

ERRATA

Página	Párrafo	Onde lê-se	Leia-se
04	último	À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida	À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida e à FAPEMIG (CBB 243-04) pelo apoio financeiro ao projeto.
Melo, Daniela Chemin de. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE SEIS PLANTÉIS DE TILÁPIA (<i>Oreochromis</i>) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES, 2004.			

Disponível on-line no Portal CAPES – www.dominiopublico.gov.br

DANIELA CHEMIM DE MELO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE SEIS PLANTÉIS DE TILÁPIA
(*Oreochromis*) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Zootecnia, área de Melhoramento Animal
Orientador: Prof^a Denise Aparecida Andrade de Oliveira

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2004

M528c Melo, Daniela Chemim de, 1978-

Caracterização genética de seis plantéis de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites / Daniela Chemim de Melo - 2004.

34p. : il.

Orientador: Denise Aparecida Andrade de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Bibliografia: p.

1. Tilápia (Peixe) - Teses. 2. Tilápia (Peixe) - Genética - Teses. 3. Endogamia - Teses.

1. Oliveira, Denise Aparecida Andrade de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD - 639.31

AGRADECIMENTOS

À professora Denise A. Andrade de Oliveira, por sua orientação, confiança e apoio em todos os momentos.

Ao professor Lincoln P. Ribeiro pela co-orientação, conselhos, incentivo, e amizade.

Ao professor Alexandre Benvido de Sousa pela amizade, incentivo e contribuições a este trabalho

À Lucília e aos meus pais, em especial, minha mãe, Bete pela compreensão, estímulo e carinho durante este trabalho e sempre.

Ao Rafael pelo apoio, compreensão e carinho.

Aos amigos do Laboratório de Genética, Ângelo, Ronaldo pelo carinho e amizade, à Cláudia que me acolheu como sua “orientada,” obrigada pela paciência ajuda e amizade e ao Eduardo pelos momentos divertidos.

Ao Daniel Crepaldi pela grande ajuda na coleta de amostras sangüíneas.

Aos amigos do cardume, Edgar, Shirley e Daniel pela amizade e carinho.

Aos amigos da pós-graduação: Lucas e Augusto

Aos colegas Marco Túlio e Bruno por terem fornecido as amostras

Ao Rodrigo pela grande ajuda na análise dos resultados

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

SUMÁRIO

	RESUMO	7
	ABSTRACT	7
1.	INTRODUÇÃO	8
2.	REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1	Tilápia e tilapicultura.....	9
2.2	Marcadores moleculares na piscicultura.....	10
3.	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Amostras.....	16
3.2	Colheita de matérias sólidos.....	16
3.3	Colheita de sangue.....	16
3.4	Extração de DNA de material sólido.....	16
3.5	Extração de DNA do sangue.....	16
3.6	Quantificação do DNA.....	17
3.7	Preparo das reações de amplificação.....	17
3.8	Primers.....	17
3.9	Eletroforese.....	17
3.10	Análise das bandas.....	18
3.11	Análise dos dados.....	18
4.	RESULTADOS	18
5.	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÕES	27
7	BIBLIOGRAFIA	27
8	ANEXOS 1	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Locos utilizados no estudo, tamanho aproximado dos alelos encontrados (TA) em pares de base (pb), alelos mais frequentes (AF), número de estoques em que estes alelos foram encontrados (NP) e o número de alelos encontrados para cada loco (N).....	19
Tabela 2- Frequência dos alelos observados para o loco UNH 104 nos seis plantéis.....	19
Tabela 3- Frequência dos alelos observados para o loco UNH 108 nos seis plantéis.....	20
Tabela 4- Frequência dos alelos observados para o loco UNH 136 nos seis plantéis.....	20
Tabela 5- Frequência dos alelos observados para o loco UNH 160 nos seis plantéis.....	20
Tabela 6- Frequência dos alelos observados para o loco UNH 169 nos seis plantéis.....	21
Tabela 7- Teste estatístico que diferencia os seis plantéis de tilápias estudados para cada loco microssatélite.....	21
Tabela 8- Número de indivíduos analisados (N), resultados das médias de homozigosi-	

<p>dade observada (H_o), homozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_{to}) e heterozigosidade esperada (H_{te}).....</p>	22
<p>Tabela 19- Resultados de F_{is} (coeficiente de endogamia intrapopulacional) e F_{st} (coeficiente de endogamia interpopulacional) para cada loco separado e F_{is} e F_{st} médio para o conjunto dos plantéis.....</p>	22
<p>Tabela 10- Identidade genética (I_g) e a distância genética (D_g) dos seis plantéis estudados.....</p>	22

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1- Polimorfismo das repetições em tandem devido ao variado número de cópias da unidade de repetição básica.....</p>	14
<p>Figura 2- Dendrograma mostrando as distâncias genéticas entre os seis plantéis.....</p>	23

RESUMO

Neste estudo, 235 indivíduos de seis plantéis de tilápia (Ceará, Chitralada, Israel, Nilótica, Taiwan e Vermelha) da região sudeste do país foram caracterizados geneticamente utilizando-se cinco locos de microssatélites. Analisando-se os seis plantéis pode-se verificar que existe uma grande diferença genética entre eles, obtida pelo cálculo do coeficiente de endogamia interpopulacional ($F_{st}=0,3263$) e que de modo geral está ocorrendo perda considerável de heterozigose nos plantéis, segundo mostra a estimativa do coeficiente de endogamia intrapopulacional ($F_{is}=0,0486$). Os plantéis Israel e Nilótica foram os mais semelhantes geneticamente ($I_g=0,6663$), enquanto que os plantéis Chitralada e Taiwan foram os que menos apresentam genes em comum ($I_g=0,2463$). O plantel denominado Vermelha foi o mais distinto entre todos. Em relação à origem dos plantéis os resultados obtidos pelo dendrograma indicaram que houve contradição com os dados obtidos pela literatura.

Palavras-chave: tilápia, microssatélite, estatística F, distância genética

ABSTRACT

In the present study, six commercial stocks of tilapias (Ceará, Chitralada, Israel, Nilótica, Taiwan and Red) of the southeast region of the country were genetically characterized using five microsatellites loci. A total of 235 individuals were analyzed. The results showed a great genetic difference among them obtained by the allele fixation index ($F_{st}=0,3263$), and that considerable loss of heterozygosity is occurring in almost all the stocks, according to the estimate inbreeding coefficient ($F_{is}=0,0486$). The stocks Israel and Nilótica were the most genetically similar ($I_g=0,6663$), while Chitralada and Taiwan stocks were the ones that presented less genes in common ($I_g=0,2463$). The stock denominated Red was the most distinct among all of them. Regarding the origin of the stocks the results showed by the dendrogram indicated that there is some contradictions between the data obtained from the literature about the stocks origin records.

Key-words: tilapia, microsatellite, statistic F, genetic distance

1 – INTRODUÇÃO

As mudanças de hábito alimentar, isto é, a procura por alimentos de origem animal com baixos níveis de colesterol e alto valor protéico, têm colocado a carne do peixe no cardápio diário de muitas populações. Contudo, a pesca já não atende às expectativas do mercado consumidor, estando estagnada em torno de 85 milhões de toneladas ao ano devido ao rápido declínio nos estoques naturais de peixes, crustáceos e moluscos nos mares e rios, causados principalmente pelos problemas ambientais.

Com a estagnação da quantidade de pescado proveniente da captura, a aquacultura deverá assumir, nos próximos anos, a responsabilidade em atender a demanda de produtos aquícolas, através do aumento da utilização de espécies e tecnologias adequadas. De acordo com a FAO (1995), a aquacultura apresenta um rápido crescimento em produção. Na última década, a produção mundial da aquacultura aumentou de 6,7 para 20,9 milhões de toneladas (Tacon, 2002).

Segundo Moreira (1999), embora nossas águas continentais apresentem grande potencial e nossas condições climáticas sejam excelentes para a piscicultura intensiva e semi-intensiva, a produção de pescado em nosso país é muito pequena, sendo estimada em aproximadamente 800 mil t/ano. Isso tem ainda mais importância se considerarmos que 20% da água doce do planeta encontra-se no Brasil.

Recentes levantamentos comprovam o crescimento da tilapicultura em todo o mundo, principalmente pelas características das tilápias tais como: alta prolificidade, aceitação de uma grande variedade de alimentos, boa conversão alimentar, por serem resistentes a muitas doenças, e baixos teores de oxigênio dissolvido e desovarem

durante todo o ano. Além disso, deve-se destacar que ainda possuem carne saborosa e com baixo teor de gordura (0,9 g/100g de carne) e de calorias (172 kcal/100g de carne). Poucas características negativas são apresentadas, mas podem ser superadas pelo aperfeiçoamento dos sistemas de produção, seleção e manipulação genética. De acordo com Toledo (2002), a produção mundial de tilápias está próxima de um milhão de toneladas/ano, sendo que o Brasil responde por 40 mil toneladas/ano. A produção de tilápias apresenta ainda um mercado consumidor emergente que fará da tilapicultura o maior grupo de produção na aquacultura (Fitzsimmons, 2000).

Até agora grande parte do que é produzido destina-se ao repovoamento dos chamados *pesque-pagues*. No entanto, segundo Toledo (2002), este cenário começa a mudar com o crescente interesse no aproveitamento industrial da tilápia. Tanto indústrias de alimentos como grandes redes de supermercados têm procurado aumentar as vendas desse peixe sob as formas de alimento pronto ou semipronto, bem como em cortes e preparações variadas, cujos preços vão de R\$ 7,00 a 10,00 Reais por quilo. Isso indica que a população também vem mudando seus hábitos alimentares, valorizando cada dia mais o consumo da carne de peixe.

