localizar e estimar o efeito de poligenes que controlam estas características importantes para o melhoramento das espécies tem fomentado o estudo de marcadores (Regitano, 2001a).

O cruzamento seletivo é um método consagrado para várias espécies animais, buscando aumentar a produção e propiciar um manejo mais eficiente (Doupé e Lymbery, 2003). Segundo Olesen *et al.* (2003), a utilização de peixes pouco “domesticados” e inadequados chega a ser contrastante, quando comparada à criação de outros animais de produção. Contudo, apesar do cultivo de peixes se encontrar nos estágios iniciais da domesticação e melhoramento, já foram documentadas respostas rápidas em relação à seleção para o crescimento em diversas espécies (Olesen *et al.*, 2003).

Os estudos de genética e sua aplicação nos programas de reprodução tem sido responsáveis pelo aumento da eficiência de produção e tem melhorado a produtividade tanto na agricultura, quanto na produção animal. Na produção animal o sucesso das aplicações da genética é mais consistente para gado de leite e corte, e para aves e suínos (Gupta e Acosta, 2004).

Segundo Coutinho *et al.* (2001), em animais de produção, o processo de melhoramento genético tem gerado resultados particularmente interessantes. Neste procedimento, indivíduos são selecionados por várias gerações, resultando no aumento da frequência dos alelos associados com características fenotípicas desejáveis. Tal estratégia é empregada, por exemplo, na produção de frangos de corte, gerando entre 1% a 2% de aumento de ganho de peso ao ano.

Nas espécies terrestres, os programas de melhoramento genético têm acrescentado uma substancial contribuição para a produtividade e viabilidade da indústria produtiva. As espécies aquáticas também parecem ter um grande potencial a ser desenvolvido, devido a pouca aplicação de tecnologias de melhoramento genético até o momento (Ponzoni, 2003).

Os sistemas de produção de peixes, nos países em desenvolvimento, são amplamente baseados no uso de espécies e linhagens não melhoradas. Com o acúmulo de conhecimento e experiência no manejo, alimentação e no cuidado sanitário em tais sistemas de produção, a disponibilidade de animais geneticamente mais produtivos se torna imperativa na utilização dos recursos de modo racional (Ponzoni, 2003)

Uma importante variável que pode ser procurada em um programa de melhoramento genético é a eficiência da conversão alimentar, porém variações das condições de cultivo alteram este importante parâmetro. Tais condições podem ser identificadas como: temperatura da água, tamanho e idade dos peixes, arraçamento, valor nutricional dos alimentos, peso e composição corporal, exercícios físicos, e interações densidade-dependentes que incluem competição, antagonismo e estresse (Doupé e Lymbery, 2003).

Segundo Ponzoni *et al.* (2005), os ganhos anuais obtidos para a linhagem GIFT, em relação ao ganho de peso, foram na ordem de 10%, nas estações reprodutivas de 2002 e 2003. Entretanto, para a maioria dos animais aquáticos este valor varia entre 10% a 20%. Os autores atribuíram o fato à perda de marcação que ocorreu em alguns animais, durante a fase experimental.

O programa de melhoramento realizado em salmões na Noruega, a partir dos anos setenta, mostrou a efetividade deste procedimento em peixes. Atualmente, cerca de 80% de todos os salmões produzidos naquele país são oriundos de estoques geneticamente melhorados (Gupta e Acosta, 2004).

Bentsen *et al.* (1998) e (Li *et al.*, 2006) afirmaram que a necessidade de se melhorar a qualidade genética da tilápia do Nilo é amplamente reconhecida, e fundamental para assegurar o futuro da tilapicultura. Os autores reconheceram que o mesmo caminho que foi seguido no melhoramento de animais terrestres, deverá ser seguido para animais aquáticos.

Os programas de melhoramento genético em espécies aquáticas cultivadas podem aumentar a produtividade, desde que haja um rigoroso desenho experimental. Para tanto, são necessários o conhecimento e o controle de aspectos como a herdabilidade e as correlações dos parâmetros sob seleção. Estes parâmetros permitem a estimação de valores de reprodução para seleção dos candidatos na população, assim como a predição do potencial de resposta à seleção. Em tilápias do Nilo, por exemplo, o foco inicial dos programas de seleção tem se restringido, quase exclusivamente, à taxa de crescimento (Ponzoni *et al.*, 2005).

Nas espécies de animais aquáticos há, reconhecidamente, um grande potencial para a utilização do melhoramento genético, principalmente devido a pequena aplicação deste tipo de tecnologia até o momento (Ponzoni, 2003). Olesen *et al.* (2003) salientaram que em 1993, menos de 1% do material biológico utilizado para a aqüicultura era originado de programas de melhoramento genético, e desde então apenas alguns projetos vêm sendo desenvolvidos. Ou seja, há uma real necessidade que justifique o planejamento, desenho e implementação de pesquisa, desenvolvimento e transferência de tecnologia de programas de melhoramento genético para as espécies aquáticas (Ponzoni, 2003).

1.4 Referências

- ALAM, M.S.; ISLAM, M.S. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 246, n. 1/4, p. 151-160, 2005.
- ALMEIDA, F.S. *et al.* RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. *J. Zool.* Cambridge, v. 253, n. 1, p. 113-120, 2001.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, Oxford, v. 73, p. 117-123, 1994.
- BARMAN, H.K. *et al.* Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified Polymorphic DNA assay. *Aquaculture*, Orissa, v. 217, n. 1/4, p. 115-123, 2003.
- BÁRTFAI, R. *et al.* Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 219, n. 1/4, p. 157-167, 2003.
- BENTSEN, H.B. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v.160, n. 1/2, p. 145-173, 1998.
- CASTAGNOLLI, N. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189p.
- COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. Uso de Marcadores Moleculares na Indústria Animal. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. Brasília: EMBRAPA, 2001. cap. 1, p. 11-24.
- COUTINHO, L.L. *et al.* Desenvolvimento Embrionário da Musculatura Esquelética. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. Brasília: EMBRAPA, 2001. cap. 6, p. 103-121.
- CHAMBERS, R.J. *et al.* The use of randomly amplified Polymorphic DNA to analyse the genetic diversity, the systematic relationships and the evolution of intertidal limpets, *Siphonaria spp.* (Pulmonata: Gastropoda), with different reproductive modes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Amsterdam, v. 227, n. 1, p. 49-66, 1998.

- DAHLE, G. *et al.* RAPD fingerprinting used for discriminating among three populations of Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*). *Fish. Res.*, Bergen, v. 32, n. 3, p. 263-269, 1997.
- DIAS-NETO, E. *et al.* The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Mol. Bioch. Parasitol.*, v. 57, n. 1, p. 83-88, 1993.
- DINESH, K.R. *et al.* RAPD analysis: an efficient of DNA fingerprinting in fishes. *Zoological Science*, [S.L.], v. 10, p. 849-854, 1993.
- DINESH, K.R *et al.* Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. *Aquaculture international*, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 19-30, 1996.
- DOUPÉ, R.G.; LYMBERY, A.J. Toward the genetic improvement of feed conversion efficiency in fish. *J.W. Aqua. Soc.*, v. 34, n. 3, p. 245-253, 2003.
- DÓRIA, C.R.C.; LEONHARDT, J.H. Avaliação econômica de um sistema de policultivo semi-intensivo com ração e adubo orgânico. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 7. 1995. Peruíbe. *Anais...* Peruíbe: ACIESP, 1995. p.93-95.
- ELO, K. *et al.* Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture*, Amsterdam, v.152, n. 1/4, p. 55-65, 1997.
- EKNATH, A.E. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 111, n. 1/4, p. 171-188, 1993.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2. ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 1996.
- FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia aquaculture in the Americas In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. *Tilapia Aquaculture in the Americas*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p.252-264.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome: FAO Information Division, 2002.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. *Regional review on aquaculture development 1. latin america and the Caribbean*. Rome: FAO Information Division, 2005.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. *Fisheries technical paper: State of world aquaculture*. Rome: FAO Information Division, 2006.
- FROESE, R.; D. PAULY. 2004. FishBase. World Wide Web Eletronic Publication. www.fishbase.org, version (02/04). Disponível em: <www.fishbase.org>. Acesso em: fev. 2004
- GUPTA, M.V.; ACOSTA, B.O. From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. *NAGA - Worldfish Center Quarterly*, Penang, v. 27, n. 2/3, p. 4-14, 2004.
- IBAMA – *Estatística da Pesca 2004 – Brasil: Grandes Regiões e Unidades da Federação*. Brasília: IBAMA, 2005.

- KAUKAS, A. *et al.* A phylogenetic analysis of *Schistosoma Haematobium* group species based on randomly amplified Polymorphic DNA. *Int. J. Parasitol.*, London, v. 24, n. 2, p. 285-290, 1994.
- KUBITZA, L.M.M. Principais parasitoses e doenças em tilápias. *In: KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial.* Jundiaí: F. Kubitza, 2000. p. 179-234.
- LI, S-F. *et al.* Improving growth performance and caudal fin stripe pattern in selected F6-F8 generations of gift Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection. *Aquaculture research*, vol. 37, n.12, p.1165-1171, 2006.
- LIU, Z.J. *et al.* Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2 and backcross hybrids. *Anim. Genet.*, v. 29, n. 1, p. 58-62, 1998.
- LOEFFLER, W.F.; MORDEN, C.W. Genetic diversity and biogeography of the Hawaiian cordage plant, olonã (*Toucharida latifolia*; Urticaceae), based on RAPD markers. *Bioch. Syst. Ecol.*, v. 31, n. 11, p. 1323-1335, 2003.
- LOPERA-BARRERO, N.M. *et al.* RAPD analysis (Random Amplified Polymorphic DNA) in piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849) stocks of the southwest of Brazil: genetic variability and preservation. *Genetics and Molecular Biology*, 2007. No prelo.
- LOVSHIN, L.L. Tilapia culture in Brazil. *In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. Tilapia aquaculture in the Americas.* Baton Rouge: The World Aquaculture Society, v.2, p. 133-140, 2000.
- MARQUES, E.K. *et al.* Diagnóstico molecular e biotecnologia. *In: SERAFINI, L.A. et al. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria.* Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 101-130.
- McANDREW, B.J. Evolution, phylogenetic relationships and biogeography. *In: BEVERIDGE, M.C.M.; McANDREW, B.J. Tilapias: biology and exploitation.* Inglaterra: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 1-32.
- McMANUS, D.P.; BOWLES, J. Molecular Genetic Approaches to Parasite Identification: their value in Diagnostic Parasitology and Systematics. *Int. J. Parasitol.*, Brisbane, v. 26, n. 7, p. 687-704, 1996.
- MIA, M.Y. *et al.* Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 247, n. 1/4, p. 267-273, 2005.
- MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. *Int. J. Parasitol.*, Adelaide, v. 28, n. 6, p. 981-987, 1998.
- MONIS, P.T. The importance of systematics in parasitological research. *Int. J. Parasitol.*, Adelaide, v. 29, n. 3, p. 381-388, 1999.
- MONNIER, P.H. *et al.* Improvement of a polymerase chain reaction assay the detection of *Echinococcus multilaris* DNA in faecal samples of foxes. *Vet. Parasitol.*, Malzeville, v. 67, n. 3/4, p. 185-195, 1996.
- MOREIRA, H.L.M. Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por

- microssatélite. 1999. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- MOREIRA, H.L.M. Genética e melhoramento de peixes. *In: MOREIRA, H.L.M. et al. Fundamentos da Moderna Aqüicultura*. Canoas: ULBRA, 2001. p. 135-147.
- MULLIS, K.B.; FALLONA, F.A. Specific syntesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed Chain reaction. *Methods in Enzymology*, v. 155, p. 335-350, 1987.
- OLESEN I. *et al.* Breeding programs for sustainable aquaculture. *J. A. Aqua.*, Binghamton, v. 13, n. 3/4. p. 179-204, 2003.
- OLIVEIRA, A.V. *et al.* Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Paraná river floodplain of Brazil. *Genetica*, Amsterdam, v. 115, p. 259-267, 2002.
- PONZONI, R.W. A Systematic Approach To Advance And Refine Genetic Improvement Programs In Aquatic Species. *In: NATIONAL SYMPOSIUM ON GENETICS AND GENE BANKING OF FISH AND SHELLFISH*, 2003, Kuala Lumpur, *Anais...* Kuala Lumpur, 2003. p. 9-16.
- PONZONI, R.W. *et al.* Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 247, n. 1/4, p. 203-210, 2005.
- POVH, J. A. *et al.* Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.
- PRIOLI, S.M.A.P. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleoste, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Gen. Mol. Biol.*, Maringá, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.
- REGITANO, L.C.A. Introdução à Análise dos Marcadores Moleculares. *In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. Brasília: EMBRAPA, 2001a. cap. 2, p. 25-39.
- REGITANO, L.C.A. Protocolo de Análise de Marcadores Microssatélites. *In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. Brasília: EMBRAPA, 2001b. cap. 12, p. 195-215.
- ROLLINSON, D.; STOTHARD, J.R. Identification of pests and pathogens by random amplification of polymorphic DNA (RAPDs). *In: HAWKSWORTH, D.L. Identification and characterization of pests organisms*. Wallingford: CAB International, 1994, p. 447-459.
- ROLLINSON, D. *et al.* Some molecular insights into schistosome evolution. *Int. J. Parasitol.*, London, v. 27, n. 1, p. 11-28 1997.
- ROMANA-EGUIA, M.R.R. *et al.* Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analisys. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 236, n. 1/4, p. 131-150, 2004.
- SAIKI, R.K. *et al.* Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int. J. Parasitol.*, London, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, 1997.

STICKNEY, R.R. Status of Research on Tilapia. *In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. Tilapia Aquaculture in the Americas*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 21-23.

TODD, C.D. *et al.* Genetic differentiation of populations of the copepod sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) estoparasitic on wild and farmed salmonids around the coasts of Scotland: Evidence from RAPD markers. *J. Exp. Mar. Biol. Eco.*, v. 210, n. 2, p. 251-274, 1997.

