

Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD

Jayme Aparecido Povh^{1*}, Hédén Luiz Marque Moreira², Ricardo Pereira Ribeiro¹, Alberto José Prioli³, Lauro Vargas¹, Danielly Veloso Blanck¹, Eliane Gasparino¹ e Danilo Pedro Streit Jr¹

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. ³Departamento de Biologia Celular e Genética, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: jpovh@hotmail.com

RESUMO. A variabilidade genética é essencial para que se possa obter melhoramento genético e, portanto, é de grande importância a sua estimação. Desta forma, o objetivo do presente experimento foi estimar, pela técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), a divergência e a variabilidade genética nas linhagens de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Bouaké e Chitralada em duas gerações de reprodutores do rio Nilo. Foram utilizados 20 animais de cada linhagem. A matriz de coeficientes de similaridade de Jaccard entre indivíduos foi utilizada para a construção de um dendrograma e para a determinação, com o teste de Mantel, da divergência genética entre linhagens. A variabilidade genética foi estimada pelo índice de Shannon e pela porcentagem de *loci* polimórficos. As linhagens Bouaké e Chitralada formaram grupos distintos. A primeira apresentou menor divergência e variabilidade genética em relação à segunda. A variabilidade genética foi semelhante entre as duas gerações de reprodutores em ambas as linhagens.

Palavras-chave: divergência genética, melhoramento genético, *Oreochromis niloticus*, RAPD, polimorfismo, variabilidade genética.

ABSTRACT. Genetic variability estimation of Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus*) using the RAPD technique. Genetic variability estimation is highly important in order to achieve genetic improvement. The present experiment aims at estimating the genetic divergence and variability of the Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus*), Bouaké and Chitralada, in two breeders offsprings, using the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Twenty animals from each strain were used. The Jaccard similarity coefficients matrix was used for both designing a dendrogram and determining the genetic divergence of the strains, using Mantel's test. The genetic variability was estimated by Shannon's index and the percentage of polymorphic *loci*. Bouaké and Chitralada's strains formed different groups. The former strain showed lower genetic divergence and variability in relation to the latter one. The two breeders offsprings had similar genetic variability in both strains.

Key words: genetic divergence, animal breeding, *Oreochromis niloticus*, RAPD, polymorphism, genetic variability.

Introdução

A aqüicultura mundial teve um crescimento médio de 288,1% entre os anos de 1990 e 2001. Neste mesmo período, o Brasil apresentou crescimento de 1.024,4%, e a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) representou a segunda espécie de peixe mais cultivada, perdendo somente para as carpas (Borghetti *et al.*, 2003).

O Brasil tem potencial para se tornar uma das

maiores potências aqüícolas do mundo, principalmente por possuir muita água e terra com baixo custo. Além disso, é um país de clima tropical, o que permite que a tilápia tenha crescimento durante o ano todo em grande parte do território, além de ser um grande produtor e exportador de soja e outros grãos que formam a base da alimentação dos peixes (Lovshin, 2000).

As tilápias pertencem à família Cichlidae, são de origem do leste e oeste da África e, hoje, são

encontradas em vários países do mundo (Seyoum e Kornfield, 1992; Dey e Gupta, 2000). São peixes de água doce amplamente cultivados pelo mundo inteiro (Appleyard *et al.*, 2001). As tilápias de maior importância estão divididas em três principais gêneros: *Tilapia*, *Oreochromis* e *Sarotherdon* (Popma e Lovshin, 1995; Kubtiza, 2000).

A tilápia *Oreochromis niloticus* destaca-se entre as demais por apresentar várias qualidades zootécnicas (Fitzsimmons, 2000). No Brasil, existem duas linhagens de grande importância desta espécie: Bouaké e Chitralada. A primeira é originária da Costa do Marfim; a segunda teve origem no Egito, foi para o Japão e daí exportada para Tailândia, lugar onde foi domesticada (Moreira, 1999; Kubtiza, 2000). A Bouaké foi introduzida no Brasil em 1971 (Castagnoli, 1992), e a Chitralada em 1996 (Zimmermann, 1999). Wagner (2002) não observou diferenças morfológicas mensuráveis entre as linhagens de tilápia do Nilo Bouaké e Chitralada.

Os marcadores moleculares surgiram como uma nova ferramenta no processo de melhoramento genético (Moreira, 2001). A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) utiliza *primers* únicos de sequência simples e arbitrária para amplificar fragmentos de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Williams *et al.*, 1990), possibilitando detectar o polimorfismo do DNA, amplificado ao acaso em múltiplas regiões do genoma (Dinesh *et al.*, 1993). Esta técnica é a de menor custo, menor número de etapas, menor tempo para obter os resultados e maior facilidade de implementar, o que a torna um dos marcadores mais utilizado e difundido (Milach, 1998; Naish *et al.*, 1995a).

A técnica RAPD pode ser usada para: distinguir espécies de peixes (Partis e Wells, 1996; Almeida e Sodré, 2002) como, por exemplo as tilápias (Bardacki e Skibinski, 1994, 1999; Dinesh *et al.*, 1996); para diferenciar linhagens de tilápia (Naish *et al.*, 1995a; Bardacki e Skibinski, 1999); detectar híbridos entre espécies (Elo *et al.*, 1997); análise filogenética de ciclídeos (Sültmann *et al.*, 1995); estimar a divergência e variabilidade genética (Rieseberg, 1996; Moreira, 2001; Almeida e Sodré, 2002; Benites, 2003; Astolph, 2003; Barman *et al.*, 2003).