Para o desenvolvimento da tilapicultura no Brasil, faz-se necessário conhecer geneticamente as linhagens produzidas nos principais sistemas de produção adotados no país, para assim utilizar aquelas que apresentam características zootécnicas desejáveis.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: Caracterizar geneticamente plantéis de tilápias criadas do sudeste do Brasil com o auxílio de microssatélites, Gerar informações que possam ser empregadas na condução de futuros

programas de melhoramento genético da espécie.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – A tilápia e a tilapicultura

Tilápia é o nome comum de aproximadamente 70 espécies de peixes taxonomicamente classificadas, da família Cichlidae, nativas de água doce da África tropical (McAndrew & Majumdar, 1986; Fitzsimmons, 2000; Hilsdorf, 2002). Recentemente são criadas em todo mundo, em vários países dos hemisférios norte, sul e especialmente no Oriente Médio e Ásia. O que pouco se sabe, é que, em muitos casos, as tilápias foram importadas primeiramente para controle de “ervas daninhas” aquáticas e mosquitos, e secundariamente como alimento (Fitzsimmons, 2000).

As tilápias de importância comercial estão divididas em 3 principais grupos taxonômicos, distinguidos basicamente pelo comportamento reprodutivo. São eles o gênero *Tilapia* (os peixes incubam seus ovos em substratos), *Oreochromis* (incubam os ovos na boca das fêmeas) e *Sarotherodon* (incubam os ovos na boca do macho ou de ambos) (Lovshin, 1998; Moreira, 1999; Fitzsimmons, 2000). Dentre as espécies de tilápias, apenas quatro conquistaram destaque na aqüicultura mundial: a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia azul de Moçambique (*Oreochromis aureus*), a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) e a tilápia de Zanzibar (*Oreochromis urolepis hornorum*). A essas quatro espécies somam-se os seus variantes e híbridos, com cores variando do laranja, ouro, rosa e vermelho, genericamente chamados de tilápias vermelhas (Lovshin, 1998). Hoje são os peixes de cultivo mais importantes nas regiões tropicais no mundo. Os mesmos são rústicos, de crescimento rápido, não requerem tecnologia sofisticada, além de possuírem excelente sabor e textura. Sua importância como fonte de proteína

animal nos países subdesenvolvidos é amplamente reconhecida (Mc Connell et al., 2000).

A tilápia foi introduzida no Brasil na década de 50, entretanto, a criação intensiva em tanques teve início somente a partir de 1990 (Silva & Chammass, 1997). Embora esta produção englobe várias espécies, o cultivo de tilápia domina o cultivo de peixes no Brasil (Lovshin & Cyrino, 1997). Atualmente é um peixe encontrado em quase todo país, tanto em cultivos comerciais como em reservatórios e açudes.

A primeira espécie do grupo tilápia introduzida no Brasil foi a *Tilapia rendalli*, no ano de 1953. Essa espécie foi obtida no Congo (África) e foi utilizada para povoamento da represa “Light”, em São Paulo, e do lago Paranoá, em Brasília (Castagnolli, 1992, citado por Moreira, 1999). Segundo Moreira (1999), essa espécie veio classificada erroneamente como *Tilapia melanopleura*, devido à semelhança entre ambas. A próxima introdução de peixe deste grupo foi à espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo, fitoplantófaga), em Pentecostes, estado do Ceará, no ano de 1971. Os exemplares desta espécie eram provenientes da Costa do Marfim (África). Neste mesmo ano foi introduzida a espécie *Oreochromis hornorum* (tilápia Zanzibar, fitoplantófaga), também na estação de Pentecostes-CE, procedente da Costa do Marfim. Posteriormente, outras espécies foram introduzidas com o objetivo de hibridação, entre elas *Oreochromis mossambicus* e *Oreochromis aureus* (Moreira, 1999).

Ainda segundo Moreira (1999) a última introdução oficial de peixe pertencente a este grupo foi à espécie *Oreochromis niloticus* no ano de 1996. Os exemplares, em número de 20.8000, foram importados do Agricultural and Aquatic Systems, do Asian Institute of Technology (AIT), com sede na Tailândia. O estoque deste centro foi formado por importação proveniente do

Japão, e o estoque do Japão teve origem a partir de material recebido do Egito (África). A importação foi realizada pela Alevinopar (Associação de Produtores de Alevinos de Estado do Paraná) e SEAB (Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Paraná).

Muitas incidências de hibridização têm sido relatadas, principalmente depois da introdução de espécies não endêmicas (McAndrew & Majumdar, 1986). Alguns híbridos têm demonstrado boa performance nos sistemas produtivos, especialmente em regiões tropicais. Entretanto, o manejo reprodutivo de tais espécies vem sendo feito de modo precário ou inadequado em muitos países, gerando diversos problemas. Segundo Kocher et al., (1998), técnicas de hibridização interespecífica mal conduzidas têm levado à perda de espécies puras. Elevados índices de depressão endogâmica foram relatados por Eknath & Doyle (1993), ao compararem plantéis criados nas Filipinas com outros isolados da natureza, concluindo que os últimos apresentaram melhor performance que os artificialmente criados. Além disso, muitas são as evidências de contaminação de estoques geneticamente melhorados pela introgressão de espécies selvagens (Macaranas et al., 1986).

Na tentativa de identificação das espécies e subespécies de tilápias, características como hábito reprodutivo e alimentar, desenvolvimento e características estruturais têm sido muito utilizados. No entanto, tais caracteres têm valor restrito, por causa da grande variação intrapopulacional e de diferenças sutis entre plantéis (Bardakci & Skibinski, 1994). No caso de híbridos essa tarefa é ainda mais complicada, pois estes geralmente têm aparência intermediária entre as espécies parentais. Outra dificuldade, ainda maior, é estabelecer o relacionamento genético ao nível de populações. Segundo Moreira (1999), isso ocorre porque registros genealógicos de populações aquáticas são notoriamente difíceis de manter, já que a maioria dos peixes produz um grande número de

progênes, as quais são geralmente muito pequenas para serem marcadas. Considerando que num mesmo local estão presentes várias progênes de diversos peixes, sua identidade familiar é assim, perdida. Ainda segundo Moreira (1999), a capacidade de inferir a estrutura familiar de populações aquáticas é uma ferramenta valiosa para a genética de populações, ecologia e comportamento animal, entre outras áreas. Além disso, tem também importantes aplicações práticas no manejo de estoques de reprodutores em programas de melhoramento das espécies.

A produção de alevinos de tilápia no estado de Minas Gerais vem crescendo nos últimos anos, procurando atender à carência do mercado por um produto que apresente regularidade de produção, qualidade dos alevinos em relação ao tamanho uniforme; aspectos sanitários; índice de inversão sexual; logística de entrega e qualidade genética dos peixes (Toledo, 2002).

Neste sentido, é fundamental a identificação genética dos plantéis. Esta avaliação é de extrema importância, uma vez que a variabilidade genética é a fonte básica para qualquer sucesso comercial, bem como para a implantação de programas de criação seletiva comercial, que tenham como objetivo a produção de peixes de crescimento rápido, com melhores índices de conversão alimentar e resistentes à doenças.

2.2 - Marcadores moleculares na piscicultura

As tilápias estão se tornando uma importante espécie de peixe criada e utilizada em pesquisas em muitos países tropicais e subtropicais. Elas têm sido transferidas intencionalmente ou acidentalmente para vários lugares fora de seu local de origem, e isso tem levado à formação de híbridos. O que torna a identificação morfológica de avaliação de estoques difícil.

A identificação de espécies é crucial para programas de conservação. É também um pré-requisito essencial para estudos de populações. Frequentemente, muitas espécies são identificadas com base em morfologia, mas este método é muito problemático. Marcadores moleculares têm permitido identificar espécies, independente do estágio de vida do animal (Ferguson et al., 1995).

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (Matioli, 2001). Milach (1998) descreve que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente de acordo com as leis básicas de herança descritas por Mendel e servem para identificar um local ou uma região de um cromossomo.

Um marcador genético ideal deve apresentar uma série de atributos: a) alto nível de polimorfismo, b) estabilidade em diferentes ambientes, c) detectar grande número de locos não ligados e d) ser de herança simples (Milach, 1998; Matioli, 2001).

A escolha dos marcadores a serem utilizados deve ser feita com base em suas características e nos objetivos do estudo. Podem variar de acordo com sua origem, número de alelos, número de locos, tipo de interação e grau de homologia entre diferentes espécies (Blott et al., 1999; Sunnucks, 2000; Martins et al., 2002).

Dentre as principais classes de marcadores genéticos, podemos citar aloenzimas, isoenzimas, polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificado ao acaso (AFLP), polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) e marcadores

baseados em seqüências de DNA repetitivo (VNTR), como microssatélites e minissatélites.

O uso de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento. Podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subsequentes, comprovando sua natureza genética (Milach, 1998).

Também podem ser utilizados em diferentes estudos de populações de peixes e em aquicultura para estimativas do tamanho efetivo de populações, identificação de híbridos e espécies, determinação genética do impacto de introdução de populações e peixes cultivados em determinada área, estabelecimento de relações filogenéticas, identificação de populações-chave para conservação de recursos genéticos, construção de mapas genéticos e definição de estratégias de melhoramento (Ferguson et al., 1995). Comportamento social e reprodutivo das espécies e padrões de acasalamento também têm sido estudados com o auxílio de marcadores moleculares (Hughes, 1999).

Algumas características dos marcadores moleculares podem aumentar seus níveis de eficiência e aplicabilidade em diferentes estudos genéticos. Um atributo vantajoso para um marcador genético é a homologia entre diferentes espécies, que possibilita a utilização de dados de diversas origens em estudos comparativos (Sunnucks, 2000).