WELSH, J. e MacCLELLAND. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acid res.* Oxford, vol.18, n. 24, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, D.J. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acid res.* Oxford, vol.18, n. 22, p.6531-6535, 1990.

YAN, J. *et al.* RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) X common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 243, n. 1/4, p. 49-60, 2005.

ZIMMERMANN, S. Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v. 9, n. 54, p. 15-21, 1999.

II. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do primeiro trabalho foi analisar a estrutura genética de três linhagens de tilápia do Nilo (Bouaké, Chitralada e GIFT), oriunda dos municípios de Guaíra e Maringá, pela utilização do marcador RAPD.

O objetivo do segundo trabalho foi estimar, através do uso de RAPD, a divergência e variação genética entre duas gerações produtivas da linhagem melhorada GIFT (G_0 e F_1), cultivadas no município de Maringá.

III. Avaliação por RAPD da composição genética de três linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO. O presente trabalho teve como objetivo estimar, pela técnica RAPD, a estrutura genética de três linhagens de tilápia do Nilo. Os valores de divergência genética, pelo teste de Mantel, foram de 0,262 para as Bouaké, 0,366 para as Chitralada, e, 0,318 para as tilápias GIFT. Os valores para o G_{st} e N_m foram de 0,081 e 5,708, 0,106 e 4,238, e 0,070 e 6,656, para a linhagem Bouaké em relação à Chitralada, Bouaké em relação à GIFT, e Chitralada em relação à GIFT, respectivamente. A variabilidade genética foi determinada pela porcentagem de loci polimórficos e pelo índice de Shannon. Os valores para o índice de Shannon foram iguais a 0,473, para a Bouaké, 0,544 para a Chitralada, e, 0,469 para a linhagem GIFT. O conjunto de dados indicou que as linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT, não perderam variabilidade genética de modo significativo. Também demonstraram que apesar do aumento da diferenciação genética entre elas, mantiveram uma relativa homogeneidade genética entre si. Ou seja, os resultados do presente trabalho indicaram que não houve alterações genéticas importantes em nenhuma das três linhagens de tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

Palavras-chave: Índice de Shannon, Divergência genética, Variabilidade genética, linhagem GIFT.

ABSTRACT. RAPD evaluation of genetic composition of three Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus*). The objective of this study was to estimate, by RAPD technique, the genetic structure of three Nile tilapia strains. The values of genetic divergence, by Mantel test, were equals 0.262 to Bouaké, 0.366 to Chitralada, and 0.318 to the GIFT tilapias. The G_{st} and N_m values were 0.081 and 5.708, 0.106 and 4.238, and, 0.070 and 6.656, for Bouaké related to Chitralada strain, Bouaké to GIFT, and Chitralada to GIFT, respectively. The genetic variability was determined by the percentage of polymorphic *loci* and by the index of Shannon. The Shannon index's values were 0.473 for Bouaké, 0.544 for Chitralada, and 0.469 for GIFT strain. The data group indicated that the strains did not lose genetic variability in a significant way. Also indicated that, in spite of the genetic differentiation among them, they kept a relative genetic homogeneity. In other words, the results of this study indicated that, at least for this individual group, there were no important genetic alterations in any of the three Nile tilapia strains (*O. niloticus*).

Key words: Index of Shannon, Genetic divergence, Genetic variability, Nile tilapia GIFT strain.

Introdução

A demanda por peixe tem crescido, acompanhando o crescimento da população humana. Simultaneamente, a busca de uma atividade lucrativa e o conhecimento dos benefícios do peixe como dieta alimentar são reconhecidos em todo do mundo (Gupta e Acosta, 2004).

No Brasil a produção total aquícola passou de aproximadamente 30.000 toneladas no início dos anos noventa, para o total de 176.531 toneladas em 2000 e, 278.128 toneladas produzidas em 2003 (FAO, 2005). Segundo a mesma circular (FAO, 2005),

os peixes cultivados representaram 61% deste total (278.128 toneladas), ou seja, foram produzidas 171.187 toneladas de peixes.

O estado do Paraná está entre os maiores produtores nacionais de peixes cultivados de água doce. A sua produção foi de mais de 16.500 toneladas na safra de 2004, sendo que as tilápias foram representadas por 11.921,5 toneladas, o que coloca o estado como o segundo maior produtor nacional de tilápias (IBAMA, 2005).

Embora sejam nativas da África e do Oriente Médio, as tilápias tornaram-se espécies aquáticas mundialmente importantes (Romana-Eguia *et al.*, 2004). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a mais representativa na aquicultura mundial entre as diversas espécies cultivadas de tilápia (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2006).

A tilapicultura no Brasil sofreu um avanço substancial nos anos noventa, quando o sistema de reversão sexual e alimentação peletizada tornaram-se amplamente disponíveis (Lovshin, 2000). Ainda segundo o autor, pelo menos cinco linhagens de tilápia do Nilo foram introduzidas no Brasil, dentre elas destacaram-se as linhagens Bouaké e Chitralada.

Segundo Moreira (1999) e Kubitzka (2000) a linhagem de tilápia do Nilo denominada Bouaké é originária da Costa do Marfim, na África; a Chitralada descende de uma linhagem levada do Egito ao Japão, e domesticada na Tailândia.

A linhagem Bouaké foi introduzida no país em 1971 no estado do Ceará, representada por apenas 60 indivíduos (Castagnolli, 1992). Entretanto a linhagem Chitralada começou a ser importada posteriormente, em 1996, quando foram trazidos 20.800 exemplares para o estado do Paraná (Zimmermann, 1999).

O projeto de pesquisa denominado GIFT (*The Genetic Improvement of Farmed Tilapia - GIFT*) teve início em 1988, liderado pelo órgão não governamental *WorldFish Center*, àquela época denominado *International Center for Living Aquatic Resources Management - ICLARM* (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004; Li *et al.*, 2006).

O *WorldFish Center* exerce uma política de transferência da linhagem e tecnologia GIFT a diferentes países. O Brasil foi o primeiro país latino-americano contemplado com este empreendimento. Em 2005, a Estação Experimental da Universidade Estadual de Maringá (UEM-CODAPAR) recebeu os primeiros exemplares oriundos de 30 famílias da linhagem GIFT, a partir de um projeto elaborado em conjunto com o

WorldFish Center, e com o apoio da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca - SEAP.

O estudo da diversidade genética pode ser realizado através de métodos baseados em PCR (Monnier *et al.*, 1996). Um marcador baseado em PCR muito utilizado é o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Em peixes, o marcador RAPD tem sido empregado para a identificação de espécies e subespécies, por exemplo, para a espécie de lebiste *Poecilia reticulata* (Dinesh *et al.*, 1993), para ciclídeos do gênero *Oreochromis* (Bardakci e Skibinski, 1994; Dinesh *et al.*, 1996), para salmonídeos das espécies *Salmo trutta* e *S. salar* (Elo *et al.*, 1997), para ictalurídeos (Liu *et al.*, 1998) e ciprinídeos (Barman *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005).

O conhecimento da genética de uma espécie ou população de importância econômica fornece dados que podem auxiliar nas tomadas de decisões, e, de medidas de manejo de populações cultivadas (Marques *et al.*, 2002). Segundo Oliveira *et al.* (2002), alterações no *pool* gênico das populações podem ser irreversíveis, e, desta maneira, o conhecimento da divergência genética das linhagens ou populações pode orientar o cruzamento, visando aumentar os valores para este parâmetro em seus descendentes; parâmetro muito importante, por exemplo, em programas de melhoramento genético em peixes.

Deve-se salientar que este trabalho representa a primeira tentativa no sentido da geração de dados em biologia molecular para a linhagem GIFT no Brasil. Sendo assim, pode-se ter uma noção da divergência e variabilidade genética desta linhagem desde a introdução das 30 primeiras famílias no país.

O objetivo do presente trabalho foi estimar a divergência e variabilidade genética das linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT pelo emprego de marcadores RAPD.

As informações aqui obtidas fornecerão um acréscimo no conhecimento técnico sobre a espécie em questão, visando uma colaboração para o cultivo de tilápias no estado do Paraná.

Material e Métodos

Obtenção dos animais

Neste trabalho foram utilizados 90 exemplares de tilápias do Nilo (*O. niloticus*), colhidas ao acaso, sendo 30 da linhagem Bouaké, 30 da linhagem Chitralada e 30 da linhagem GIFT.

As amostras das tilápias das linhagens Bouaké e GIFT foram obtidas no município de Maringá; as amostras dos animais da linhagem Chitralada foram colhidas no município de Guaíra. Todos os exemplares amostrados pertenciam a propriedades localizadas no estado do Paraná.

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Reprodução e de Biotecnologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

Extração do DNA genômico

O protocolo de extração de DNA foi baseado em Bardakci e Skibinski (1994), modificado por Povh *et al.* (2005), no qual o ácido nucléico é extraído a partir do tecido de nadadeira caudal. Os fragmentos de nadadeira, com aproximadamente 0,5 cm², foram colhidos, acondicionados em microtubos com etanol a 70%, e preservados a -20°C.

Na etapa inicial da extração, após três lavagens do tecido de nadadeira com álcool comercial, foram acrescentados 550 µL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl), 28 µL de SDS (20%) e 7 µL de proteinase K (200 µg/ml), e, mantido em banho-maria a 50°C por cerca de 12 horas. Em seguida, o DNA foi purificado através de duas extrações com fenol (Tris-HCl, pH 8,0) e três com clorofórmio. O ácido nucléico foi precipitado com duas vezes e meia de etanol absoluto gelado e um décimo de acetato de sódio (3 M, pH 7) em relação ao volume recuperado, e, mantido a -20°C por quatro horas. Após ser lavado com etanol a 70% e desidratado, o DNA foi ressuspensão em 70 µL de tampão TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA) e 5 µL de RNase (30 µg/ml), e, mantido a 37°C por uma hora, e estocado a -20°C.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro da marca Shimadzu®, calibrado para um comprimento de onda de 260 nm, e diluído em TE para uma concentração de 30 ng/µL.

A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose (0,7%). Para este procedimento as amostras, previamente padronizadas para 30 ng/µl, foram coradas com brometo de etídio e visualizadas sobre radiação ultravioleta (UV). Observou-se que não ocorreu contaminação por excesso de proteína, nem degradação das moléculas do ácido nucléico. A técnica de extração de DNA das nadadeiras mostrou-se eficiente, e, como

salientaram Wasko *et al.* (2003), representam um procedimento mais simples do que a extração a partir da musculatura ou sangue de peixes.

Amplificação do DNA

As amplificações por RAPD foram baseadas no protocolo descrito por Willians *et al.* (1990) com algumas modificações. As reações foram realizadas em microtubos para PCR (volume de 0,5 ml), contendo tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2 mM de MgCl₂, 100 ng de *primer* (oligonucleotídeos), 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen[®]), e 30 ng de DNA molde. Completando-se com água mili-Q para um volume final de 25 µL.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient[®]), programado para 40 ciclos, com uma desnaturação inicial por cinco minutos a 94°C, e extensão final a 72°C por cinco minutos. Cada ciclo correspondeu a um minuto a 94°C, um minuto a 36°C e dois minutos a 72°C. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído na análise de cada grupo de amplificação.

Para escolha dos oligonucleotídeos, foram avaliados 28 *primers* (Kit Operon[®], Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), dos quais foram selecionados os 13 *primers* que apresentaram melhor reprodutibilidade e bom padrão de bandas.

Eletroforese e documentação dos resultados

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose (1,7%). Este material foi submetido à corrida eletroforética em cuba horizontal a 70 V, contendo tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA), durante quatro horas e 30 minutos, quando então o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Os fragmentos de DNA foram visualizados por meio de um transiluminador com luz ultravioleta (UV), e fotografados para posterior análise do relacionamento, usando-se o sistema EDAS[®] (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

Análise do padrão de fragmentos

A análise dos padrões de fragmentos amplificados foi realizada pela comparação do perfil eletroforético obtido para cada indivíduo. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão “100 pb DNA Ladder” (Invitrogen[®]).

O programa NTSYS 1.7 (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Program*) foi utilizado para determinar o grau de similaridade dentro e entre as linhagens. Cada

indivíduo foi marcado para a presença (1) ou ausência de bandas (0). Os dados foram arranjados em uma matriz binária, e através do programa NTSYS foi construída uma matriz de coeficientes de similaridade, utilizando-se o índice de Jaccard (Sneath e Sokal, 1973). A construção do dendrograma, para representar graficamente o padrão de divergência genética, foi realizada pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Methods of Arithmetic Means*), baseada nos valores do índice de Jaccard, com a utilização do programa aplicativo NTSYS 1.7 (Rohlf, 1989).

A partir da matriz binária, foi obtida a diferenciação genética entre indivíduos dentro das populações e entre as próprias populações. Os valores de divergência genética foram calculados pelo teste de Mantel utilizando o método de Monte Carlo (10000 permutações) através do programa Mantel-Struct (Miller, 1999). A diferenciação genética entre as populações foi estimada pela diversidade genética de Nei entre populações (G_{st}) (Nei, 1973) e pela estimativa para o fluxo gênico, ou o número de migrantes por geração (N_m), ambos obtidos através do programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

A variabilidade genética foi determinada pelo índice de Shannon e pela porcentagem de loci polimórficos, ambos calculados pelo programa PopGene 1.31, a partir da matriz binária anteriormente citada (Yeh *et al.*, 1999).

Resultados e Discussão

Locus polimórficos pelo método RAPD

Os 13 *primers* utilizados para as amplificações estão relacionados a seguir; a seqüência dos *primers*, a porcentagem de bases nitrogenadas (G+C), o número total de loci, o número de loci polimórficos e o tamanho dos fragmentos amplificados podem ser visualizados na Tabela 1.

O número de fragmentos, produzidos pelos 13 *primers*, variou entre três, para os *primers* A03, A14 e A15, até nove para o *primer* A01. O maior fragmento produzido foi de 2800 pares de bases, gerado pelo *primer* A20, e, em oposição, o *primer* A09 gerou um locus com 380 pares de bases.