Marcadores morfogenéticos, geralmente associados a caracteres fenotípicos, e marcadores enzimáticos ou bioquímicos, associados a múltiplas formas moleculares de proteínas, representam as abordagens

iniciais usadas para analisar características que refletem a composição genética de estoques de peixes (Martins et al., 2002). Enquanto estudos iniciais nos anos 60 envolveram proteínas tais como hemoglobina e transferrina, atenções rapidamente se voltaram para proteínas enzimáticas (aloenzimas) onde a maioria dos subseqüentes estudos tem sido baseada (Ferguson et al., 1995). A simplicidade e baixo custo da análise por eletroforese fizeram com que essas ferramentas fossem amplamente utilizadas para a caracterização genética de espécies, plantéis e/ou estoques de peixes (Rognon et al., 1996).

A caracterização de proteínas por eletroforese (aloenzimas) tem sido empregada para se estabelecer relações filogenéticas entre espécies dos gêneros *Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis* (Pouyaud & Agnèse, 1995), variação genética entre populações naturais e cultivadas de *Oreochromis niloticus* e *Tilapia zillii* (Rognon, et al., 1996) e também para híbridos (Maracanas et al., 1986). Uma das principais limitações das variantes protéicas como marcadores genéticos é o baixo nível de polimorfismo em algumas espécies e plantéis, pelo fato das mutações possíveis de detecção estarem limitadas às regiões codificadoras. Além disso, em alguns casos, o uso destas proteínas é dependente do estágio do desenvolvimento do animal (Studart, 2001).

Estudos de aloenzimas em Salmão do Atlântico (*Salmo salar L.*) têm permitido subagrupá-lo em três raças (América do Norte, Europeu do Oeste e Mar Báltico) (O'Connel et al., 1995). Contudo, a variabilidade genética nesses locos tem sido baixa, não servindo como marcadores genéticos para o diagnóstico entre estoques de salmão. Além disso, os autores Seyoum & Kornfield, (1992), mostraram que a eletroforese de proteínas não permitiu discriminar subespécies de *O. niloticus*,

devido à baixa variabilidade intrapopulacional. Assim, julgaram que a eletroforese de proteína não é adequada para estudos intra-específicos. Mesmo em truta marrom, uma das espécies de peixes mais polimórficos, usualmente, somente dois ou três alelos segregados foram encontrados para um loco em uma população particular (Ferguson, 1989).

Um dos grupos mais usados de marcadores moleculares, e que foi o primeiro a ser desenvolvido, são os RFLPs (Polimorfismo no Comprimento dos fragmentos de Restrição – “Restriction fragment Length Polymorphism”). Quando clivados com enzimas de restrição, expressam, por eletroforese, as diferenças de comprimento de fragmentos de DNA, observadas por meio de hibridização desses fragmentos com seqüências homólogas do DNA marcado com radioatividade ou por luminescência. Os RFLPs podem ser causados por mudanças de pares de base, rearranjo de DNA, inserção e/ou deleção ou diversidade natural na seqüência de nucleotídeo entre ou dentro de plantéis (Botstein et al., 1980; Matioli, 2001).

Russell et al. (2000) mostrou que o método de RFLP foi capaz de diferenciar 10 espécies de salmão e essa técnica pode ser facilmente adotada pelas indústrias de alimento para análise de produtos processados de salmão, como também é uma ótima ferramenta para se desenvolver mapas de ligação (Agresti et al., 2000) e diferenciação genética entre plantéis naturais de tilápia do Nilo (Agnese et al., 1997).

Mais recentemente, o advento de técnicas baseadas em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase – “Polymerase Chain Reaction”) apresentou uma nova opção ao uso de marcadores moleculares. A técnica foi desenvolvida em meados da década de 80, por Karl Mullis e colaboradores, e alcançou uso disseminado e extenso em diversas áreas da biologia quase que imediatamente

(Milach, 1998; Matioli, 2001). PCR é uma técnica poderosa usada para ampliar pequenas seqüências específicas de nucleotídeos em quantidades acessíveis à análise, a partir de ínfima quantidade de DNA. Baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de primers específicos ou não. Tais primers delimitam a seqüência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas.

Vários marcadores se baseiam no princípio do PCR como: amplificação ao acaso de polimorfismo de DNA, RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) e seqüências de DNA repetitivo, VNTR (minissatélites e microssatélites). Embora mais caros, mas tecnicamente mais informativos, os marcadores de DNA apresentam vantagens em relação aos marcadores protéicos pela possibilidade de monitorar regiões do genoma transcritas ou não, independente da fase de desenvolvimento do indivíduo. Além disso, estes marcadores de DNA apresentam graus de polimorfismo mais elevados e podem ser analisados pela técnica da PCR. Desse modo, torna-se possível o uso de material genético velho ou mesmo degradado, que pode ser estocado por longo tempo (Studart, 2001; Fergunsom et al., 1995).

A utilização de RAPD em estudos moleculares com peixes tem tido resultados favoráveis, permitindo a elucidação de problemas nas áreas de piscicultura, ecologia e genética (Almeida, 1998). Bardaki & Skibinski (1994) usaram marcadores moleculares RAPD para discriminar estoques de tilápias. Estudos genéticos envolvendo marcadores RAPD vêm sendo utilizados com sucesso na avaliação dos níveis de diversidade genética de diferentes estoques naturais e criados de *Brycon cephalus*, espécie de peixe

popularmente conhecida como matrinhã da Amazônia (Martins et al., 2002).

Outro exemplo é dado por Almeida (1998) ao estudar seis espécies de pimelodídeos do rio Tibagi (PR). Através de RAPD, constatou a existência de uma nova espécie que não tinha sido descrita anteriormente naquela bacia, *Pimelodus absconditus*, e ainda a diferenciação de duas espécies do gênero *Pimelodella*: *P. gracillis* e *Pimelodella* sp. Até o momento, naquela bacia, era registrada apenas a espécie *P. gracillis*. Foram encontrados marcadores para todas as espécies estudadas.

Em tilápias, Lima et al., (2000) ao analisarem com RAPD *Oreochromis niloticus*, *O. hornorum*, *Tilapia randalli* e dois híbridos de tilápias vermelhas (*Oreochromis* spp. e *O. hornorum* x *O. niloticus*), provenientes do Estado do Ceará, mostraram que esta técnica é viável tanto para diferenciar as espécies, como também revelou que todos os grupos analisados apresentavam baixa variação intrapopulacional.

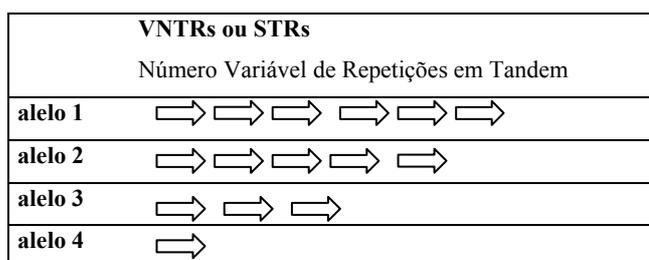
Embora o RAPD seja usado para estimar diversidade genética entre espécies e plantéis, não é adequado para estimar o endocruzamento, pois é um marcador do tipo dominante. Por este motivo, a presença de uma dada banda RAPD não distingue se o respectivo loco é homocigoto ou heterocigoto e inviabiliza a estimativa do endocruzamento através das metodologias existentes (Moreira, 1999; Ferguson et al., 1995; Studart, 2001). Esse problema tem limitado a aplicação de RAPDs em estudos com peixes.

A grande maioria dos eucariotos e parte dos procariotos e eubactérias é caracterizada pela presença de seqüências não codificadoras que estão presentes em múltiplas cópias no genoma (DNA repetitivo). Esse DNA repetitivo, não codificador, pode apresentar-se como

seqüências intervenientes/espçadoras ou em repetições em tandem (Matioli, 2001). As repetições em tandem são normalmente denominadas como tipos de DNA satélite e foram classificadas de acordo com o tamanho da unidade de repetiçãõ, ou seja, microssatélite, minissatélite ou apenas DNA satélite.

O chamado DNA satélite é constituído de um extenso arranjo de 10 a 110 pares de bases (pb). Este é freqüentemente encontrado na heterocromatina associada aos centrômeros, composto de centenas ou milhares de unidades de repetiçãõ altamente homólogas. Minissatélites ou regiões de VNTR (número variável de repetições em tandem, do inglês “Variable Number

Tandem Repeat”) são repetições em tandem de 10-100pb de comprimento e se repetem de duas a várias centenas de vezes no loco. Por sua vez, os microssatélites, também conhecidos como STR – (Repetições curtas em tandem “Short Tandem Repeats”), são elementos repetitivos, formados por arranjos de repetições em tandem, de 2 a 6 nucleotídeos de comprimento e estão entre os locos mais polimórficos dos genomas (Ferguson et al., 1995; Milach, 1998; Matioli, 2001). O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variaçãõ do número dos elementos repetidos (Figura 1), provavelmente devido aos erros da DNA polimerase durante o processo de replicaçãõ e reparo da molécula de DNA (Studart, 2001).



Fonte: adaptado de Lima(1998).

Figura 1- Polimorfismo das repetições em tandem devido ao variado número de cópias da unidade de repetiçãõ básica.

⇨ Unidade básica de repetiçãõ

Segundo Schlötterer & Tautz (1992), teoricamente, o polimorfismo das seqüências repetitivas pode ser causado por outros mecanismos, como por exemplo, o “crossing over” desigual. Porém, muitos estudos sugerem que o deslizamento do molde durante a replicaçãõ (“replication slippage”) é a principal causa da formaçãõ de novos alelos. Sendo assim, os microssatélites apresentam taxas de mutaçãõ significativamente superiores àquelas observadas em grande parte do genoma, sendo de 10^{-4} a 10^{-3} por geraçãõ. Não obstante, sabe-se que as taxas de mutaçãõ dos microssatélites não são constantes, podendo variar entre espécies, tipos de

repetições, locos e alelos, além de serem influenciados pela idade e pelo sexo dos indivíduos (Studart, 2001).