Os *primers* utilizados produziram 72 fragmentos, dos quais 60 foram representados por loci polimórficos para as três linhagens (83,3% de polimorfismo), quando consideradas coletivamente.

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos *primers* de RAPD utilizados, porcentagem G + C, número total de lócus, número de lócus polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para as tilápias do Nilo (*O. niloticus*)

Table 1. RAPD primers nucleotides sequence, G + C percentage, total number of loci, number of polymorphic loci and amplified fragments size for Nile tilapias (*O. niloticus*)

Primers <i>Primers</i>	Seqüência de nucleotídeos <i>Nucleotides sequence</i>	(G+C) <i>(G+C)</i>	Lócus <i>Loci</i>	Lócus polimórficos <i>Polymorphic loci</i>	Fragmentos (pb) <i>Fragments (bp)</i>
A01	5'CAGGCCCTTC ^{3'}	70	9	8	560-3450
A03	5'AGTCAGCCAC ^{3'}	60	3	2	710-1500
A05	5'AGGGGTCTTG ^{3'}	60	4	4	810-1960
A09	5'GGGTAACGCC ^{3'}	70	6	5	380-2150
A13	5'CAGCACCCAC ^{3'}	70	8	8	550-1870
A14	5'TCTGTGCTGG ^{3'}	60	3	2	920-1450
A15	5'TTCCGAACCC ^{3'}	60	3	2	1300-2110
A20	5'GTTGCGATCC ^{3'}	60	5	4	730-2800
W04	5'CAGAAGCGGA ^{3'}	60	8	8	500-2090
W07	5'CTGGACGTCA ^{3'}	60	5	4	780-1500
W12	5'TGGGCAGAAG ^{3'}	60	7	6	490-1610
X06	5'ACGCCAGAGG ^{3'}	70	7	5	500-2000
X07	5'GAGCGAGGCT ^{3'}	70	4	2	1080-1800
Total <i>Total</i>		-	72	60	380-2800

Segundo Telles *et al.* (2001), para a estimação da diversidade genética pela técnica RAPD, o número de fragmentos obtido pelo conjunto de *primers* utilizados em qualquer ensaio é mais importante do que o número de *primers* em questão. Os autores ressaltaram que para bovinos, com aproximadamente 50 lócus, já seria possível estimar a divergência genética entre as amostras, e, obter resultados satisfatórios.

Resultados semelhantes aos aqui obtidos foram encontrados por Lopera Barrero *et al.* (2007a), para duas populações cultivadas de piracanjuba *Brycon orbignyanus*, com um total de 87 lócus obtidos, e valores de polimorfismo de 70,1%. Assim como Povh *et al.* (2005), quando estudaram tilápias do Nilo das linhagens Bouaké e Chitralada, encontraram 90 lócus, porém com um grau de polimorfismo na ordem de 50,0%, valor inferior ao encontrado neste estudo.

A linhagem Bouaké apresentou 58 lócus polimórficos, ou seja, um polimorfismo de 80,6%. A linhagem Chitralada totalizou 63 lócus polimórficos, uma porcentagem de 87,5%. Para a linhagem GIFT, foram gerados 57 lócus polimórficos, com uma porcentagem de 79,2%. Estes valores evidenciaram um polimorfismo diferenciado entre as três linhagens de tilápias amostradas, porém com valores próximos entre si.

A linhagem GIFT, após ter passado pelo processo de melhoramento genético, não sofreu uma perda significativa da variabilidade genética neste procedimento, apesar do controle efetivo e intencional no processo de seleção. Fato evidenciado pelo alto valor de polimorfismo, 79,2% para esta linhagem, ou seja, este procedimento foi bem conduzido.

Segundo Povh *et al.* (2005), o menor grau de polimorfismo da linhagem Bouaké, em relação à Chitralada, pode ser explicado pelo tempo de introdução relativo as duas linhagens no país, 1971 e 1996, respectivamente, assim uma linhagem mais antiga tende a sofrer maiores efeitos de consangüinidade e estrangulamento genético, por exemplo; pelos sistemas de manejo ao longo das gerações produtivas, praticamente impossíveis de serem descritos; assim como pelo efeito fundador, ou seja, a variabilidade genética das duas populações quando de sua introdução.

Para peixes, diversos trabalhos, sobretudo para estoques nativos, têm sido publicados para a obtenção dos valores de variabilidade genética, por meio da porcentagem de loci polimórficos. Segundo Yoon e Kim (2001), a população de *catfish* (*Silurus asotus*), de dois locais distintos apresentou variação na porcentagem de loci polimórficos, 45,7% para a localidade de Kunsan e 40,8% para Yesan, Coréia do Sul. Para Chiari e Sodré (2001), os resultados encontrados, após o estudo de oito espécies da família Anostomidae, demonstraram uma variação entre 29,3% e 58,7% de polimorfismo. Oliveira *et al.* (2002) observaram que os peixes do gênero *Steindachnerina* sem mácula apresentaram uma porcentagem de loci polimórficos de 27,6%, enquanto que os indivíduos com mácula, ou com mácula intermediária, 31,6%.

Povh *et al.* (2005), para tilápias do Nilo cultivadas das linhagens Bouaké e Chitralada, encontraram um grau de polimorfismo que apresentou uma variação entre 12,2% e 36,7%, de acordo com a gera o e a linhagem analisada. Resultados ligeiramente superiores encontraram Lopera Barrero *et al.* (2007a) para duas popula es cultivadas de *B. orbignyanus*, com o número total de loci polimórficos igual a 70,1%, porém com e uma variação de 54,0% a 58,6%, quando analisadas de acordo com o local de colheita e gera o de cultivo.

Segundo Wasko (2005), após algumas gera es, os estoques de peixes cultivados parecem sofrer uma perda da variabilidade genética, geralmente devido aos cruzamentos entre animais geneticamente semelhantes, o que aumenta a consangüinidade. Um programa de melhoramento genético que minimize este efeito

parece ser fundamental para manter a variabilidade genética em uma determinada espécie, ou mesmo linhagem de peixes.

De acordo com a literatura consultada, o número total de loci obtido encontra-se ligeiramente inferior em relação ao número de *primers* utilizados, porém, a porcentagem de loci polimórficos encontra-se comparativamente superior aos valores observados em outros trabalhos com peixes, inclusive para a própria espécie, tilápia do Nilo (para a linhagem Bouaké 80,6%, para a linhagem Chitralada 87,5% e, para a linhagem melhorada GIFT 79,2% de loci polimórficos). Fato que pode evidenciar a amplitude da variabilidade genética destas três linhagens estabelecidas no Paraná.

Divergência genética e diversidade interpopulacional

Os valores de divergência genética para as linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT, de tilápias do Nilo (*O. niloticus*), estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios de divergência genética das linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT, de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), obtidos pelos complementos dos coeficientes de Jaccard

Table 2. Genetic divergence means values for Bouaké, Chitralada and GIFT strains, of Nile tilapia (*O. niloticus*), obtained by the Jaccard coefficients complements

Grupos <i>Groups</i>	Bouaké	Chitralada	GIFT
Bouaké	0,262	-	-
Chitralada	0,354*	0,366	-
GIFT	0,334*	0,374*	0,318

*valores estatisticamente significativos em nível de 1% ($P < 0,01$)

*values statistically significant at 1% level ($P < 0.01$)

As três linhagens analisadas apresentaram diferenças significativas entre si, para os valores de divergência genética ($P < 0,01$). A linhagem Bouaké em relação às tilápias das linhagens Chitralada e GIFT, a Chitralada em relação às linhagens Bouaké e GIFT, e a GIFT em relação às outras duas. Os três grupos são geneticamente divergentes.

Lopera Barrero *et al.* (2007b) estudaram a divergência genética entre duas populações de reprodutores de *B. orbignyanus* de duas localidades do estado de São Paulo: Porto Ferreira e Castilho. Os autores não encontraram diferenças significativas entre as populações de reprodutores (0,199) de ambos locais, nem tampouco da progênie em relação aos seus progenitores. Portanto, nenhuma comparação de

divergência genética apresentou significância, o que evidenciou que o manejo, até então, mostrou-se eficiente para manter a identidade genética de ambas as populações.

Recentemente, dois autores trabalharam com divergência genética em tilápia do Nilo (*O. niloticus*), em situações nas quais aconteceu seleção intencional (Astolphi, 2003 e Moreira *et al.*, 2003). Astolphi (2003), não encontrou diferença significativa entre duas gerações de tilápia do Nilo da linhagem Chitralada, os valores de divergência genética foram estatisticamente semelhantes para a geração parental (0,341) e para a progênie (0,337), fato que segundo o autor evidenciou um manejo reprodutivo eficiente. Entretanto Moreira *et al.* (2003), em um ensaio de metodologia semelhante, encontraram uma diminuição da divergência genética dos parentais (0,244) em relação à progênie (0,108), evidenciando um provável manejo inadequado do plantel.

Benites *et al.* (2004), analisaram os mesmos parâmetros para as linhagens Bouaké, Chitralada, e híbridos, e encontraram valores de divergência genética bastante variáveis, 0,100 e 0,400 para os animais híbridos (Bouaké x Chitralada), 0,050 e 0,350 para a linhagem Bouaké, e, 0,072 e 0,875 para a Chitralada, e, os autores destacaram a baixa divergência genética para a linhagem Bouaké. Fato evidenciado também por Povh *et al.* (2005), segundo os autores a menor divergência genética desta linhagem pode ser evidenciada pelo maior número de gerações de produção, assim como pelos reprodutores introduzidos com uma baixa dissimilaridade (efeito fundador).

Os resultados do presente trabalho corroboraram os dados publicados por Povh *et al.* (2005), os quais encontraram diferença significativa ($P < 0,01$), quando analisaram a divergência genética entre as linhagens comerciais Bouaké e Chitralada. Os autores encontraram valores para a linhagem Bouaké que variaram de 0,059 a 0,089 e para a linhagem Chitralada de 0,151 a 0,157. Eles ainda destacaram que, o manejo preterido mostrou-se eficiente para preservar a divergência genética em ambas as linhagens por eles analisadas, que pode ser comprovado pelos altos valores intrapopulacionais para a divergência genética.

A divergência genética intrapopulacional foi elevada para as três linhagens. Para a linhagem Bouaké igual a 0,262, para a linhagem Chitralada 0,366 e, para a linhagem GIFT igual a 0,318. Podem atribuir os menores valores obtidos para a linhagem Bouaké a seu histórico de manejo desconhecido, porém, ainda assim, as três linhagens apresentaram valores elevados de divergência genética intrapopulacional para animais de cultivo, fato destacado para a linhagem GIFT, que passou pelo processo de melhoramento genético e manteve sua divergência genética alta.

As três linhagens analisadas apresentaram diferenças significativas, para os valores da diversidade genética de Nei entre populações (Gst), como pode ser observado na Tabela 3. Tanto a linhagem Bouaké em relação à Chitralada e GIFT, quanto a Chitralada em relação à Bouaké e GIFT, quanto a GIFT em relação às outras duas. Ou seja, os três grupos são distintos em termos de diversidade genética. Tais resultados coincidiram com os encontrados pelo teste de Mantel, para a comparação da divergência genética, anteriormente discutida.

Tabela 3. Valores médios para a diversidade genética de Nei entre populações (Gst), e estimativa para o fluxo gênico (N_m) para as linhagens Bouaké em relação à Chitralada (BC), Bouaké em relação à GIFT (BG), e Chitralada em relação à GIFT (CG), de tilápia do Nilo (*O. niloticus*)

Table 3. Mean values of Nei's gene diversity in subdivided populations (Gst), and gene flow estimative (N_m) to the Bouaké in relation to Chitralada (BC), Bouaké in relation to GIFT (BG), and Chitralada in relation to GIFT (CG) strains of Nile tilapia (*O. niloticus*)

Populações Populations	Gst Gst	N_m N_m
BC	0,081*	5,708
BG	0,106*	4,238
CG	0,070*	6,656

*valores estatisticamente significativos em nível de 1% ($p < 0,01$) pelo teste χ^2

*values statistically significant at 1% level ($P < 0.01$) by the χ^2 test

Os valores para o parâmetro Gst indicam alta diferenciação genética quando variam de 0,15 a 0,25, representam média diferenciação genética de 0,05 a 0,15, e demonstram uma baixa diferenciação genética para valores de 0,00 a 0,05 (Whight, 1978). A diversidade genética entre populações pode ser inferida pelo parâmetro Gst , através da estimação do grau de diferenciação genética entre distintas populações. Para a linhagem Bouaké em relação à Chitralada este valor foi igual a 0,081, para a Bouaké em relação a GIFT igual a 0,106, e, para a linhagem Chitralada em relação a GIFT o valor encontrado foi igual a 0,070, ou seja, todos os valores indicaram uma moderada diferenciação genética entre as linhagens.

Diversos autores têm utilizado o parâmetro de diversidade genética (Gst) para analisar a diferenciação genética entre populações, sobretudo para populações silvestres. Almeida *et al.* (2003) encontraram moderada diferenciação genética para as populações de *Pimelodus maculatus* do rio Tietê, com valores de Gst de 0,072 a 0,104, bem como para as populações entre o baixo e médio Paranapanema (0,101), porém, alta

diferenciação genética entre as demais populações do rio Paranapanema, com valores que variaram de 0,187 (baixo e alto) a 0,210 (médio e alto).

Prioli *et al.* (2002) encontraram valores de diferenciação genética para três populações da espécie *Astyanax altiparanae*, que variaram de 0,059 a 0,093, ou seja, observaram uma diferenciação genética moderada entre os estoques de origem. Sofia *et al.* (2006) também encontraram uma moderada diferenciação genética entre três populações de *Astyanax scabripinnis* de distintas localidades do rio Cambé, com valores de 0,145 a 0,146.