A repetiçãõ dinucleotídica $[CA]_n$ é uma das mais abundantes famílias de microssatélites nos genomas de vertebrados, ocorrendo a uma média de 15 a 30 kb (kilobases) (Lee & Kocher, 1996; Moreira, 1999). Os microssatélites predominantes em peixes compreendem, até agora, repetições de duas bases, usualmente $(GT/CA)_n$ ou $(CT/CA)_n$ (Lee e Kocher, 1996; Carleton et al., 2002). Lee & Kocher, (1996) isolaram 133 locos $[CA]_n$ e 7 locos $[AAC]_n$ de microssatélites

para *Oreochromis niloticus* e estabeleceram os primers para as seqüências flanqueadoras.

Comparando-se microssatélites com outros marcadores moleculares, constata-se que estes apresentam uma série de vantagens sobre os demais: são abundantes, cobrem extensivamente o genoma, possuem natureza multialélica, necessitam de pequenas quantidades de DNA para análise, são de fácil detecção por PCR, têm herança do tipo mendeliana e são expressos como alelos codominantes (Lima, 1998; Moreira, 1999).

Os microssatélites têm sido aplicados em diversos estudos na área animal, entre eles: estimativas de distâncias genéticas entre plantéis de salmão do Atlântico (Sánchez et al., 1996); monitoramento de linhagens endocruzadas de ratos (Otsen et al., 1995); testes de paternidade em bovinos (Curi & Lopes, 2001); comparações de composição genética de amostras recente e antiga em salmão do Atlântico (Nielsen et al., 1997) e análise da diversidade genética no peixe anádromo *Savelinus alpinus* (Bernatchez et al., 1998).

Reilly et al., (1999) ao utilizarem microssatélites em *Salmo salar*, uma espécie de salmão, com o intuito de diferenciar estoques na Tasmânia, relataram que a perda de heterozigose em peixes cultivados pode ser mais facilmente revelada por estes marcadores, se comparados a marcadores de isoenzimas e de DNA mitocondrial (mt). Tessier et al., (1995) identificaram alto grau de diferenciação genética em populações de salmão do Atlântico com marcadores de microssatélites, onde análises de isoenzimas e de DNA mt haviam falhado em revelar tal estruturação em salmão do Atlântico Norte. Reprodutores de carpa comum na Hungria foram analisados geneticamente utilizando microssatélites e RAPD (Bártifai, et al., 2003). Os autores chegaram à conclusão de que as análises feitas por marcadores microssatélites revelaram informações mais

detalhadas sobre a diversidade genética dos animais do que os marcadores RAPD.

Assim sendo, os polimorfismos de microssatélites de DNA tornam-se ferramentas valiosas na genética animal, não apenas na identificação individual e determinação de relações familiares, mas também como fonte de marcadores genéticos informativos que podem ser associados a características quantitativas e serem empregados em programas de melhoramento animal (Curi & Lopes, 2001).

Otsen et al. (1995), usando uma combinação de 37 locos, conseguiram encontrar padrões específicos para cada linhagem de ratos, mesmo para aquelas intimamente relacionadas. Dessa maneira os microssatélites podem ser usados como uma ferramenta para selecionar linhagens para cruzamentos geneticamente controlados. Também é possível subagrupar animais mais homogêneos geneticamente e avaliar similaridades genéticas entre e dentro de raças, utilizando genótipos multilocos de microssatélites (Ciampolini et al., 1995). Agnese et al., (1999) conseguiram através de marcadores microssatélites, identificar uma população pura da espécie *Oreochromis esculentus*, ameaçada de extinção, e preconizaram que estes marcadores serão úteis para identificar novas populações desta espécie e também para determinar o grau de introgressão genética de outras espécies sobre *O. esculentus*.

Estudos semelhantes foram realizados por Fuerst et al. (2000) em *Oreochromis niloticus*, para identificar o nível de introgressão desta espécie que foi introduzida no Lago Vitória, África, no início do século XX.

No Brasil os estudos envolvendo a aplicação de microssatélites em ictiologia e aquicultura são escassos e recentes. Moreira (1999) utilizou este método na análise de estoques de reprodutores de Tilápia do Nilo

a fim de verificar a origem dos mesmos e determinar métodos que visem a manutenção da variabilidade genética dos estoques cultivados no país. Este autor relatou alta taxa de endogamia em estoques cultivados, mostrando que, principalmente na região sul do Brasil, as linhagens mantidas para larvicultura não possuem a variação genética adequada para realização de programas de melhoramento. Almeida-Toledo et al. (2001) conseguiram encontrar marcadores espécie-específicos para a diferenciação em *Eigenmannia*, conhecido como Sarapó ou Muçum, também a partir de *primers* de microssatélites.

Assim sendo, uma vez caracterizadas as diferentes linhagens de tilápias mantidas em criatórios no sudeste do Brasil, tornar-se-á possível a introdução de programas de melhoramento genético com a finalidade de aumentar a produtividade e de selecionar os melhores estoques, principalmente para a reprodução.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Amostras

Foram utilizados 240 quarenta peixes, sendo 40 de cada um dos seis plantéis amostrados. Três deles (Ceará, Taiwan e Chitralada) são da fazenda Água Fria, localizada no município de Esmeraldas, no estado de Minas Gerais, o quarto e o quinto plantel (Nilótica e Vermelha) foram provenientes de um criatório particular do estado de São Paulo, localizado no município de Jundiá e o sexto plantel (Israel) veio de uma fazenda particular no município de Paraíba do Sul, no estado do Rio de Janeiro. Todos os peixes foram colhidos aleatoriamente, não importando o sexo dos mesmos. Os peixes dos cinco primeiros plantéis citados acima foram transportados vivos para Laboratório de Genética da Escola de Veterinária - UFMG, onde foram obtidas amostras de sangue, fígado e nadadeira caudal e do

sexto plantel os materiais biológicos foram colhidos na própria fazenda. Exemplar de cada linhagem utilizada neste estudo é mostrado no anexo 3.

3.2 - Colheita de materiais sólidos

Foram retirados pedaços do fígado e nadadeira caudal, os quais foram conservados em álcool absoluto e mantidos em freezer até serem processados.

3.3 - Colheita de sangue.

Amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca com seringas estéreis de 1 ml e conservadas em EDTA (0,1ml de EDTA para cada 1 ml de sangue) à temperatura de 4°C.

3.4 - Extração de DNA de material sólido

A extração de DNA dos tecidos foi feita com o auxílio do kit de extração EZ DNA (Biological Industries). Depois de extraído, o DNA foi guardado em microtubos e conservado em geladeira.

3.5 - Extração de DNA do sangue

A extração foi feita conforme a técnica do Laboratório de Genética Veterinária da Universidade da Califórnia Davis, modificado de Yves Amigues – INRA - Jouy en Josas – França (não publicado), que consistiu-se em:

Lavar 100 µl de sangue total com tampão NE; centrifugar; retirar o sobrenadante deixando aproximadamente 100 µl; repetir os itens os três primeiros passos por mais duas vezes, homogeneizando bem; descartar o sobrenadante; acrescentar 30 µl de solução de lise, homogeneizando bem com a pipeta; deixar incubar em termociclador por 15 minutos a 96°C;

centrifugar rapidamente; acrescentar 30µl de solução neutralizante e estocar em

geladeira.

3.6 - Quantificação do DNA

Para quantificar o DNA, 10µl de cada amostra foram colocados em microtubo e diluídos em 490 µl de H₂O Milli-Q, sendo então, submetidas à análise em espectrofotômetro (Shimadzu –UV – 160 A). O resultado fornecido pelo aparelho foi então, multiplicado por 50 (referente à diluição feita) e 50 novamente (referente à densidade óptica), assim a quantidade de DNA resultante foi dada em µg/ml.

3.7 - Preparo das Reações de Amplificação

As reações foram preparadas em câmara de fluxo laminar para se evitar possíveis contaminações por DNA exógeno.

O sistema de amplificação foi composto dos seguintes reagentes: Tampão 10X (*) 1X, dNTPs 0,2 mM (Promega), primers 0,2 mM, Taq polimerase 5U/µl com 1,5 mM de MgCl₂ (Phoneutria) 0,5 U, DNA genômico 1µl e H₂O Milli-Q q.s.p 10µl.

Todas as reações foram preparadas com água milli-Q autoclavada e mantidas a – 20°C até o momento do uso. O DNA foi adicionado às reações após todos os outros componentes, fora da câmara de fluxo laminar evitando-se assim contaminação das soluções de estoque.

Depois de preparadas as reações, os tubos foram centrifugados brevemente para homogeneização dos reagentes. Em todas as amplificações foi feito um tubo controle negativo sem DNA para detecção de possíveis contaminações. Tal controle negativo foi denominado de branco e utilizado em todas as reações.

As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research - modelo PTC –

100™ com tampa aquecida (com capacidade para 60 tubos).

O programa de amplificação padronizado consistiu das seguintes etapas:

1 ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto da temperatura de anelamento (tabela 1), 1 minuto a 72°C e o último ciclo de alongação a 72°C por 5 minutos. Ao término do processo, o material amplificado foi mantido a 4°C até a realização das análises.