Leuzzi *et al.* (2004), quando analisaram a espécie *A. altiparanae* em diversas alturas do leito do rio Paranapanema, encontraram diversos níveis de diferenciação genética entre as populações. Os autores encontraram alta diferenciação para a parte inferior em relação à média (0,281), e da inferior em relação à superior (0,291), no entanto, valores moderados para as quatro populações do reservatório de Capivara (0,090 a 0,139) e para a região média em relação à superior (0,090). Segundo os autores, a população da região baixa do rio Paranapanema apresentou uma estrutura genética própria distinta das demais regiões.

Alam e Islam (2005) compararam a diversidade genética entre três populações nativas e uma cultivada de carpas indianas (*Catla catla*). Os autores observaram valores de diferenciação que variaram de 0,006 a 0,022 (baixa diferenciação), entre todas as populações. Apenas uma comparação apresentou significância, a da população cultivada quando comparada com a população nativa mais isolada geograficamente, com os maiores valores encontrados para a diferenciação genética (0,022). Para a espécie de carpa indiana *Labeo rohita*, Islam e Alam (2004) consideraram de baixo a moderado o nível de diferenciação genética entre quatro populações nativas e uma cultivada, com valores que variaram de 0,018 a 0,097.

Segundo Alam e Islam (2005), resultados para populações de cativeiro, para as quais se encontraram valores menores para a diversidade genética, podem ser explicados por deriva genética (*genetic drift*), possivelmente pelo fato de que a população de cativeiro foi estabelecida com um pequeno número efetivo de reprodutores (N_e), o efeito fundador (*founder effect*).

Na literatura consultada encontraram-se diversos trabalhos, tanto para estoques de peixes nativos quanto cultivados que evidenciam a utilização do parâmetro *Gst* para a análise da diferenciação genética entre populações. Os resultados aqui obtidos, com valores de *Gst* que variaram de 0,070 a 0,106 (Tabela 3), indicaram que todas as

linhagens apresentaram moderada diferenciação genética entre si, o que significa que existe uma relativa heterogeneidade genética entre todas elas. Resultados consistentes com os valores encontrados para outras populações cultivadas de peixes, mesmo quando comparadas com as respectivas populações silvestres (Islam e Alam, 2004; Alam e Islam, 2005).

Segundo Almeida *et al.* (2003), uma das dificuldades para a análise entre populações é como estimar o fluxo gênico, um dos parâmetros mais importantes para determinar a estrutura populacional, porque define o quanto cada população local de uma determinada espécie representa como uma unidade evolucionária independente. Então, ainda segundo os autores, se o fluxo gênico entre populações é intenso, elas evoluíram dependentemente, por outro lado, se o fluxo é baixo, elas, provavelmente, evoluíram de maneira independente.

Alam e Islam (2005) destacaram que o fluxo gênico estimado (N_m) comporta-se em antagonismo em relação ao parâmetro de diferenciação entre populações (G_{st}). Os autores obtiveram os menores valores de N_m justamente naquele caso em que a diferenciação genética foi maior entre as populações, entre a população cultivada de *C. catla* e a população nativa isolada geograficamente por um estuário. Em oposição, as populações que apresentaram a menor diferenciação genética, obtiveram os maiores valores para o fluxo gênico.

Desta forma, os resultados para a estimativa do fluxo gênico (N_m) refletiram os resultados da análise da diversidade genética de Nei, representada pelo parâmetro G_{st} . Para a linhagem Bouaké em relação à Chitralada o valor de N_m foi igual a 5,708, para a Bouaké em relação à GIFT igual a 4,238, e, para a linhagem Chitralada em relação à GIFT o valor encontrado foi de 6,656. Ou seja, para os maiores valores do parâmetro G_{st} encontraram-se os menores valores para o fluxo gênico (N_m).

Os resultados para a análise da diversidade genética de Nei (G_{st}) e para a estimativa do fluxo gênico (N_m) demonstraram uma relação mais estreita entre a linhagem Chitralada em relação à GIFT, do que de cada uma delas em relação à linhagem Bouaké. O valor para o G_{st} foi o menor encontrado (0,070), enquanto que o valor de N_m (6,656) foi o mais elevado dentre todas as comparações efetuadas.

Fato bastante coerente, e que pode ser explicado pela própria origem das linhagens. A linhagem Chitralada foi importada da Tailândia, onde passou por várias gerações de cultivo e domesticação, ou seja, é uma linhagem comercial desenvolvida na Ásia (Moreira, 1999; Kubitza, 2000); de maneira similar, na formação da linhagem

melhorada GIFT entraram quatro linhagens comerciais asiáticas, dentre o total de oito que compuseram a sua base genética (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004). De maneira contrastante, a linhagem Bouaké foi importada da Costa do Marfim, um país africano (Castagnolli, 1992) e, como já foi salientado não se conhece detalhadamente seu histórico de manejo.

Por razões semelhantes, fica claro perceber os motivos que justificam a maior diferenciação genética da linhagem Bouaké, com valores maiores de G_{st} (0,081 e 0,106) e menores de N_m (5,708 e 4,238) em relação as duas outras linhagens, Chitralada e GIFT, respectivamente. Assim como o menor grau de similaridade genética entre a linhagem Bouaké e GIFT, para as quais se encontrou o maior valor de diferenciação genética ($G_{st} = 0,106$) e menor valor de fluxo gênico ($N_m = 4,238$), pois teoricamente estas duas linhagens tiveram uma menor probabilidade de se relacionar reprodutivamente.

Outro fato a ser destacado é o maior tempo de estabelecimento das linhagens Bouaké e Chitralada no país (1971 e 1996, respectivamente). Este maior tempo pode explicar os valores intermediários tanto para a diferenciação de populações ($G_{st}=0,081$), quanto ao fluxo gênico ($N_m=5,708$), já que o histórico das linhagens, inclusive o manejo reprodutivo, não pode ser totalmente esclarecido. Além disso, não se pode descartar totalmente a possibilidade de que tenha ocorrido a hibridização entre as duas linhagens (Bouaké e Chitralada). Por outro lado, a linhagem GIFT só foi introduzida no país recentemente, em março de 2005 e os reprodutores permaneceram, desde então, isolados em estufas.

O argumento de Almeida *et al.* (2003), no qual valores de N_m acima de um, indicam que há uma ação efetiva do fluxo gênico contra a diferenciação genética entre populações, pode ser aproveitado para credenciar os resultados aqui obtidos, nos quais o N_m variou de 4,238 a 6,656. Pode-se considerar que estes valores, em conjunto com os resultados de diferenciação moderada entre as três linhagens (G_{st}) podem indicar que, mesmo com a heterogeneidade relativa comum a populações com moderada diferenciação genética, existe certo grau de homogeneidade genética entre as linhagens.

Tais resultados podem, inclusive, ser aproveitados na continuidade do desenvolvimento da linhagem GIFT, cujo programa tem sido realizado no estado do Paraná. A homogeneidade aqui demonstrada pôde ser corroborada pelo alto grau de polimorfismo, anteriormente discutida.

A análise da divergência genética e da diversidade genética de Nei (G_{st}), pelos resultados aqui encontrados, indicou que os três grupos são divergentes, ou seja, são geneticamente distintos. Por outro lado, os altos valores de divergência genética para cada linhagem (intrapopulacionais), o alto fluxo gênico entre as linhagens (N_m), assim como a alta porcentagem de loci polimórficos, evidenciou que há certo grau de homogeneidade genética que não pode ser desconsiderado.

Índice de Shannon

Os valores encontrados para o índice de Shannon, para as linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Índice de Shannon das linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT (*O. niloticus*)
 Table 4. Index of Shannon for Bouaké, Chitralada and GIFT strains (*O. niloticus*)

Linhagens <i>Strains</i>	Índice de Shannon <i>Shannon index</i>
Bouaké	0,473
Chitralada	0,544
GIFT	0,469
Geral <i>General</i>	0,562

Segundo Prioli *et al.* (2002), um alto índice de Shannon, baseado em marcadores RAPD, pode indicar uma alta variabilidade genética dentro de uma população. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que não houve perda da variabilidade genética no estabelecimento das linhagens, segundo a mesma linha de raciocínio adotada por Prioli *et al.* (2002), conforme será exposto a seguir.

Os valores do índice foram semelhantes para as três linhagens de tilápia do Nilo amostradas. Para a linhagem Bouaké o índice de Shannon foi igual a 0,473, para a linhagem Chitralada este valor foi igual a 0,544, e, para a linhagem GIFT, este índice foi igual a 0,469.

Resultados substancialmente inferiores foram obtidos por Povh *et al.* (2005), com valores para o índice de Shannon de 0,104 e 0,060 para os indivíduos da linhagem Bouaké, 0,198 e 0,214 para exemplares da linhagem Chitralada, de tilápias do Nilo cultivadas.

Valores semelhantes aos obtidos por Povh *et al.* (2005), encontraram Oliveira *et al.* (2002), porém para estoques nativos de peixes do gênero *Steindachnerina*, em um

trecho do rio Paraná em que há a presença de indivíduos com mácula entre a primeira e segunda nadadeira dorsal, sem mácula, e, com mácula intermediária. A população sem mácula apresentou um valor para o índice de Shannon igual a 0,122, a com mácula igual a 0,152, e, com mácula intermediária, 0,176.

Lopera Barrero *et al.* (2007a), entretanto, encontraram valores intermediários para *Brycon orbignyanus*. No seu ensaio com duas gerações cultivadas, em duas localidades distintas, os autores encontraram valores de índice de Shannon iguais a 0,318 e 0,343 para os indivíduos de Castilho, e, 0,369 para os exemplares de Porto Ferreira, ambas provenientes do estado de São Paulo.

Resultados superiores relataram Prioli *et al.* (2002), entretanto com o estudo de populações nativas de *A. altiparanae*. Os autores encontraram valores para o índice de Shannon iguais a 0,500, 0,540 e 0,580 para indivíduos colheitados em três diferentes localidades distintas. Valores considerados altos, e, que evidenciaram uma alta variabilidade genética dentro da população de cada local de coleta. Assim como, demonstraram que não houve perda da variabilidade genética no estabelecimento das respectivas populações.

Os resultados, tanto para a análise de locos polimórficos, quanto para os valores do índice de Shannon, indicaram que o estabelecimento das linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT, não reduziu de modo significativo a variabilidade genética destas. Ou seja, mesmo com um histórico de manejo desconhecido para as linhagens Bouaké e Chitralada, todas mantiveram sua identidade genética, ou a variabilidade dentro de cada população.

Porém, não eram esperados valores de polimorfismo, para o índice de Shannon, assim como para a divergência genética dentro de cada linhagem, tão elevada para as linhagens Bouaké e Chitralada, alguns dos quais equiparáveis a valores para populações nativas. De fato, eram esperados valores mais elevados em tais parâmetros para a linhagem GIFT a qual, como já foi discutido, foi formada por oito distintas linhagens (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004).

Por outro lado, os valores obtidos para a diferenciação entre populações (Gst) e para o fluxo gênico (N_m), para os quais a linhagem Bouaké e Chitralada apresentou valores intermediários, em conjunto com os parâmetros considerados no parágrafo anterior, fortalecem a idéia de que, em algum momento do passado, possa ter ocorrido uma hibridização entre elas.

O próprio tempo de estabelecimento das duas linhagens no país e a falta de informação sobre o manejo anterior para ambas as linhagens, podem explicar tais resultados. Ou até mesmo, como foi salientado por Alam e Islam (2005), por alguma falha no procedimento amostral.

O dendrograma demonstra a disposição de 23 exemplares, inseridos ao acaso, de cada linhagem de tilápia do Nilo: Bouaké, Chitralada e GIFT (Figura 1). Pode-se observar que houve um agrupamento de acordo com cada linhagem em questão, porém o agrupamento não foi absoluto em cada um dos três grupos amostrados. A linhagem Bouaké apresentou uma menor variabilidade genética em relação as duas outras linhagens, ou seja, o dendrograma corroborou os resultados analisados para os outros parâmetros, anteriormente discutidos.

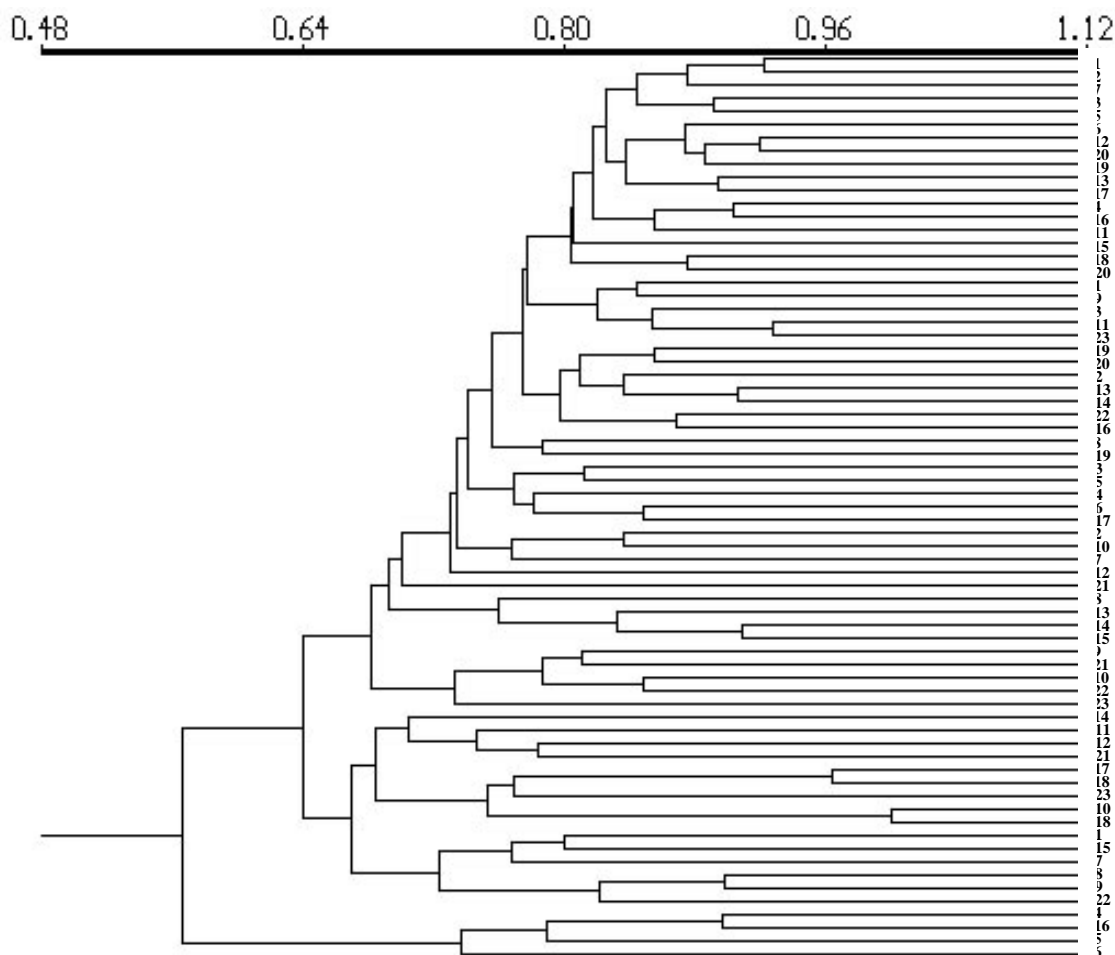


Figura 1. Dendrograma das linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT (*O. niloticus*), obtido pelo coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA. B1-B23: linhagem Bouaké. C1-C23: linhagem Chitralada. G1-G23: linhagem GIFT