Temperaturas de anelamento utilizadas para cada primer:

Primer UNH 104 - 52°C

Primer UNH 108 - 50,2°C

Primer UNH 136 - 52,4°C

Primer UNH 160 - 50°C

Primer UNH 169 - 50,5°C

3.8 - Primers

Foram utilizados os seguintes primers:

UNH 104: (Lee,W.-J. and Kocher,T.D., 1995), GenBank G12257

UNH 108: (Lee,W.-J. and Kocher,T.D., 1995), GenBank G12261

UNH 136: (Lee,W.-J. and Kocher,T.D., 1995), GenBank G12288

UNH 160: (Lee,W.-J. and Kocher,T.D., 1995), GenBank G12312

UNH 169: (Lee,W.-J. and Kocher,T.D., 1995), GenBank G12321

3.9 – Eletroforese

Do material amplificado, 10 µl de cada amostra, acrescidos de 2 µl de tampão de corrida, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Para controle acrescentou-se aos géis, na primeira canaleta, o padrão de peso molecular p-GEM G1741 (Promega). A corrida foi realizada por duas horas a 120 volts. Finda a eletroforese os géis foram corados pelo

método do nitrato de prata e fotografados com câmera digital (Sony Mavica MVC – FD75).

3.10 - Análise das bandas

Para análise das bandas observadas nos géis, utilizou-se o programa Image Master - Totallab versão 1.0 no Departamento de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária –UFMG.

3.11 - Análise dos dados

A análise dos dados foi feita com o auxílio dos programas Genepop web versão 3.1 (disponível na rede mundial) e PopGene 1.32 (Yeh et al., 1999). Com o programa Genepop foi possível obter dados como o Fis (coeficiente de endogamia dentro dos plantéis) e Fst (coeficiente de endogamia entre os plantéis ou índice de fixação de alelos), o número de alelos observados (N) e as frequências alélicas, bem como testar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Assim, foi possível estimar a variabilidade genética entre e dentro dos plantéis. Para calcular a heterozigose observada e esperada, a distância e a identidade genética entre os plantéis e construir o dendrograma foi utilizado o programa PopGene.

4 - RESULTADOS

Esse foi o primeiro estudo em que seis plantéis de tilápias da região sudeste do país foram avaliados utilizando-se microssatélites. Isso permitiu caracterizá-las e fazer algumas inferências sobre a estrutura de tais plantéis.

Um número total de 15 alelos foi encontrado para os cinco locos microssatélites estudados. Destes, nove alelos foram observados no loco UNH 104 com tamanhos

variando entre 121 a 215 pares de base (pb) (Tabela 1). O alelo 145 pb foi o que apareceu com maior frequência, estando presente em cinco dos seis plantéis. Seis alelos foram encontrados para o loco UNH 108 com alelos variando de 121 a 164 pb de comprimento. Neste loco o alelo mais freqüente foi o de 136 pb, encontrado nos seis plantéis estudados. O loco UNH 136 apresentou sete diferentes alelos, que variaram entre 148 a 200 pb. O alelo mais freqüentemente encontrado foi o de 164 pb, estando presente nos seis plantéis. O loco UNH 160 foi o que apresentou um maior número de alelos, 11, variando de 131 a 234 pb. Neste loco o alelo 180 pb foi encontrado nos seis plantéis, sendo o mais freqüente deles. Igualmente ao loco UNH 108, para o loco UNH 169 também foram encontrados seis diferentes alelos, estes, variando entre 121 a 190 pb, sendo o alelo de 136 pb o mais freqüente, estando presente em cinco dos seis plantéis. Os locos UNH 108 e UNH 169 mostraram variabilidade mais baixa neste estudo, se comparados aos outros locos.

O loco UNH 104 apresentou apenas um alelo nos plantéis Ceará (alelo 6), Israel (alelo 13) e Nilótica (alelo 5) (tabela 2). Já o loco UNH 108 apresentou um único alelo nos plantéis Chitralada (alelo 1) e Vermelha (alelo 8) (tabela 3). O loco UNH 136 apresentou somente um alelo nos plantéis Nilótica (alelo 5), Taiwan (alelo 7) e Vermelha (alelo 9) (tabela 4). Os plantéis Nilótica e Vermelha foram os que apresentaram apenas um alelo para o loco UNH 160 (alelos 4 e 2) (tabela 5) e o plantel Chitralada para o loco UNH 169 (alelo 9) (tabela 6). O plantel Ceará foi o único que apresentou dois alelos monomórficos, um para o loco UNH 136 (alelo 8) (tabela 5) e outro para o loco UNH 169 (alelo 2) (tabela 6). Alguns géis analisados são mostrados no anexo 2.

Tabela 1 – •Locos utilizados no estudo, tamanho aproximado dos alelos encontrados (TA) em pares de base (pb), alelos mais freqüentes (AF), número de estoques em que estes alelos foram encontrado (NP) e número de alelos encontrados para cada loco (N).

LOCOS	TA (pb)	AF	NP	N
UNH 104	121-215	145	5	9
UNH 108	121-164	136	6	6
UNH 136	148-200	164	6	7
UNH 160	131-234	180	6	11
UNH 169	121-190	136	5	6

Tabela 2- Freqüência dos alelos observados para o loco UNH 104 nos seis plantéis

Plantéis/Alelos (%)	1	2	3	4	5	6	8	10	13	Total
Ceará	0,0	57,5	30,0	5,0	0,0	7,5	0,0	0,0	0,0	100
Chitralada	2,5	30,0	0,0	40,0	0,0	0,0	27,5	0,0	0,0	100
Israel	1,2	7,5	2,5	3,7	0,0	0,0	0,0	45,0	40,0	100
Nilótica	0,0	0,0	5,0	0,0	8,7	0,0	0,0	86,25	0,0	100
Taiwan	56,2	0,0	32,5	11,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100
Vermelha	35,8	0,0	0,0	34,6	0,0	0,0	29,5	0,0	0,0	97,5*

*o DNA de um indivíduo não amplificou

Tabela 3- Freqüência dos alelos observados para o loco UNH 108 nos seis plantéis

Plantéis/Alelos (%)	1	2	3	5	6	8	Total
Ceará	0,0	40,0	25,0	12,5	22,5	0,0	100
Chitralada	36,2	0,0	36,2	27,5	0,0	0,0	100
Israel	0,0	27,5	31,2	0,0	41,2	0,0	100
Nilótica	0,0	0,0	23,7	0,0	76,2	0,0	100
Taiwan	0,0	13,7	42,5	0,0	43,7	0,0	100
Vermelha	0,0	0,0	10,5	19,7	0,0	69,7	95*

*o DNA de dois indivíduos não amplificou

Tabela 4- Frequência dos alelos observados para o loco UNH 136 nos seis plantéis

Plantéis/Alelos (%)	5	6	7	8	9	11	12	Total
Ceará	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100
Chitralada	0,0	55,0	0,0	45,0	0,0	0,0	0,0	100
Israel	0,0	30,0	0,0	55,0	0,0	15,0	0,0	100
Nilótica	46,2	0,0	0,0	48,7	0,0	0,0	5,0	100
Taiwan	0,0	0,0	55,0	11,2	0,0	33,7	0,0	100
Vermelha	0,0	0,0	0,0	21,2	56,2	22,5	0,0	100

Tabela 5- Frequência dos alelos observados para o loco UNH 160 nos seis plantéis

Plantéis/Alelos (%)	2	4	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total
Ceará	0,0	0,0	11,2	0,0	0,0	13,7	28,7	17,5	0,0	28,7	0,0	100
Chitralada	0,0	0,0	37,5	0,0	0,0	1,2	30,0	0,0	1,2	0,0	30,0	100
Israel	0,0	0,0	0,0	35,0	13,7	8,7	1,2	0,0	0,0	0,0	41,2	100
Nilótica	0,0	25,0	22,5	0,0	26,2	12,5	0,0	13,7	0,0	0,0	0,0	100
Taiwan	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	31,2	0,0	21,2	13,7	17,5	16,2	100
Vermelha	1,2	0,0	0,0	27,6	0,0	25,0	6,9	7,9	14,5	17,1	0,0	95*

* o DNA de dois indivíduos não amplificou

Tabela 6- Frequência dos alelos observados para o loco UNH 169 nos seis plantéis

Plantéis/Alelos (%)	1	2	6	8	9	11	Total
Ceará	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100
Chitralada	0,0	27,5	11,2	26,2	11,2	23,7	100
Israel	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	50,0	100
Nilótica	0,0	18,7	20,0	28,7	0,0	32,5	100
Taiwan	61,25	12,5	12,5	13,7	0,0	0,0	100
Vermelha	55,0	26,2	18,7	0,0	0,0	0,0	100

Ao analisar todos os plantéis em conjunto, considerando-se os cinco locos, pode-se observar que estes são muito diferentes estatisticamente uns dos outros $P=0,00000$ (Probabilidade); $SE=0,00000$ (Erro Padrão) (Tabela 7). Fez-se também a análise para verificar se havia alguma semelhança genética entre os plantéis, dois a dois, e o resultado obtido foi o mesmo, ou seja, também foram diferentes estatisticamente ($P=0,00000$; $SE=0,00000$). Esses resultados mostram que os locos escolhidos no presente

trabalho são informativos para diferenciar os plantéis estudados.

A única exceção observada foi entre os plantéis Israel e Taiwan, para o loco UNH 108. Não houve diferença significativa entre eles ($P=0,08397$; $SE=0,00406$), mostrando assim, semelhança entre os plantéis para este loco.

A heterozigidade observada foi mais baixa que a heterozigidade esperada nos plantéis

Ceará, Chitralada, Nilótica e Vermelha (Tabela 8). O mesmo não ocorreu nos plantéis Israel e Taiwan, onde a

heterozigidade observada foi maior que a esperada.

Tabela 7- Teste estatístico que diferencia os seis plantéis de tilápias estudados para cada loco microssatélite

Locos	Valor de P (P<0,05)	S.E
UNH 104	0,00000	0,00000
UNH 108	0,00000	0,00000
UNH 136	0,00000	0,00000
UNH 160	0,00000	0,00000
UNH 169	0,00000	0,00000

Teste de Fisher, P<0,05

X² : infinito; probabilidade: altamente significativo

Programa Genepop web versão 3.1

Tabela 8 – Número de indivíduos analisados (N), resultados das médias de homozigidade observada (Ho), homozigidade esperada (He), heterozigidade observada (Hto) e heterozigidade esperada (Hte).

Plantéis	N	Ho	He*	Hto	Hte*	Fis (total)**
Ceará	40	0,6150	0,5838	0,3850	0,4162	0,1171
Chitralada	40	0,3800	0,3230	0,6200	0,6770	0,1577
Israel	40	0,1850	0,3842	0,8150	0,6158	-0,3448
Nilótica	40	0,4850	0,4584	0,5150	0,5416	0,094
Taiwan	40	0,2650	0,3068	0,7350	0,6932	-0,06144
Vermelha	35	0,4050	0,3292	0,5950	0,6708	0,2539

*Homozigotos e heterozigotos esperados segundo Levene (1949)

** Fis segundo Weir & Cockerham (1984)- valores negativos indicam perda de homozigose Programa Popgene 1.32 (Yeh et al., 1999).

Foram estimados os coeficientes de endogamia intrapopulacional (Fis) e o coeficiente de endogamia interpopulacional (Fst), cujos resultados são mostrados na tabela 9. Deve-se considerar na análise final os valores gerais apresentados, Fis=0,0486 e Fst=0,3263, que se aplicam ao conjunto dos plantéis estudados.

Também foram estimados os valores de identidade genética e distância genética entre todos os plantéis (tabela 10).

Os dados obtidos nesse estudo permitiram ainda, a confecção do dendrograma (figura 2), baseado no cálculo da distância genética de Nei (1978).

Tabela 9 – Resultados de Fis (coeficiente de endogamia intrapopulacional) e Fst (coeficiente de endogamia interpopulacional ou índice de fixação de alelos) para cada loco separado e Fis e Fst médio para o conjunto dos plantéis.

Locos	Fis	Fst
UNH 104	-0,0983	0,3843
UNH 108	0,0755	0,2850
UNH 136	0,4180	0,3901
UNH 160	-0,0137	,01714
UNH 169	-0,0650	0,3595
Todos (geral)	0,0486	0,3263*

Estatística F segundo Weir e Cockerham (1984)

Programa Genepop web versão 3.1

*Segundo Harlt & Clark (1997) valores de Fst = 0 a 0,05 → pouca diferença genética;

0,05 a 0,15 → moderada diferença genética;

0,15 a 0,25 → grande diferença genética;

> 0,25 → muito grande diferença genética

Tabela 10 – Identidade genética (Ig) e a distância genética (Dg) dos seis plantéis estudados

Plantéis	Ceará	Chitralada	Israel	Nilótica	Taiwan	Vermelha
Ceará	****	0,5353	0,3769	0,3795	0,3421	0,3023
Chitralada	0,6249	****	0,5286	0,3180	0,2463	0,3245
Israel	0,9757	0,6376	****	0,6663	0,4709	0,2553
Nilótica	0,9689	1,1458	0,4060	****	0,5255	0,2700
Taiwan	1,0725	1,4013	0,7530	0,6434	****	0,4293
Vermelha	1,1964	1,1255	1,3651	1,3094	0,8456	****

Identidade genética (valores acima da diagonal) e distância genética (valores abaixo da diagonal).

Valores segundo Nei (1978).

al., 1995) foram modificados em sua estrutura e composição gênica e têm se tornado endocruzados seja pelas práticas de larvicultura, seja pela seleção intencional. O caso de seleção intencional pode ser evidenciado no plantel Ceará, o que foi fortemente selecionado para coloração vermelha. Quando os peixes chegaram à Fazenda Água Fria eram peixes de coloração vermelha amareladas, alaranjados e cinza manchados. Hoje possuem a coloração rosa claro, quase branco (anexo 3). Já o endocruzamento originado pelas práticas de larvicultura pode ser evidenciado pelos plantéis Chitralada, Nilótica e Vermelha, uma vez que os alevinos destinados à engorda são produtos do acasalamento de pais aparentados, mantidos em um estoque existente no próprio criatório.

A tendência a uma baixa de variabilidade genética nos plantéis, mostrada pelos níveis de heterozigosidade e coeficiente de endogamia devido ao desbalanço no número de machos e fêmeas usados para reprodução, ou seja, poucos casais na obtenção de alevinos, também foi constatada por Norris et al. (1999) ao estudar o salmão do Atlântico. Isso certamente ocorre quando não há controle dos grupos de acasalamento nesses estoques que impeça o acasalamento entre parentes. Outro agravante, para esta situação, é que não há troca de reprodutores entre as larviculturas para quebrar o ciclo de consanguinidade. Isso pode causar, a médio prazo, efeitos adicionais, tais como reduzir a capacidade que um estoque possui para se adaptar a diferentes condições ambientais como também causar a depressão por endogamia, o que limitaria, substancialmente, o potencial de ganho genético em futuros trabalhos de seleção e melhoramento deste peixe. Esta depressão é resultado de um aumento da homozigose e, conseqüentemente, do pareamento de alelos recessivos. O pareamento de alelos recessivos produz uma tendência geral no sentido de diminuir a viabilidade, a sobrevivência, o crescimento e a produção

em geral, além de incrementar a taxa de anormalidades (Moreira, 1999).

Em produções de peixe na Índia, é um fenômeno comum uma variação substancial no crescimento e desempenho reprodutivos de estoques aquícolas. Geralmente, tem ocorrido contínuo declínio nas taxas de fertilização, eclosão e sobrevivência de alevinos. Uma depressão endogâmica altamente significativa para idade de desova e número de ovos em fêmeas de truta arco-íris foi constatada por Russell et al. (2000). Portanto, é importante manter a consanguinidade em nível baixo em um esquema de criação para produção.

Assim, podemos concluir que a escolha dos reprodutores a serem usados na formação do estoque é um ponto muito importante, pois isto determinará o pool gênico total disponível para a larvicultura, bem como o seu futuro potencial biológico. É desejável que a população que fornecerá os reprodutores para a nova larvicultura ofereça variabilidade genética suficiente. Isto é importante, pois a existência da variabilidade genética para a manipulação é a condição essencial para o melhoramento genético de qualquer organismo. Além disso, o reconhecimento da variabilidade existente entre e dentro de populações influenciará a estratégia a ser empregada nos programas de seleção e desenvolvimento de linhagens (Chalmers et al., 1992 citado por Moreira, 1999).

No entanto, se nos plantéis amostrados vem sendo usados poucos reprodutores, isso pode levá-las, a longo prazo, a se tornarem verdadeiramente linhagens. Este fato pode ser observado no plantel Ceará, onde os locos UNH 136 e UNH 169 apresentaram alelos monomórficos, mostrando que estes estão fixados neste plantel, ou que houve perda de alelos, o que explicaria a redução na taxa de polimorfismo destes locos para este plantel. Segundo Devignes et al. (2001) quando uma população passa por um

“bottleneck”, muitos alelos com baixas frequências são eliminados.

Os plantéis denominados Taiwan e Israel apresentaram uma boa diversidade genética porque sofreram introdução de exemplares de outros plantéis. No caso do plantel Taiwan houve um escape de peixes do plantel Ceará na fazenda onde são criados e estes foram misturados aos de Taiwan. Já no plantel Israel foram introduzidos exemplares híbridos denominados Israel-Goiânia.

Outros parâmetros bastante informativos foram o grau de identidade genética entre os plantéis e a distância genética entre os plantéis. Na tabela 10 pode-se observar os valores em destaque acima da diagonal, os quais indicam que os plantéis Israel e Nilótica são os mais semelhantes geneticamente ($I_g=0,6663$), enquanto que os plantéis Chitralada e Taiwan são os que menos apresentam genes em comum ($I_g=0,2463$).

Se a caracterização genética é importante para o manejo e a exploração comercial de peixes criados, então o primeiro objetivo de qualquer piscicultura que venha a ser estabelecida deveria ser a caracterização genética do seu estoque e da relação genética do mesmo com outras larviculturas. Sua importância reside no fato de que a seleção de um plantel representativo pode ser difícil, quando o estoque já tiver declinado até o nível em que a seleção de novos reprodutores não trará vantagens ao estoque, podendo até, posteriormente, prejudicar seriamente o plantel.

Os dados obtidos desta análise indicam que a técnica de microssatélite poderia indicar aos criadores se ocorre a redução da diversidade genética devido ao emprego de um pequeno número de pais, através da comparação dos níveis de variabilidade entre a origem e o material derivado. Dessa forma, sabe-se quando novo material deve ser introduzido (Moreira, 1999). Também

auxilia na identificação dos estoques mais divergentes geneticamente, de forma a maximizar a recuperação da variabilidade genética via cruzamento, bem como para monitorar os níveis de endocruzamentos nos plantéis. Entretanto, nos casos onde a utilização de marcadores moleculares não for possível, a manutenção de registros e a utilização de algumas práticas de criação (entre elas; rodízio de reprodutores, igual proporção de sexos, renovação de reprodutores em períodos regulares, etc.) permitiriam a conservação dos níveis de variabilidade genética existente.