Figure 1. Dendrogram of Bouaké, Chitralada and GIFT strains (*O. niloticus*), obtained by the Jaccard coefficient and UPGMA grouping. B1-B23: Bouaké strain. C1-C23: Chitralada strain. G1-G23: GIFT strain

Benites (2003) e Povh *et al.* (2005), utilizaram o marcador RAPD, também com o emprego do coeficiente de Jaccard, para analisar a diversidade genética das linhagens Bouaké e Chitralada. Povh *et al.* (2005), obtiveram uma separação clara para as tilápias da linhagem Bouaké e Chitralada. Os autores também salientaram que o dendrograma denotou a menor variabilidade genética dentro da linhagem Bouaké. Benites (2003), entretanto, observou que as linhagens Bouaké e Chitralada não apresentaram uma separação clara, entre si, no dendrograma. Porém, como no presente trabalho, o autor destacou que houve uma tendência de agrupamento, de acordo com as linhagens em questão.

Bártfai *et al.* (2003) concluíram que a metodologia, através de marcadores RAPD, foi adequada para a análise da estrutura genética de duas variedades de carpa comum (*Cyprinus carpio*). Porém, os pesquisadores destacaram que a técnica não forneceu subsídios para agrupar as amostras de acordo com o estoque de origem, ou seja, o mesmo comportamento aqui observado.

A estrutura genética de populações de fazendas de cultivo é mais propensa a efeitos de maquiagem genética (*genetic make-up*), bem como, tendem a ter um menor número de indivíduos. Reduções na variação genética através do endocruzamento e da deriva genética são comuns em populações de cativeiro. A diminuição de variabilidade genética é considerada uma perda no potencial genético do estoque para melhoramento e adaptação às mudanças do meio ambiente. Então se torna fundamental o monitoramento de qualquer mudança na estrutura genética das populações cativas em relação a sua base populacional ou população silvestre original (Alam e Islam, 2005).

A utilização de marcadores moleculares evidencia que há uma redução da variação genética com a prática da aqüicultura (Reilly *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 1999; Wasko *et al.*, 2004). Segundo Ward e Grewe (1995), vários fatores são responsáveis por esta redução, entre eles, o uso de poucos animais na formação do plantel de reprodutores, estratégias reprodutivas incorretas e acasalamento entre parentes; o monitoramento genético torna-se necessário em programas de conservação e melhoramento genético em aqüicultura.

O aumento da endogamia pode proporcionar grandes perdas para a piscicultura. Uma maior homozigose possibilita que alelos deletérios raros e alelos detrimentais tenham uma maior probabilidade de se expressar (Povh *et al.*, 2005). Segundo Lopera Barrero *et al.* (2007b), a introdução, no cultivo, de peixes com baixa divergência genética pode ser prejudicial, tanto no sentido da perda de genes para a adaptabilidade,

quanto à perda de características economicamente relevantes, ambos os fatores podem gerar perdas econômicas substanciais.

A correta identificação de linhagens pode servir como ferramenta para o estabelecimento das bases da seleção, visando os cruzamentos direcionados; tais aspectos podem ser utilizados para aumentar a variabilidade genética e explorar, positivamente, o efeito de heterose (Mather, 2001). Como salientaram Bentsen *et al.* (1998) e Li *et al.* (2006), a melhoria da qualidade genética da tilápia do Nilo é fundamental para assegurar o futuro da tilapicultura, inclusive no Brasil.

Para diversos autores a técnica RAPD foi adequada para a análise genética de várias espécies de peixes (Oliveira *et al.*, 2002; Prioli *et al.*, 2002; Bártfai *et al.*, 2003; Barman *et al.*, 2003; Lopera Barrero *et al.*, 2007a; Lopera Barrero *et al.*, 2007b). Bem como, destacaram Astolphí (2003) e Povh *et al.* (2005), os marcadores RAPD mostraram-se eficazes para a análise da diversidade genética de linhagens de tilápia do Nilo.

Conclusões

O marcador RAPD foi eficaz, no presente trabalho, para a caracterização genética das populações de cultivo de tilápia do Nilo.

O conjunto de dados indicou que as linhagens não perderam variabilidade ou divergência genética de modo significativo ao longo do estabelecimento de cada linhagem. Também demonstraram que, apesar da diferenciação entre elas, mantiveram uma relativa homogeneidade genética entre si.

Finalmente, os resultados do presente trabalho indicaram que, para este grupo amostral, não houve alterações genéticas destacadas na diversidade genética das linhagens Bouaké, Chitralada ou GIFT, de tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

Referências

- ALAM, M.S; ISLAM, M.S. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v.246, n. 1/4, p. 151-160, 2005.
- ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K. Comparative study by RAPD analysis of six species of the Pimelodidae family (Osteichthyes, Siluriformes) from the Tibagi River, state of Paraná, Brazil. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 24, n. 2, p. 513-517, 2002.

- ALMEIDA, F.S. *et al.* Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiete and Paranapanema rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 301-305, 2003.
- ASTOLPHI, J.L.L. *Avaliação da diversidade genética entre a geração parental e sua progênie selecionada de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) da linhagem Chitralada com uso do marcador de RAPD.* 2003. Dissertação (Mestrado em Produção Animal-Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, Oxford, v. 73, p. 117-123, 1994.
- BARMAN, H.K. *et al.* Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified Polymorphic DNA assay. *Aquaculture*, Orissa, v. 217, n. 1/4, p. 115-123, 2003.
- BÁRTFAI, R. *et al.* Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 219, n. 1/4, p. 157-167, 2003.
- BENITES, C. *Análise por RAPD, da diversidade genética entre diferentes linhagens de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus).* 2003. Dissertação (Mestrado em Produção Animal-Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.
- BENITES, C. *et al.* Análise por RAPD da diversidade genética entre diferentes linhagens da tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41. 2004, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: SBZ, 2004. AQUA010.
- BENTSEN, H.B. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 160, n.1/2, p. 145-173, 1998.
- CASTAGNOLLI, N. *Piscicultura de água doce.* Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189p.
- CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pices Characiformes) by RAPD analysis. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 2, p. 445-451, 2001.
- DINESH, K.R. *et al.* RAPD analysis: an efficient of DNA fingerprinting in fishes. *Zoological Science*, [S.L.], v. 10, p. 849-854, 1993.
- DINESH, K.R. *et al.* Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 4, n.1, p. 19-30, 1996.
- ELO, K. *et al.* Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 152, n. 1/4, p. 55-65, 1997.
- EKNATH, A.E. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. *Aquaculture*, Amsterdam, v.111, n. 1/4, p. 171-188, 1993.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. *Regional review on aquaculture development 1. Latin America and the Caribbean.* Rome: FAO Information Division, 2005
- GUPTA, M.V.; ACOSTA, B.O. From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. *NAGA - Worldfish Center Quarterly*, Penang, v. 27, n. 2/3, p. 4-14, 2004.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr. P.M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 26, n. 1, p. 19-25, 2003.

IBAMA – *Estatística da Pesca 2004 – Brasil: Grandes Regiões e Unidades da Federação*. Brasília: IBAMA, 2005.

ISLAM, M.S.; ALAM, M.D. Randomly amplified polymorphic DNA analyses of four different populations of the Indian major carp. *Labeo Rohita* (Hamilton). *J. appl. Ichthyol.* vol.20, n. 5, p.407-412, 2004.

KUBITZA, F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. 1ª ed. Jundiaí: F. Kubitza, 2000.

LEUZZI, M.S.P. *et al.* Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 355-362, 2004.

LI, S-F. *et al.* Improving growth performance and caudal fin stripe pattern in selected F6-F8 generations of gift Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection. *Aquaculture research*, vol. 37, n.12, p.1165-1171, 2006.

LIU, Z.J. *et al.* Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2 and backcross hybrids. *Anim. Genet.*, v. 29, n.1, p. 58-62, 1998.

LOPERA-BARRERO, N.M. *et al.* RAPD analysis (Random Amplified Polymorphic DNA) in piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849) stocks of the southwest of Brazil: genetic variability and preservation. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, 2007a. No prelo.

LOPERA-BARRERO, N.M. *et al.* Genetic diversity in piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) stocks. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2007b. No prelo.

LOVSHIN, L.L. Tilapia culture in Brazil. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. *Tilapia aquaculture in the Americas*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, v.2, p. 133-140, 2000.

MARQUES, E.K. *et al.* Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, L.A. *et al.* *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 101-130.

MATHER, P.B. Overview of fish genetics research at Queensland University of Technology, p. 133-139. In: GUPTA, M.V.; ACOSTA, B.O. *Fish genetics research in member countries and institutions of the International Network on Genetics in Aquaculture*. Brisbane: ICLARM, 2001. p. 64-179.

MILLER, M. MANTEL-ESTRUCT: a program for the detection of population structure via mantel tests. *J. Heded, Cary*, n. 90, p. 258-259, 1999.

MONNIER, P.H. *et al.* Improvement of a polymerase chain reaction assay the detection of *Echinococcus multilaris* DNA in faecal samples of foxes. *Vet. Parasitol.*, Malzeville, v. 67, n. 3/4, p. 185-195, 1996.

MOREIRA, H.L.M. *Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do nilo (Oreochromis niloticus) estimadas por microssatélite*. 1999. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

- MOREIRA, H.L.M. *et al.* The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. *In: WORLD AQUACULTURE*, 2003, Salvador. *Abstracts...* Salvador: INVE, 2003. v. 2, p. 460.
- OLIVEIRA, A.V. *et al.* Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Paraná river floodplain of Brazil. *Genetica*, Amsterdam, v. 115, p. 259-267, 2002.
- POVH, J. A. *et al.* Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.
- PRIOLI, S.M.A.P. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Gen. Mol. Biol.*, Maringá, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.
- REILLY, A. *et al.* Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their ancestral Canadian population: comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 173, n. 1/4, p. 459-469, 1999.
- ROHLF, F.J. *NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. New York: Exeter Publishers, 1989.
- ROMANA-EGUIA, M.R.R. *et al.* Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 236, n. 1/4, p. 131-150, 2004.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. *Numerical taxonomy*. San Francisco: Freeman, 1973.
- TELLES, M.P.C. *et al.* Marcadores RAPD na análise de divergência genética entre raças de bovinos e número de *locos* necessários para a estabilidade da divergência estimada. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 87-95, 2001.
- SOFIA, S.H. *et al.* Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia*, v.553, p.245-254, 2006.
- WARD, R.D.; GREWE, P.M. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *In: CARVALHO, G.R.; PITCHER, T.J. Molecular geneticis in fisheries*. London: Chapman & Hall, 1995. p. 29-54.
- WASKO, A.P. *et al.* Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*, Lund, v. 138, n.3, p. 161-165, 2003.
- WASKO, A.P. *et al.* Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinxã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmers. *J. Appl. Ichthyol*, Oxford, v. 20, n. 1, p. 48-52, 2004.
- WASKO, A.P. A importância do monitoramento genético em estoques cultivados de matrinxã e piracanjuba. *Revista Panorama da Aqüicultura*, Botafogo, v. 15, n. 88, p. 47-49, 2005.
- WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

WINKLER, F. M. *et al.* Genetic differences among year classes in a hatchery population of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792)) in Chile. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 173, n. 1/4, p. 425–433, 1999.

WRIGHT, S. *Evolution and genetics of populations*. University of Chicago Press, Chicago, 1978, 511p.

YAN, J. *et al.* RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) X common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 243, n. 1/4, p. 49-60, 2005.

YEH, F.C. *et al.* *POPGENE Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis*. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

YOON, J.M.; KIM, G.W. Randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction analysis of two different populations of cultured Korean catfish *Silurus asotus*. *J. Biosci.*, [S.L.], v.26, n.5, p. 641-647, 2001.

ZIMMERMANN, S. Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v. 9, n. 54, p. 15-21, 1999.

IV. Avaliação das gerações G₀ e F₁ da linhagem GIFT de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por RAPD

RESUMO. Este trabalho teve como objetivo analisar, pela técnica RAPD, a estrutura genética de duas gerações de produção, da linhagem GIFT. Foram estimados valores de variabilidade e divergência genética para os reprodutores (G₀) e para a progênie (F₁). A variabilidade genética foi determinada pela porcentagem de loci polimórficos e pelo índice de Shannon. As gerações apresentaram 69,6% de loci polimórficos (G₀), e 60,0% de polimorfismo (F₁). Os valores para o índice de Shannon foram iguais a 0,367 para a geração G₀, e 0,317 para a F₁. Os valores de divergência genética, calculados pelo teste de Mantel, foram de 0,213 para a G₀, e 0,208 para a geração F₁. Os resultados obtidos indicaram que houve uma perda da variabilidade genética da geração G₀ para a F₁. No entanto, um fato a ser destacado, foi a alta variabilidade genética para as gerações G₀ e F₁, característica desejável em programas de melhoramento. O conjunto de dados indicou, ainda, que a diversidade genética para a linhagem GIFT foi mantida. E, que as práticas de manejo têm evidenciado a correta condução do início do programa de melhoramento genético para a linhagem GIFT, no estado do Paraná.