Neste estudo o dendograma obtido (figura 2) é bastante útil, permitindo uma melhor visualização da posição de cada plantel quanto às distâncias genéticas existentes entre eles. Fica fácil a identificação do plantel denominada Vermelha como sendo o mais distante dos demais. Segundo Lovshin (2000), há relatos de três cruzamentos conhecidos que deram origem a híbridos de tilápia vermelha: 1º entre uma fêmea mutante laranja-avermelhado de *Oreochromis mossambicus* e um macho normal (cinza) de *Oreochromis niloticus*, 2º entre uma fêmea normal (cinza) de *Oreochromis hornorum* e um macho de *Oreochromis mossambicus* dourado-avermelhado e 3º entre *Oreochromis niloticus* vermelha com um tipo selvagem de *Oreochromis aureus*. Outros híbridos de tilápia vermelha provavelmente foram desenvolvidos, mas informações de suas origens são desconhecidas. Os resultados levam a crer que tal diversidade genética ainda está sendo mantida neste plantel. Como não foi possível obter dos criadores as informações referentes à origem de seus estoques, fica difícil ampliar os comentários sobre os mesmos.

Podemos visualizar também que os plantéis denominados Israel e Nilótica. Estes foram os mais próximos (figura 2). De acordo com Watanabe et al. (2002), o plantel denominado Israel originou-se do

cruzamento entre *O. niloticus* rosado e *O. aureus* normal (cinza). Segundo Lahav & Haanan (1997), a origem do plantel Israel seria do cruzamento entre *O. niloticus*, *O. aureus* e *O. Mossambicus*. Se o plantel denominado Nilótica está mais próximo do Israel (figura 2), então pode ser que o plantel Nilótica não seja mais um estoque puro, como se preconiza. Genes de outra espécie podem ter sido introduzidos há várias gerações, estando hoje fixados no plantel existente.

Visualizando o dendrograma, também se pode verificar que os plantéis Ceará e Chitralada estão mais próximos entre si, se comparadas com os demais plantéis. Segundo Lahav & Haanan (1997), a respeito da formação dos plantéis analisados, tem-se que o plantel denominado Ceará originou-se do cruzamento entre *O. niloticus* e *O. hornorum* x *O. Mossambicus* e a origem da Chitralada seria de *O. niloticus* (Aplleyard, et al., 2003; Lahav & Haanan, 1997). Logo, pode-se supor que o plantel denominado Chitralada também não seja puro apresentando genes de *O. hornorum* e/ou *O. Mossambicus*. Outro fato a ser considerado levando em conta a história de formação dos plantéis Nilótica e Chitralada é que, segundos consta, ambos seriam *O. niloticus*. No entanto, a distância entre os dois mostrada no dendrograma (figura 2) pode ser um indicativo de que os dois plantéis se distanciaram devido à endogamia intrapopulacional, que pode tê-los diferenciado geneticamente.

O plantel Taiwan teria se originado do cruzamentos de Nilótica com Ceará (*O. niloticus*, *O. hornorum* x *O. Mossambicus*) (Lahav & Haanan, 1997). Ao analisarmos esse dado com o resultado obtido pelo dendrograma, percebemos que há mais uma contradição, pois o plantel Taiwan deveria estar mais próximo do plantel Ceará quando levamos em consideração a sua origem. Novamente o

manejo dos criatórios pode ter levado a tal distinção entre plantéis.

Durante a realização do presente estudo foi feita a tentativa de conseguir amostras de várias linhagens puras de tilápias (*O. nilóticos*, *O. hornorum* e *O. Mossambicus* e *O. Aureus*) que são mantidas na Universidade de Stirling, Escócia, para tentar melhor esclarecer a origem dos plantéis estudados. Fez-se contato com o pesquisador Brendan McAndrew, que se dispôs a enviar essas amostras, no entanto, até o momento tal material não chegou, inviabilizando uma melhor comparação. De acordo com Kocher (2003)¹, linhagens puras de tilápia não são mais encontradas, sendo os últimos estoques mantidos na referida universidade. Também essa informação reforça os resultados ora obtidos.

Considerando os resultados obtidos, pode-se supor que alguns criadores devem estar adquirindo lotes de peixes considerados de uma determinada “linhagem”, sendo que na verdade, devem estar comprando tilápias de “linhagens” diferentes das pretendidas. Difícil é determinar a partir de quando ou onde tais alterações começaram a ocorrer.

Em função do alto custo da importação de matrizes no mercado internacional, da ordem de US\$ 25,00 a unidade, é importante a condução de trabalhos que visem a avaliação das linhagens disponíveis no Brasil. Faz-se necessário conhecer as linhagens produzidas nos principais sistemas de produção adotados no país, para assim, poder avaliar a sua variabilidade genética, e assim, verificar se é possível iniciar algum programa de melhoramento nos plantéis. (Peixoto, 2003).

¹ * Thomas D. Kocher
Departamento de Zoologia, Universidade de
New Hampshire, Durham, (08/ 2003)
Comunicação pessoal.

Com os resultados dessa análise foi possível obter um perfil dos plantéis comerciais de tilápia, caracterizando-os geneticamente. Tal identificação é de grande importância na piscicultura, uma vez que a base genética dos plantéis é que vai determinar o sucesso do produto final, nesse caso o peixe. Também se pode considerar a necessidade de mais assistência aos criadores, de modo a orientá-los quanto ao manejo adequado dos reprodutores, de acordo com seus objetivos, de modo a obterem o retorno financeiro desejado.

O presente estudo serve de ponto de partida para a condução de trabalhos orientados de melhoramento genético de estoques e espera-se que tal metodologia de análise genética possa ser introduzida nos criatórios nacionais.

6 - CONCLUSÕES

Existe uma grande diferença genética entre os seis plantéis estudados;

Foi diagnosticada redução da variabilidade genética dos plantéis Ceará, Chitralada, Nilótica e Vermelha, provavelmente devido ao uso de poucos reprodutores para obtenção de alevinos;

Os plantéis Nilótica e Chitralada podem não ser puros, contradizendo as afirmativas de diversos criadores;

A distância genética observada entre os plantéis Nilótica e Chitralada pode ser consequência da endogamia intrapopulacional;

Sem um melhor controle dos plantéis comerciais de tilápia não é possível conduzir programas efetivos de melhoramento genético das espécies.

7 - BIBLIOGRAFIA

AGNESE, J.F.; ADEPO-GOURENE, B.; ABBAN, E.K.; FERMON, Y. Genetic differentiation among natural population of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, cichlidae). *Heredity*, v. 79, p. 88-96, 1997.

AGNESE, J.F., ADEPO-GOURENE, B., OWINO, J., et al. Genetic characterization of a pure relict population of *Oreochromis esculentus*, an endangered tilapia. *Journal of Fish Biology*, v.54, p.1119-1123, 1999.

AGRESTI, J.J.; SEKI, S.; CNAANI, A., et al. Breeding new strain of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on RFLP and microsatellite loci. *Aquaculture*, v. 185, p. 43-56, 2000.

ALMEIDA, F.S. **Análise de variabilidade genética em Pimelodidae e Rhamdiidae (Pisces, Siluriformes) da Bacia do Rio Tibagi**. 1998, 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Londrina, Londrina

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. MOYSES, C.B. DANIEL-SILVA, M.F.Z. LOPES, C.E. Marcadores moleculares em espécies de *Eigenmannia* e a descrição de um novo citótipo para o Rio São Francisco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 47, 2001, Águas de Lindóia. *Anais...* . Águas de Lindóia, 2001.

APPLEYARD, S.A.; RENWICK, J.M.; MATHER, P.B. Individual heterozygosity levels and relative growth performance in *Oreochromis niloticus* (L) cultured under Fijian conditions. *Aquaculture Research*, v. 32, p.287-296, 2003.

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, P. O. F. Applications of the RAPD techniques in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, v.37, p.117-123, 1994.

- BÁRTFAI R.; EGEDI, S.; YUE, G.H.; et al. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. **Aquaculture**, v.219, p. 157-167, 2003.
- BERNATCHEZ, L.; DEMPSON, J.D.; MARTIN, S. Microsatellite gene diversity analysis in anadromous arctic char, *Salvelinus alpinus*, from Labrador, Canada. **Canadian Journal Fish and Aquatic Science**, v. 55, p. 1264-1272, 1998.
- BLOTT, S. C; WILLIAMS, J. L.; HALEY, C. S. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. **Heredity**, v.82, p.613-619, 1999.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVID, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of human genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- CARLETON, K.L.; STREELMAN, J.T.; LEE, B.Y., et al. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. **Animal Genetic**, v. 33, n. 2, p.140-144, 2002.
- CIAMPOLINI, R.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; VAIMAN, D.; et al. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphism to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. **Journal of Animal Science**, v. 73. p. 3259-3268, 1995.
- CURY, R. A; LOPES, C.R. Teste de paternidade em bovinos da raça Gir. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 21, p. 40-45, 2001.
- DESVIGNES, J.F.; LAROCHE, J.; DURAND, J.D.; et al. Genetic variability in reared stocks of common carp based on allozymes and microsatellites. **Aquaculture**, v. 194, p. 291-231, 2001.
- EKNATH, A.E.; DOYLE, R. Effective population size and rate of inbreeding in aquaculture of Indian major carps. **Aquaculture**, v. 85, p. 293-305, 1993.
- FAO Inland water resources and aquaculture service, fishery resources division. **Review of the state of world aquaculture**. FAO fisheries circular, n. 886, ver. 1. Rome: FAO, 1995.
- FERGUSON, A. Genetics differences among brown trout, *Salmo trutta*, stocks and their importance for the conservation and management of the species. **Freshwater Biology**, v.21, p.35-46, 1989.
- FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODHOL, A. et al. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. **Journal of Fish Biology**, v.47 (supply A), p.103-126, 1995.
- FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21 century. In: FITZSIMMONS, K, & CARVALHO FILHO, J. (Eds.) **Proceedings from the fifth international symposium on tilapia aquaculture**. Rio de Janeiro: Panorama da aquacultura Magazine, p. 3-8, 2000.
- FUERST, P.A, MWANJA, W.W., KAUFMAN, L. The genetic history of the introduced Nile Tilapia of Lake Victoria (Uganda - E. Africa): The population structure of *Oreochromis niloticus* (Pisces:Cichlidae) revealed by DNA Microsatellite markers. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, V, 2000, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro. 2000, p.30-40.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. Sunderland Massachussets: Sinauer Associates, 3ª ed, 1997, 682p.

HILSDORF, A.W.S. **Avaliação genética e zootécnica de duas variedades de tilápias nilóticas (*O. niloticus* var. Red sterling e *O. niloticus*, var. Chitralada) para o estabelecimento de um programa de produção massal de um híbrido de peixes e seus subprodutos**. <<http://Watson.fapesp.Br/PIPEM/pipe10/eng/pesc1.htm>> (03/04/2002).

HUGHES, C. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: A revolution results. **Ecology**, v.79, n.2, p.383-399, 1999.

KOCHER, T.D.; LEE, W.J.; SOBELEWSKA, H.; PENMAM, D.; McANDREW, B.J. A genetic linkage map of cichlid fish, the tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics**, v. 148, p. 1225-1232, 1998.

KUBITZA, F.. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitz, 2000, 285p.

LAHAV, E.; RAANAN, Z. Salinity tolerance of genetically produced tilapia hybrids. **Israel journal of Aquaculture**, v. 49, n. 3, p. 160-165, 1997.

LEE, W.J.; KOCHER, T.D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, v. 49, p. 169-171, 1996.

LIMA, R.M.G. **Polimorfismos de microssatélites em DNA de eqüinos e seu uso na determinação de parentesco em animais da raça mangalarga machador**. 1998, 91p. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LIMA, F.M; COSTA, F.H.F; SAMPAIO, A.H; et al.. Genetic variability using molecular markers (RAPD) in species and hybrids of tilapias (Pisces, Cichlidae). **International Simposyom on Tilapia Aquaculture 5**. Rio de Janeiro, Brazil, p. 32-39, 2000.

LOVSHIN, L.L.; CYRINO, J.E.P. Status of commercial fresh water fish cultura in Brazil. **World Aquaculture**, p.23-39, 1997.

LOVSHIN, L.L. Red tilápia or Nile tilápia: Which is the Best Culture Fish? In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2, Piracicaba/SP, 1998. **Anais...** Piracicaba: 1998, p. 179-198. LOVSHIN, L.L. Criteria for selecting Nile tilapia and red tilapia for culture. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, V, 2000, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro. 2000 p.49-57.

MACARANAS, J.M.; TANIGUCHI, N.; PANTE, J.R et al. Electrophoretic evidence for extensive hybrid gene introgression into commercial *Oreochromis niloticus* stocks in the Philippines. **Aquaculture Fisheries Management**, v. 17, p. 249-258, 1986.

MARTINS, C; PORTO-FORESTI, F.; WASKO, A P; et al. Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, n.28, p.12-15, 2002.

MATIOLI, S.R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S.R (ed). **Biologia molecular e evolução**, Ribeirão Preto: Holos editora, 2001, 202p.

McANDREW, B.J & MAJUMDAR, K.C. Tilápia stock identification using electrophoretic markers. **Aquaculture**, v. 30, p. 249-261, 1986.

- Mc CONNELL, S. K. J. BEYNON, C., LEAMON, J. et al. Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. **Animal Genetics**, v. 31, p. 214-218, 2000.
- MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 5, p. 14-17, 1998.
- MOREIRA, H.L.M. **Análise da estrutura de plantéis e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélites**. 1999, 112 p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1978.
- NIELSEN, E.E.; HANSEN, M.M.; LOESCHCKE, V. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon (*Salmo salar*) a comparison of genetic composition over 60 years. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 487-492, 1997.
- NORRIS, A.T.; BRADLEY, D.G.; CUNNINGHAM, E.P. Microsatellite genetic variation between cultured and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) population. **Aquaculture**, v. 180, p. 247-264, 1999.
- O'CONNEL, M.; SKIBINSKI, D.O.F.; BEARDMORE, J.A. Absence of restriction site variation in the mitochondrial ND5 and genes of Atlantic salmon amplified by the polymerase chain reaction. **Journal of Fish Biology**, v. 47, p. 910-913, 1995.
- OTSEN, M.; BIEMAN, M.D.; WINER, E.R.; et al. Use of simple sequence length polymorphisms for genetic characterization of rat inbred strains. **Mammalian Genome**, v. 6, p. 595-601, 1995.
- PEIXOTO, M.T.D. **Avaliação zootécnica de cinco linhagens de tilápias (*Oreochromis spp.*) em sistema de recirculação**. 2003, 26 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- POUYAUD, L.; AGNÉSE, J.F. Phylogenetic relationship between 21 species of three tilapiine genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. **Journal of Fish Biology**, v. 47, p. 26-38, 1995.
- REILLY, A.; ELLIOT, N.G.; GREWE, P.M.; et al. Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their ancestral Canadian population comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation. **Aquaculture**, v. 173, p. 459-469, 1999.
- ROGNON, X.; ANDRIAMANGA, M.; MCANDREW, B., et al. Allozyme variation in natural and cultured populations in two tilapia species: *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. **Heredity**, v. 76, p. 640-650, 1996.
- RUSSELL, V.J.; HOLD, G.L.; PRYDE, S.R. et al. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. **Journal of Agriculture of Food Chemical**, v. 48, n. 6, p. 2184-2188, 2000.
- SÁNCHEZ, J.A.; CLABBY, C.; RAMOS, D., et al. Protein and microsatellite single locus variability in *Salmon salar*. **Heredity**, v. 77, p. 423-432, 1996.
- SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequences DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 211-215, 1992.

- SEYOUM, S.; KORNFIELD, I. Identification of the subspecies of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) using restriction endonucleases analysis of mitochondrial DNA. **Aquaculture**, v. 102, p. 29-42, 1992.
- SILVA, A. L. N.; CHAMMAS, M. A. Current status of tilapia culture in Brazil. **World Aquaculture Society**, p. 350-351, 1997.
- STUDART, M. T. **Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP**. 2001, 73 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology e Evolution**, v.15, p.199-203, 2000.
- TACON, A.G.J. **Contribution to food fish supplies. Food fish supplies**, disponível em <www.fao.org> acesso em 13 set 2002.
- TESSIER, N.; BERNATCHEZ, L.; PRESA, P.; ANGERS, B. Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon. **Journal of Fish Biology**, v. 47, supplement A, p. 156-163, 1995.
- TOLEDO, L.R. Tilápia, vocação para ficar em primeiro plano. **Revista Globo Rural**, n. 195, p. 38-44, 2002.
- WATANABE, O.W.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, issue 3-4, p. 465-498, 2002.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p.1358-1370, 1984.
- YER, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. Popgene Version 1.31. Microsoft Window based freeware for population genetic analysis. Quick user guide. Canada. University of Alberta. Centre for International Forestry Research, 1999.

Anexo 1- Tabela referente aos valores da distância genética mostrados pelo dendrograma.

Entre	e	Distância
5	4	6.73927
4	2	20.43854
2	Ceará	31.24285
2	Chitralada	31.24285
4	3	16.77121
3	1	14.60865
1	Israel	20.30153
1	Nilótica	20.30153
3	Taiwan	34.91018
5	Vermelha	58.42066

Anexo 3-

Ceará



Taiwa

Chitralada



Nilótica

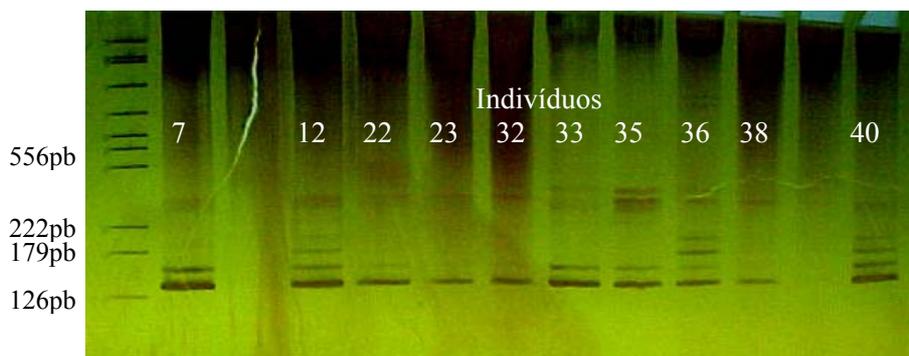


Israel

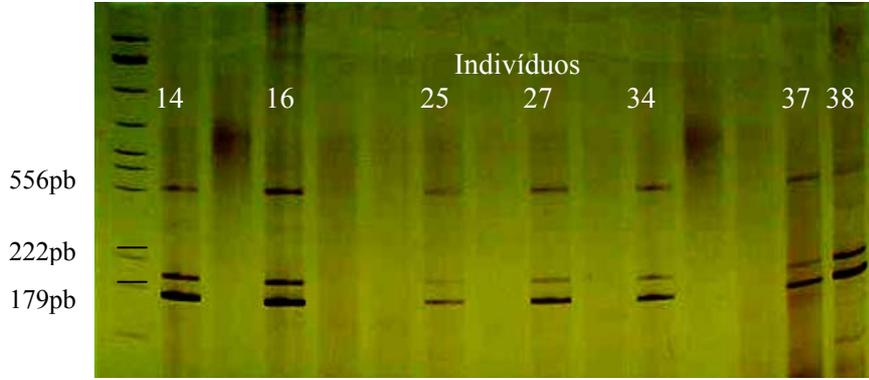


Vermelha

Anexo 2-



Primer UNH 104 – Plantel Ceará



Primer UNH 136 – Plantel Taiwan