Palavras-chave: Índice de Shannon, Gerações de cultivo, Divergência genética, Variabilidade genética.

ABSTRACT. RAPD evaluation of G₀ and F₁ generations of GIFT Nile tilapia strain (*Oreochromis niloticus*). This study had the objective of to analyze, by RAPD technique, the genetic structure of two production generations of GIFT Nile tilapia strain. The genetic variability and divergence were estimated to the breeders (G₀) and to the offspring (F₁). The genetic variability was determinate by the polymorphic *loci* percentage and by the Shannon index. The polymorphic *loci* percentage was 69.6% (G₀) and 60.0% (F₁). The Shannon index values were 0.367 for G₀ generation and 0.317 for F₁. The genetic divergence values, calculated by Mantel test, were 0.213 for G₀, and 0.208 for F₁ generation. The results indicated that was a genetic variability loss from G₀ to F₁ generation. However, an important data to be observed was the high genetic variability found to the G₀ and F₁ generations, a desirable characteristic in improvement programs. The data group indicated, in addition, that the genetic diversity was kept to the GIFT strain. And, management practices were well conducted at the GIFT improvement program beginning, in Paraná State.

Key words: Shannon index, Farmed generations, Genetic divergence, Genetic variability.

Introdução

A aquíicultura encontra-se em franca expansão em todo o mundo. Segundo a FAO (2002), o montante produzido mundialmente passou de 26,7 para 35,6 milhões de toneladas entre 1996 e 2000. Dados mais recentes indicaram que a produção total mundial alcançou 59,4 milhões de toneladas em 2004 (FAO, 2006), com um rendimento de cerca de 70,3 bilhões de dólares.

Na produção aquícola por regiões, a América Latina e Caribe destacaram-se pela maior taxa de crescimento anual entre todas as regiões: 21,3% ao ano; para o período compreendido entre os anos de 1950 e 2004 (FAO, 2006).

O cultivo de tilápias apresentou um importante crescimento entre 1993 e 2003, na América Latina e Caribe. O incremento do consumo nos Estados Unidos e a abertura de novos mercados como o da União Européia contribuiu substancialmente para este aumento. Como consequência, a produção latino-americana e caribenha cresceu de 24.100 toneladas em 1993 para 127.000 toneladas em 2004 (FAO, 2005).

O Brasil apresenta um dos crescimentos mais rápidos na indústria da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) nas Américas. Segundo Fitzsimmons (2000), a produção de tilápias no Brasil foi de 30.000 toneladas em 1997. Já em 2004, segundo dados do IBAMA (2005), este total elevou-se para cerca de 69.000 toneladas.

A produção anual de 69.078 toneladas, em 2004, elevou o país a sétima colocação entre os produtores mundiais de tilápia (FAO, 2006). E no cenário nacional, o estado do Paraná destacou-se como o segundo maior produtor de tilápias no ano de 2004, com um montante de 11.921,5 toneladas/ano (IBAMA, 2005).

As tilápias são amplamente reconhecidas como as espécies na aquíicultura de água doce, com maior potencial para diversos sistemas de cultivo, desde o cultivo familiar em pequena escala, até os sistemas superintensivos (Bentsen *et al.*, 1998). Dentre as diversas espécies de tilápia, a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) é a mais representativa na aquíicultura mundial (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Kamal e Mair, 2005). Froese e Pauly (2004) salientaram que a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) já foi introduzida com sucesso em pelo menos 87 países.

As técnicas empregadas atualmente na biologia molecular permitem aos geneticistas e melhoristas estudarem diretamente as variações do DNA, ao longo de todo o genótipo dos peixes (Moreira, 2001). O marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), emprega uma metodologia baseada em PCR e utiliza *primers* arbitrários para detectar as variações nas seqüências de DNA, nos locais em que estes *primers* anelam-se ao genoma (Yoke-Kqueen e Radu, 2006). Devido a esta característica randômica de anelamento e a habilidade de avaliar qualquer região do genoma, permite-se atribuir aos marcadores por RAPD uma boa representatividade para estudos de diversidade genômica (Sandoval-Castellanos *et al.*, 2007), mesmo sem qualquer conhecimento prévio de ferramentas em biologia molecular para a espécie em questão (Martinez *et al.*, 2006).

Desde o seu desenvolvimento, no início da década de noventa (Welsh e MacClelland, 1990; Willians *et al.*, 1990), até a atualidade, este marcador vem sendo utilizado para a análise da estrutura genética em diversos grupos de organismos (Rollinson e Stothard, 1994; Liu e Cordes, 2004; Yoke-Kqueen e Radu, 2006).

Em organismos aquáticos, observa-se o uso de RAPD para o estudo da estrutura genética em diversas espécies, como por exemplo, o cefalópode *Dosidicus gigas* (Sandoval-Castellanos *et al.*, 2007); o camarão *Pandalus borealis* (Martinez *et al.*, 2006) o lebiste *Poecilia reticulata* (Dinesh *et al.*, 1993), ciclídeos do gênero *Oreochromis* (Bardakci e Skibinski, 1994; Naish *et al.*, 1995; Dinesh *et al.*, 1996), salmonídeos (Elo *et al.*, 1997; Araneda *et al.*, 2005), ictalurídeos (Liu *et al.*, 1998) e ciprinídeos (Barman *et al.*, 2003; Wang e Li, 2004; Yan *et al.*, 2005).

O projeto de pesquisa denominado GIFT (*The Genetic Improvement of Farmed Tilapia* - GIFT) teve início em abril de 1988, liderado pelo órgão não governamental denominado *WorldFish Center* (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004; Li *et al.*, 2006). Um dos principais objetivos, nas fases iniciais do projeto, foi tornar bem documentado o germoplasma de tilápias da África e Ásia, para o estabelecimento da população base, e a partir desta definir como a linhagem de tilápias geneticamente melhoradas seria desenvolvida (Eknath *et al.*, 1993).

O desenvolvimento da linhagem GIFT de *O. niloticus* chamou atenção pelo pioneirismo na história do melhoramento genético em peixes tropicais. Entretanto, o *WorldFish Center* e seus parceiros reconheceram que este é apenas o começo, pois a linhagem precisa ser testada em diferentes ambientes e condições de cultivo, até mesmo em diversos países, antes de sua disseminação plena (Gupta e Acosta, 2004).

Em março de 2005, a Estação Experimental da Universidade Estadual de Maringá (UEM-CODAPAR) recebeu tilápias representantes de 30 famílias da linhagem GIFT, a partir de um projeto elaborado em conjunto com o *WorldFish Center*, e com o apoio da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca - SEAP. Com esta importação de exemplares da linhagem GIFT, o Brasil tornou-se o primeiro país da América Latina a receber tilápias geneticamente melhoradas.

O objetivo do presente trabalho foi, através do marcador RAPD, estimar a divergência e variabilidade genética de duas gerações de cultivo da linhagem GIFT, colheitadas no município de Maringá.

Material e Métodos

Obtenção dos animais

Neste trabalho foram utilizados 60 exemplares de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) da linhagem GIFT, colheitadas ao acaso, sendo 30 exemplares da geração introduzida no país (G_0), e 30 exemplares da geração produzida no Brasil (F_1), progênie da geração G_0 .

Segundo o histórico de criação do programa de melhoramento genético, a linhagem GIFT foi estabelecida a partir de uma base populacional de oito linhagens puras, quatro linhagens comerciais de tilápias cultivadas na Ásia, e quatro linhagens silvestres de tilápias de origem africana (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004). Esta base populacional formada por oito linhagens, teve a finalidade de elevar a variabilidade genética, a partir da qual seriam selecionadas as primeiras gerações da linhagem GIFT.

As amostras das tilápias foram cedidas pela Estação Experimental da Universidade Estadual de Maringá (UEM-CODAPAR), localizada no município de Maringá, estado do Paraná.

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Reprodução e de Biotecnologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

Extração do DNA genômico

O protocolo de extração de DNA foi baseado em Lopera-Barrero *et al.* (2007a), no qual o ácido nucléico é extraído a partir da nadadeira caudal. Imediatamente após a colheita, os fragmentos de nadadeira (aproximadamente 0,5 cm²) foram acondicionados em microtubos com etanol a 70%, e preservados a -20°C.

Os fragmentos de nadadeira caudal, com aproximadamente 250 mg, foram colocados em microtubos com 550 µL de tampão de lise tamponado (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de EDTA, 100mM de NaCl e 1% SDS) e 7 µL de proteinase K (200 µg/ml), e, mantidos em banho-maria a 50°C por cerca de 12 horas. Em seguida, a solução foi acrescentado 400 µL de NaCl (solução aquosa saturada a 5 M) e, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos, e o DNA foi precipitado pela adição de 900 µL de etanol absoluto gelado, após serem incubados por uma hora à temperatura de -20°C. Logo após, a solução foi centrifugada, e o *pellet* foi lavado com etanol (500 µL de etanol 70%), e ressuspenso em 120 µL de TE (10 mM de Tris pH 8.0 e EDTA, e tratada

com 5 μ L de RNase. Após todo este procedimento, a solução de DNA foi colocada em banho-maria a 37°C por cerca de 40 minutos. A solução de ácido nucléico foi armazenada a -20°C.

A quantificação foi realizada por comparação entre a solução de DNA extraído e uma solução de DNA fago λ padrão de concentração conhecida, em gel de agarose a concentração de 1%, e, corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL). Após a quantificação, as soluções de DNA foram padronizadas para uma concentração de 10 ng/ μ L.

Amplificação do DNA

As amplificações por RAPD foram baseadas no método descrito por Willians *et al.* (1990) com modificações. As reações foram realizadas em microtubos para PCR (0,5 ml), contendo tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2 mM de MgCl₂, 100 ng de *primer* (oligonucleotídeos), 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen®), e 15 ng de DNA molde. Completando-se com água mili-Q para um volume final de 15 μ L.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient®), programado para 40 ciclos, com uma desnaturação inicial por quatro minutos a 94°C, e extensão final a 72°C por cinco minutos. Cada ciclo consistiu-se de um minuto a 94°C, um minuto e 30 segundos a 40°C e dois minutos a 72°C. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em de cada grupo de amplificação.

Para escolha dos oligonucleotídeos, foram avaliados 28 *primers* (Kit Operon®, Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), dos quais foram selecionados os 12 *primers* que apresentaram bom padrão de bandas e melhor reprodutibilidade.

Eletroforese e documentação dos resultados

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose (1,7%). Foram utilizados 10 μ L do produto amplificado e 4 μ L de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol). Este material foi submetido à corrida eletroforética em cuba horizontal a 70 V, contendo tampão TBE 0,5X (45mM de Tris-Borato e 1mM de EDTA), durante quatro horas. Imediatamente após, os géis foram corados por 30 minutos com brometo de etídio (0,5 μ g/ml). Os fragmentos de DNA foram visualizados

por meio de um transiluminador com luz ultravioleta (UV), e fotografados usando-se o sistema EDAS[®] (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

Análise do padrão de fragmentos

A análise do padrão de fragmentos foi realizada pela comparação do perfil eletroforético obtido para cada indivíduo. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com o padrão “100 pb DNA *Ladder*” (Invitrogen[®]).

A diferenciação genética entre indivíduos de cada uma das gerações e entre as próprias gerações foi obtida pelo teste de Mantel. Para cada geração foi construída uma matriz modelo identificando a geração de cada indivíduo. A partir desta matriz foram obtidos os valores de divergência genética e as probabilidades calculadas com o teste de Mantel utilizando o método de Monte Carlo (10000 permutações) pelo programa Mantel-Struct (Miller, 1999).

A variabilidade genética foi determinada pelo índice de Shannon e pela porcentagem de locos polimórficos, calculados pelo programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

Resultados e Discussão

Locus polimórficos por RAPD

Dos 28 *primers* testados 12 foram utilizados para as amplificações; as seqüências dos *primers*, as porcentagens de bases nitrogenadas (G+C), o número total de locos e o tamanho dos fragmentos amplificados estão representados na Tabela 1.

O número de fragmentos, obtidos com o marcador RAPD, variou de sete, para os *primers* OPA16 e OPW03, a 12 locos gerados pelos *primers* OPW13 e OPX1. O maior fragmento produzido foi de 3.050 pares de bases, obtido pelo *primer* OPW03, e, o *primer* OPX3 gerou o menor fragmento, com cerca de 340 pares de bases. Valores semelhantes foram encontrados por Hatanaka e Galetti Jr. (2003) para a espécie nativa de água doce *Prochilodus marginatus*, para a qual os fragmentos encontrados variaram de 300 a 3000 pares de bases.

Para Wang e Li (2004), cada fragmento produzido por RAPD pode ser considerado um locus independente e cada indivíduo pode ser marcado para a presença do referido locus (1), ou ausência (0). E, como ressaltaram Sandoval-Castellanos *et al.*

(2007), apenas os *primers* que produzirem bandas claras e destacadas deveriam ser selecionados para as análises, fato este levado em consideração neste ensaio.

Tabela 1. Seqüência de nucleotídeos utilizados, porcentagem G + C, número total de lócus e tamanho dos fragmentos amplificados para a linhagem GIFT, de tilápia do Nilo (*O. niloticus*)

Table 1. Primers nucleotides sequence, G + C percentage, total number of loci, number of polymorphic loci and amplified fragments size of Nile tilapias (*O. niloticus*)

Primers <i>Primers</i>	Seqüência de nucleotídeos <i>Nucleotides sequence</i>	(G+C) <i>(G+C)</i>	Lócus <i>Loci</i>	Fragmentos (pb) <i>Fragments (bp)</i>
OPA01	5' CAG GCC CTT C ^{3'}	70	8	450 – 2020
OPA02	5' TGC CGA GCT G ^{3'}	70	11	400 – 2000
OPA10	5' GTG ATC GCA G ^{3'}	60	10	650 – 2820
OPA16	5' AGC CAG CGA A ^{3'}	60	7	700 – 2030
OPW01	5' CTC AGT GTC C ^{3'}	60	9	350 – 1600
OPW02	5' ACC CCG CCA A ^{3'}	70	10	420 – 2700
OPW03	5' GTC CGG AGT G ^{3'}	70	7	1000–3050
OPW08	5' GAC TGC CTC T ^{3'}	60	9	500 – 2800
OPW13	5' CAC AGC GAC A ^{3'}	60	12	510 – 2900
OPW19	5' CAA AGC GCT C ^{3'}	60	9	460 – 2100
OPX1	5' CTG GGC ACG A ^{3'}	70	12	380 – 2150
OPX3	5' TGC CGC AGT G ^{3'}	70	11	340 – 2600
Total <i>Total</i>		-	115	340-3050

O conjunto de *primers* utilizados produziu 115 fragmentos, com um polimorfismo de 75,7%, ou seja, foram produzidos 87 lócus polimórficos, quando levadas em consideração as duas gerações de cultivo, em conjunto.

Diversos trabalhos com peixes têm sido publicados para a obtenção dos valores de variabilidade genética, por meio da porcentagem de lócus polimórficos, sobretudo para estoques silvestres, colheitados diretamente da natureza. De forma distinta, este trabalho utilizou animais de cultivo, ou seja, um estoque de tilápias da linhagem GIFT.

Valores ligeiramente superiores para o número de lócus obtidos foram encontrados por Almeida e Sodré (2002), para a família Pimelodidae; foram verificados 132 lócus, com o uso de sete *primers*. Assim como Wasko *et al.* (2004), que obtiveram 104 lócus a partir de apenas seis *primers*, em estudo realizado com a espécie *Brycon cephalus*. Porém, ambos os trabalhos relacionados a estoques de espécies silvestres e, em condições naturais.

Wang e Li (2004) estudaram três variedades coloridas de carpas coloridas cultivadas (*Cyprinus carpio*), e obtiveram um total de 219 loci, porém com a utilização de 31 *primers*, número bastante superior ao usado neste trabalho (12 *primers*).

Resultados ligeiramente inferiores, em relação ao número de loci foram obtidos por Lopera Barrero *et al.* (2007b), para duas populações cultivadas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com um total de 87 loci gerados, mas com valores de polimorfismo comparáveis, com cerca de 70,1% polimórficos. Porém, Povh *et al.* (2005) encontraram valores substancialmente inferiores, com um grau de polimorfismo na ordem de apenas 50,0%, quando estudaram populações também cultivadas de tilápia do Nilo das linhagens Bouaké e Chitralada, para um total de 90 loci obtidos.

Em relação a cada geração produtiva da linhagem GIFT, a geração parental G_0 apresentou uma porcentagem de loci polimórficos igual a 69,6%, enquanto que para a progênie, F_1 , o valor encontrado foi igual a 60,0%. Esta redução em relação ao polimorfismo foi esperada, pois diversos autores afirmam que há uma diminuição gradual na variabilidade genética em populações de cativeiro (Islam e Alam, 2004; Pineda, 2004; Alam e Islam, 2005; Wasko, 2005; Li *et al.*, 2006). Segundo Li *et al.* (2006), uma maneira de mitigar este efeito é realizar o processo de seleção com um grande número efetivo de reprodutores, em torno de 1.000 exemplares por geração de seleção, cuidado este que foi levado em consideração em relação ao manejo reprodutivo, na passagem da geração G_0 para a F_1 .

Para animais cultivados, Wang e Li (2004) encontraram uma variação destacada nas porcentagens de loci polimórficos entre três linhagens de carpas (*C. carpio*). Os maiores valores de polimorfismo foram encontrados para a carpa colorida variedade *Oujiang* (79,5%), os valores intermediários para a variedade *Long-fin* (72,8%), e, os valores menores para a carpa ornamental *Koi* (39,5%). Fato atribuído, principalmente, ao menor número efetivo da população de carpas *Koi* (N_e), quando de sua introdução (Wang e Li, 2004).

Lupchinski Jr. *et al.* (2006) observaram variações entre três linhagens de tilápia do Nilo cultivadas, de 79,2% a 87,5% de polimorfismo. Estes valores evidenciaram uma alta variabilidade genética para as três linhagens amostradas. Segundo os autores, pôde-se salientar que a linhagem GIFT, após ter passado pelo processo de melhoramento genético, manteve uma alta variabilidade genética intrapopulacional (79,2%).

Lopera Barrero *et al.* (2007b) encontraram valores menores para duas gerações de *B. orbignyanus* cultivadas. Segundo os autores, a geração de reprodutores apresentou 54,0% de loci polimórficos, enquanto que para a progênie foram produzidos 57,5% dos fragmentos polimórficos. Os autores salientaram que a variabilidade genética obtida pela porcentagem de loci polimórficos foi mantida, o que evidenciou boas condições de manejo reprodutivo para este estoque de peixes. No entanto, tais conclusões levaram em consideração que os animais foram submetidos a um sistema de reprodução seminatural, e cultivados para fins de repovoamento.

Povh *et al.* (2005), quando trabalharam com tilápias do Nilo (*O. niloticus*), encontraram valores inferiores de loci polimórficos, em todo o seu universo amostral. Para a linhagem Bouaké, os autores encontraram uma porcentagem de loci igual a 18,9% para a geração de reprodutores (1997) e, apenas 12,2% para a geração de 2002. Já para a linhagem Chitralada foram encontrados 33,3% de polimorfismo para os reprodutores (geração de 1997), e 36,7% para a geração cultivada em 2002.

Kamal e Mair (2005) consideraram que apesar da tilápia *O. mossambicus* ter sido a primeira disseminada no cultivo em larga escala, ela foi rapidamente substituída pela tilápia do Nilo (*O. niloticus*). O baixo rendimento da espécie *O. mossambicus* foi, provavelmente, associado a endocruzamentos resultantes de estrangulamento genético (*genetic bottleneck*). Tal argumentação evidencia a relevância da manutenção da variabilidade e do monitoramento genético da tilápia do Nilo em situações de cultivos comerciais.

Índice de Shannon

Os valores encontrados para o índice de Shannon, para as gerações G_0 e F_1 , da linhagem GIFT, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Índices de Shannon para as gerações G_0 e F_1 , da linhagem GIFT
Table 2. Shannon index to G_0 and F_1 GIFT strain generations

Gerações <i>Generations</i>	Índice de Shannon <i>Shannon index</i>
G_0	0,367
F_1	0,317
Todos os loci <i>All loci</i>	0,371

Os valores do índice de Shannon foram ligeiramente inferiores para a progênie F_1 (0,317) em relação à geração parental G_0 (0,367). Porém, pode-se salientar que esta diminuição era esperada, pelo processo natural de redução gradual da variabilidade genética em populações de cativeiro (Islam e Alam, 2004; Pineda, 2004; Alam e Islam, 2005; Wasko, 2005; Li *et al.*, 2006). Ou seja, tanto para a porcentagem de loci polimórficos, quanto para os resultados do índice de Shannon, observou-se o mesmo comportamento em relação à variabilidade genética, na passagem da geração G_0 para a F_1 .

Lopera Barrero *et al.* (2007b), encontraram valores muito próximos aos aqui demonstrados, para exemplares cultivados de piracanjuba (*B. orbignyanus*). Os autores obtiveram um índice de Shannon igual a 0,399, quando analisados todos os loci. Para os indivíduos de Castilho, foram obtidos índices iguais a 0,318 para a geração parental e 0,343 para a progênie, e, os autores destacaram que não houve seleção intencional entre as gerações.

Valores substancialmente inferiores foram encontrados por Oliveira *et al.* (2002), porém para peixes nativos do rio Paraná do gênero *Steindachnerina*, em que existem indivíduos com mácula, entre a primeira e segunda nadadeira dorsal, indivíduos com mácula intermediária, e outros sem mácula. A população sem mácula apresentou um valor para o índice de Shannon igual a 0,122, a com mácula igual a 0,152, e, com mácula intermediária, 0,176. Os autores destacaram que existem duas espécies distintas no local de amostragem, e que não houve fluxo gênico efetivo entre elas.

Para a mesma espécie aqui em questão, Povh *et al.* (2005) obtiveram resultados também inferiores para duas linhagens de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), de duas gerações distintas. Foram relatados valores de 0,104 para a geração de 1997 e 0,068 para a geração de 2002 para os indivíduos da linhagem Bouaké; e valores de 0,198 para a geração de 1997 e 0,214 para a geração de 2002 para exemplares da linhagem Chitralada.

Wasko (2005) comentou que, após algumas gerações, os estoques de peixes cultivados parecem sofrer uma perda da variabilidade genética, geralmente devido aos cruzamentos entre animais geneticamente semelhantes, o que aumenta a consangüinidade. E, ainda, que um programa de melhoramento genético que minimize este efeito parece ser fundamental para manter a variabilidade genética em uma determinada espécie, ou mesmo linhagem de peixes.

Segundo Sandoval-Castellanos *et al.*, (2007), o índice de Shannon suporta uma a relação mais linear com a frequência alélica. E, de maneira complementar, Prioli *et al.* (2002) destacaram que um elevado índice de Shannon em uma população indica uma alta variabilidade genética dentro desta população.

Os valores para o índice de Shannon indicaram que houve uma diminuição da variabilidade genética entre as gerações G_0 e F_1 , como já foi discutido. Porém, o índice de Shannon foi elevado para as duas gerações de tilápias GIFT, 0,367 (G_0) e 0,317 (F_1), segundo a mesma linha de raciocínio adotada por Prioli *et al.* (2002). Tais valores evidenciaram a alta variabilidade genética intrapopulacional (distintas gerações), característica fundamental em programas de melhoramento genético.

Os valores para o índice de Shannon, assim como a porcentagem de locos polimórficos, discutida anteriormente, indicaram que a alta variabilidade genética dentro de cada geração foi mantida (G_0 e F_1), bem como a da linhagem e espécie, como unidade taxonômica. Tais resultados evidenciaram a correta condução do programa de melhoramento, mesmo considerando-se que ambas as gerações sofreram seleção intencional, procedimento inerente ao processo de melhoramento genético.

Divergência genética

Os valores de divergência genética para as gerações G_0 e F_1 da linhagem GIFT, estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios de divergência genética para as gerações G_0 e F_1 , da linhagem GIFT, obtidos pelos complementos do coeficiente de Jaccard

Table 3. Genetic divergence mean values for G_0 and F_1 GIFT strain generations, obtained by the Jaccard's coefficient complements

Gerações <i>Generations</i>	G_0 G_0	F_1 F_1
G_0	0,213	-
F_1	0,228*	0,208

*valores estatisticamente significativos em nível de 1% ($P < 0,01$)

**values statistically significant at 1% level ($P < 0.01$) by the χ^2 test*

As duas gerações estudadas apresentaram diferenças significativas entre si ($P < 0,01$), para os valores de divergência genética. Entretanto, a divergência dentro de cada geração foi alta, fato que se tornará evidente no transcórre da discussão.

As variações genéticas sazonais, quando moderadas, podem ser explicadas por processos que envolvem efeitos estocásticos, de deriva genética ou até mesmo por erro

amostral (Sandoval-Castellanos *et al.*, 2007). Alam e Islam, (2005) reforçaram que, não se pode descartar o erro amostral como causa para a perda de variabilidade. Quaisquer destes fatores podem ter sido responsáveis pela diferença significativa quanto à divergência genética entre as duas gerações produtivas (G_0 e F_1).

Em 2003, Astolphi (2003) não encontrou diferença significativa entre duas gerações de tilápia do Nilo da linhagem Chitralada, os valores de divergência genética foram estatisticamente semelhantes para a geração parental (0,341) e para a progênie (0,337). Entretanto, Moreira *et al.* (2003) encontraram uma diminuição significativa da divergência genética dos parentais (0,244) em relação à progênie (0,108). Ou seja, os dois trabalhos apresentaram resultados contrastantes, para a divergência genética em distintas gerações de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), quando sob seleção intencional.

Povh *et al.* (2005) analisaram a divergência genética das linhagens Bouaké e Chitralada de tilápia do Nilo, e não encontraram diferenças significativas entre distintas gerações ($P > 0,01$). Para a linhagem Bouaké da geração de 1997 a divergência genética foi igual a 0,089, e para a geração de 2002 foi igual a 0,059. Para a linhagem Chitralada da geração de 1997 a divergência genética foi igual a 0,151, e, para a geração de 2002 0,157.

Lopera Barrero *et al.* (2007c) estudaram a divergência genética em duas gerações consecutivas de *B. orbignyanus*, cultivadas no estado de São Paulo. Os autores não encontraram diferenças significativas entre a divergência genética dos reprodutores (0,160) e sua progênie (0,170). O valor da divergência genética entre progênies em relação aos seus progenitores foi igual a 0,190 ($P > 0,01$).

Segundo Povh *et al.* (2005), estudos posteriores poderiam confirmar um aumento da divergência quando da hibridização entre diferentes linhagens de tilápia, porém para os próprios resultados dos autores esta afirmação não foi totalmente confirmada, pois para a linhagem Bouaké houve uma diminuição da divergência (de 0,089 em 1997 para 0,059, em 2002), porém, para a linhagem Chitralada a afirmação mostrou-se verdadeira (de 0,151 em 1997 para 0,157 em 2002).

Tanto para a linhagem Chitralada, no trabalho de Moreira *et al.* (2003), quanto para os resultados do presente trabalho houve uma diminuição da divergência genética no decorrer das gerações de produção, de 0,244 para 0,108 para Moreira *et al.* (2003) e de 0,213 (geração G_0) para 0,208 (geração F_1). Mas o fato mais importante, que merece ser destacado, foi a manutenção dos valores elevados para a divergência genética das duas gerações cultivadas da linhagem GIFT (G_0 e F_1).

Segundo Povh *et al.* (2005), os menores valores para a divergência genética na linhagem Bouaké, iguais a 0,089 e 0,059, podem ser explicados pelo maior tempo de introdução desta linhagem no país (1971, segundo Castagnolli, 1992), para a qual houve um maior número de gerações de seleção (intencional ou não). Um segundo fator é que os primeiros exemplares podem ter sido introduzidos já com uma baixa dissimilaridade (efeito fundador). O endocruzamento também pode ser considerado mais uma possível causa, pois proporciona um aumento da homozigose, e, conseqüentemente da similaridade genética.

Pode-se considerar, por analogia, que os resultados evidenciaram o contrário, pois para a geração G_0 , encontrou-se um valor relativamente alto de divergência genética (0,213), bem como para a geração F_1 (0,208). O próprio histórico da implantação do programa GIFT, no qual a linhagem melhorada foi estabelecida a partir de uma base populacional formada por quatro linhagens comerciais asiáticas e quatro linhagens silvestres de tilápias de origem africana (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004), credenciou tais resultados.

O conjunto de dados evidenciou uma alta variabilidade genética estimada pelos valores de locus polimórficos e pelo índice de Shannon, assim como uma elevada divergência genética. Ou seja, indicou que a diversidade genética, ou a integridade populacional da linhagem GIFT foi mantida. Tais resultados denotaram que o planejamento e desenvolvimento do programa de melhoramento genético foram bem executados. E, que as práticas de manejo têm evidenciado uma correta condução do início do programa de melhoramento da linhagem GIFT, no estado do Paraná.

A utilização de marcadores moleculares tem evidenciado que há uma redução da variação genética com a prática da aqüicultura (Reilly *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 1999; Wasko *et al.*, 2004). Segundo Alam e Islam (2005), reduções na variabilidade genética através do endocruzamento e da deriva genética são comuns em populações de cativeiro, além do que perdas de variabilidade genética são consideradas perdas no potencial genético do estoque para melhoramento e adaptação às mudanças do meio ambiente.

Segundo Bentsen *et al.* (1998), a tilapicultura em diversos países caracterizou-se pela introdução de um pequeno número efetivo de reprodutores (N_e), geralmente através de um país de clima temperado, os quais, muito provavelmente, sofreram efeitos de deriva genética (*genetic drift*), como o estrangulamento genético (*genetic bottleneck*) e efeito fundador (*genetic founder effect*).

Wasko (2005) destacou que a utilização rotineira de um pequeno número efetivo de reprodutores, freqüentemente leva ao cruzamento entre indivíduos aparentados, o que provoca a diminuição dos níveis de variabilidade genética em estoques de cultivo. Mas tais fatos podem ter menor importância nos resultados aqui encontrados; a própria formação e condução do projeto GIFT descarta tal possibilidade, pois tratap-se de uma linhagem estabelecida a partir de uma ampla base populacional (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004).

Segundo Olesen *et al.* (2003), em 1993 menos de 1% do material biológico utilizado para a aqüicultura foi originado de programas de melhoramento genético. De maneira contrastante, o programa que foi realizado para salmonídeos na Noruega, a partir dos anos setenta, mostrou a efetividade deste procedimento em peixes. Atualmente, cerca de 80% de todos os salmões produzidos naquele país são oriundos de estoques geneticamente melhorados (Gupta e Acosta, 2004).

Os sistemas de produção de peixes, nos países em desenvolvimento, ainda são amplamente baseados no uso de espécies e linhagens não melhoradas. Com o acúmulo de conhecimento e experiência no manejo, alimentação e no cuidado sanitário em tais sistemas de produção, a disponibilidade de animais geneticamente mais produtivos torna-se imperativa na utilização racional dos recursos disponíveis (Ponzoni, 2003).

Bentsen *et al.* (1998) e (Li *et al.*, 2006) afirmaram que a necessidade de se melhorar a qualidade genética da tilápia do Nilo é amplamente reconhecida, e, fundamental para assegurar o futuro da tilapicultura. Já em 1999 Longalong *et al.* (1999) reconheciam que, para o aproveitamento do grande potencial de cultivo da tilápia do Nilo, era necessária a implementação de programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de linhagens plenamente adaptadas às condições de cultivo.

Toda a argumentação apresentada denota a importância dos programas de melhoramento genético em peixes, inclusive para a tilápia do Nilo. Desde que, como destacou Ponzoni, (2003), os programas passem por um planejamento, desenho e implementação de pesquisas adequadas, com o desenvolvimento e transferência efetivos de tecnologia.

Conclusões

Os resultados obtidos indicaram a perda da variabilidade genética na passagem da geração G_0 para a F_1 , porém tais resultados são aceitáveis para populações de cultivo,

em virtude da magnitude desta perda. No entanto, o fator mais importante, a ser destacado, foi a alta variabilidade encontrada para as gerações G_0 e F_1 , o que evidenciou que a linhagem manteve uma alta diversidade genética; característica importante para a continuidade do programa de melhoramento genético.

O conjunto de dados indicou ainda, que a estrutura genética populacional não sofreu efeitos prejudiciais no decorrer de seu estabelecimento, fato evidenciado por todos os parâmetros encontrados para estimar a diversidade genética da linhagem GIFT de tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

Referências

- ALAM, M.S.; ISLAM, M.S. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 246, n. 1/4, p. 151-160, 2005.
- ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K. Comparative study by RAPD analysis of six species of the Pimelodidae family (Osteichthyes, Siluriformes) from the Tibagi River, state of Paraná, Brazil. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 24, n. 2, p. 513-517, 2002.
- ARANEDA, C. *et al.* Identification of a dominant SCAR marker associated with colour traits in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, v.247, p.67-73, 2005.
- ASTOLPHI, J.L.L. *Avaliação da diversidade genética entre a geração parental e sua progênie selecionada de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) da linhagem Chitralada com uso do marcador de RAPD*. 2003. Dissertação (Mestrado em Produção Animal-Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, Oxford, v. 73, p. 117-123, 1994.
- BARMAN, H.K. *et al.* Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified Polymorphic DNA assay. *Aquaculture*, Orissa, v. 217, n. 1/4, p. 115-123, 2003.
- BENTSEN, H.B. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 160, 1/2, p. 145-173, 1998.
- CASTAGNOLLI, N. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189p.
- DINESH, K.R. *et al.* RAPD analysis: an efficient of DNA fingerprinting in fishes. *Zoological Science*, [S.L.], v. 10, p. 849-854, 1993.
- DINESH, K.R. *et al.* Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 19-30, 1996.
- ELO, K. *et al.* Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 152, n. 1/4, p. 55-65, 1997.

EKNATH, A.E. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. *Aquaculture*, Amsterdam, v.111, n. 1/4, p. 171-188, 1993.

FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia aquaculture in the Americas *In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. Tilapia Aquaculture in the Americas*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 252-264.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome: FAO Information Division, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. *Regional review on aquaculture development 1. latin america and the Caribbean*. Rome: FAO Information Division, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. *Fisheries technical paper: State of world aquaculture*. Rome: FAO Information Division, 2006.

FROESE, R. and D. PAULY. Editors. 2004. FishBase. World Wide Web Electronic Publication. www.fishbase.org, version (02/04). Disponível em: <www.fishbase.org>. Acesso em: fev. 2004

GUPTA, M.V.; ACOSTA, B.O. From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. *NAGA - Worldfish Center Quarterly*, Penang, v. 27, n. 2/3, p. 4-14, 2004.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr. P.M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 26, n. 1, p. 19-25, 2003.

IBAMA – *Estatística da Pesca 2004 – Brasil: Grandes Regiões e Unidades da Federação*. Brasília: IBAMA, 2005.

ISLAM, M.S.; ALAM, M.D. Randomly amplified polymorphic DNA analyses of four different populations of the Indian major carp. *Labeo Rohita* (Hamilton). *J. appl. Ichthyol.* v.20, n. 5, p.407-412, 2004.

KAMAL, A.H.M.M.; MAIR, G.C. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. *Aquaculture*, v.247, p.189-201, 2005.

LI, S-F. *et al.* Improving growth performance and caudal fin stripe pattern in selected F6-F8 generations of gift Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection. *Aquaculture research*, v. 37, n.12, p.1165-1171, 2006.

LIU, Z.J.; CORDES, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, v.238, n.1-37, 2004.

LIU, Z.J. *et al.* Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2 and backcross hybrids. *Anim. Genet.*, v. 29, n. 1, p. 58-62, 1998.

LONGALONG, F.M. *et al.* Response to bi-directional selection for frequency of early maturing females in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, Amsterdam, v.178, p.13-25, 1999.

LOPERA-BARRERO, N.M. *et al.* Comparison of DNA extraction protocols from preserved fish fins and larva pcr amplification: modified salt extraction. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, 2007a. No prelo.

LOPERA-BARRERO, N.M. *et al.* RAPD analysis (Random Amplified Polymorphic DNA) in piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849) stocks of the southwest of Brazil: genetic variability and preservation. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, 2007b. No prelo.

LOPERA-BARRERO, N.M. *et al.* Genetic diversity in piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) stocks. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2007c. No prelo.

LUPCHINSKI Jr, E. *et al.* Aplicação de RAPD para avaliação da composição genética de três linhagens de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. In: CONGRESSO AQUACIÊNCIA 2006, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: AquaCiência, Criativa TEc, 2006. CD-R.

MARQUES, D.K.S. *Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros*. Corumbá: EMBRAPA Pantanal. Documentos, 36, 2002. 22p.

MARTINEZ, I. *et al.* The genetic structure of *Pandalus borealis* in the Northeast Atlantic determined by RAPD analysis. *Journal of Marine Science*, v.63, p.840-850, 2006.

MILLER, M. MANTEL-ESTRUCT: a program for the detection of population structure via mantel tests. *J. Heded, Cary*, n. 90, p. 258-259, 1999.

MOREIRA, H.L.M. Genética e melhoramento de peixes. In: MOREIRA, H.L.M. *et al.* *Fundamentos da Moderna Aqüicultura*. Canoas: ULBRA, 2001. p.135-147.

MOREIRA, H.L.M. *et al.* The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. In: WORLD AQUACULTURE, 2003, Salvador. *Abstracts...* Salvador: INVE, 2003. v. 2, p. 460.

NAISH, K.A. *et al.* Use of DNA fingerprinting, RAPD and RAPD/RFLP markers for estimating variation between aquacultural strains of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.137, n.1/4, p. 48-49, 1995.

OLESEN I. *et al.* Breeding programs for sustainable aquaculture. *J. A. Aqua.*, Binghamton, v. 13, n. 3/4. p. 179-204, 2003.

OLIVEIRA, A.V. *et al.* Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Paraná river floodplain of Brazil. *Genetica*, Amsterdam, v. 115, p. 259-267, 2002.

PINEDA, H. Estudio genético de las cachamas (subfamilia Serrasalminae) en poblaciones naturales y en cautiverio en Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec*, Medellín, v.17, n.3, p.62-63, 2004.

PONZONI, R.W. A Systematic Approach To Advance And Refine Genetic Improvement Programs In Aquatic Species. In: NATIONAL SYMPOSIUM ON GENETICS AND GENE BANKING OF FISH AND SHELLFISH, 2003, Kuala Lumpur, Anais... Kuala Lumpur, 2003. p. 9-16.

POVH, J. A. *et al.* Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.

- PRIOLI, S.M.A.P. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Gen. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.
- REILLY, A. *et al.* Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their ancestral Canadian population: comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 173, n. 1/4, p. 459–469, 1999.
- ROLLINSON, D.; STOTHARD, J.R. Identification of pests and pathogens by random amplification of polymorphic DNA (RAPDs). In: HAWKSWORTH, D.L. *Identification and characterization of pests organisms*. Wallingford: CAB International, 1994, p. 447-459.
- SANDOVAL-CASTELLANOS, E. *et al.* Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analyses. *Fisheries research*, v.83, p.113-118, 2007.
- WANG, C.H.; LI, S.F. Phylogenetic relationships of ornamental (Koi) carp, Oujiang color carp and Long-fin carp revealed by mitochondrial DNA COII gene sequences and RAPD analysis. *Aquaculture*, Amsterdam, v.231, p.83-91, 2004.
- WASKO, A.P. *et al.* Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinxã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programs. *J. Appl. Ichthyol.*, Oxford, v. 20, n. 1, p. 48-52, 2004.
- WASKO, A.P. A importância do monitoramento genético em estoques cultivados de matrinxã e piracanjuba. *Revista Panorama da Aqüicultura*, Botafogo, v. 15, n. 88, p. 47-49, 2005.
- WELSH, J. e MacCLELLAND. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acid res.* Oxford, v.18, n. 24, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- WINKLER, F. M. *et al.* Genetic differences among year classes in a hatchery population of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792)) in Chile. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 173, n. 1/4, p. 425–433, 1999.
- YAN, J. *et al.* RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) X common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 243, n. 1/4, p. 49-60, 2005.
- YEH, F.C. *et al.* *POPGENE Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis*. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.
- YOKE-KQUEEN, C.; RADU, S. Random amplified polymorphic DNA analyses of genetically modified organisms. *Journal of Biotechnology*, v. 127, p.161-166, 2006.

V. CONCLUSÕES GERAIS

A técnica RAPD demonstrou que a diversidade genética permaneceu alta, mesmo após o estabelecimento das linhagens Bouaké, Chitralada e GIFT; de tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Inclusive para as duas gerações de tilápias GIFT.

O conjunto de dados apontou também para o possível aproveitamento das linhagens estabelecidas há mais tempo no país (Bouaké e Chitralada), no desenvolvimento do programa de melhoramento genético GIFT, pois tais linhagens possivelmente apresentam características de adaptabilidade desejáveis.

Os resultados sinalizaram, ainda, para a importância da continuidade do projeto de melhoramento genético da tilápia do Nilo no Brasil, atualmente representado pela linhagem GIFT, que serviu de base populacional para o início deste processo.