O nível de caracterização e o padrão de diversidade genética nas populações de tilápia representam importantes recursos para o melhoramento do cultivo desta espécie (Mather, 2001). Segundo Moreira *et al.* (2003), a técnica RAPD é adequada para o monitoramento genético em peixes, o que é necessário para melhorar a produtividade em programas de seleção (Appleyard e

Mather, 2000). Pode ser, portanto, uma boa ferramenta para o melhoramento genético na tilapicultura.

O objetivo deste trabalho foi estimar a divergência e a variabilidade genética nas linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Bouaké e Chitralada, em duas gerações de reprodutores pela técnica de RAPD.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados 40 reprodutores de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), 20 da linhagem Bouaké e 20 da Chitralada. Para cada uma das linhagens, foram analisados 10 indivíduos (cinco machos e cinco fêmeas) de uma geração (1997) e 10 (cinco machos e cinco fêmeas) de outra geração (2002). Não foi realizado processo de seleção, mas houve um controle da seleção não intencional de uma geração de reprodutores (1997) para outra (2002) em ambas linhagens.

A linhagem Bouaké foi obtida na Estação Experimental de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM-Codapar), localizada no distrito de Floriano, no município de Maringá, e a linhagem Chitralada foi obtida na Piscicultura Aquabel, situada no município de Rolândia, ambas no Estado do Paraná.

Extração de DNA

Para a extração de DNA, foi utilizada a metodologia descrita por Bardacki e Skibinski (1994), com algumas modificações. Os fragmentos de nadadeira caudal de aproximadamente 0,5 cm², preservados a -20°C com etanol 70%, foram colocados em microtubos com 550 µL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl e 1% de SDS) e 200 µg/mL de proteinase K e, em seguida, incubados em banho-maria a 50°C “overnight”. Posteriormente, o DNA foi purificado com duas extrações com fenol-Tris pH 8,0 e três de clorofórmio. O DNA obtido foi precipitado com duas vezes e meia de etanol absoluto e um décimo de acetato de sódio em relação ao volume recuperado, e permaneceu incubado por duas horas a -20°C. Em seguida, o DNA foi retirado com uma pipeta de Pasteur adaptada, lavado com 2 mL de etanol 70%, ressuspenso em 100 µL de tampão TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA) e tratado com 30 µg/mL de RNase. O DNA permaneceu por uma hora em banho-maria a 37°C, sendo, em seguida, conservado a -20°C.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Shimadzu, no comprimento de onda de 260 nm, e diluído em TE para uma concentração de 20 ng/μL. Sua pureza foi verificada pela razão das absorbâncias 260 nm (DNA) e 280 nm (proteína). A integridade do DNA extraído foi checada em gel de agarose 0,7%, revelado com 0,5 μg/mL de brometo de etídio, sendo a eletroforese conduzida em 100 volts por 45 minutos em cuba horizontal usando tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA). A imagem foi capturada por um sistema da EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

Amplificação

As condições de amplificação foram baseadas em Williams *et al.* (1990), com algumas modificações. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 25 μL, no qual se utilizou tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 1,5 mM de MgCl₂, 100 ng de *primer* (oligonucleotídeos), 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 20 ng de DNA molde. As reações de RAPD foram amplificadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient”, programado para 40 ciclos, com um passo inicial de desnaturação a 94°C por quatro minutos e um passo final de extensão a 72°C por cinco minutos. Cada ciclo se consistiu de um minuto a 94°C, um minuto a 40°C e dois minutos a 72°C.

Foram avaliados 20 *primers* do Kit Operon (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), sendo selecionados aqueles que apresentaram bom padrão de amplificação.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida - 29:1) não desnaturante com concentração de 10%. Foram utilizados 9 μL do produto amplificado e 2 μL de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) em eletroforese vertical. Esta foi conduzida em 100 volts, por 20 horas, em uma cuba vertical usando tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA).

Utilizou-se coloração com nitrato de prata pelo método proposto por Bassam *et al.* (1991) adaptado, em que o gel foi submetido a três soluções: 1) solução de fixação (10% de etanol e 0,5% de ácido acético) por 20 minutos; 2) solução de impregnação (6 mM de nitrato de prata) por 10 minutos; 3) solução de revelação (0,75 M de NaOH e 0,22% de formol-40%) até o aparecimento das bandas. Posteriormente, os géis foram fotografados com luz branca usando o sistema EDAS (Kodak 1D Image

Analysis 3.5).

Análise dos dados

O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão Phi-X174/*Hae* III (11 bandas com tamanho entre 72 a 1353 pb).

A presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo *locus*) foi usada para a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando “1”, como a presença da banda no gel e “0”, como sua ausência. A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, com a matriz de similaridade, foi construído um dendrograma com o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*). Utilizou-se para essas análises o programa NTSYS 1.7 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 1989).

A diferenciação genética entre as linhagens e entre indivíduos dentro de linhagens foi analisada com o teste de Mantel. Para cada par de linhagens, foi construída uma matriz de dissimilaridade com os complementos dos coeficientes de Jaccard entre indivíduos e uma matriz modelo identificando a linhagem de cada indivíduo. As correlações entre as duas matrizes foram estimadas pelo teste de Mantel com 1000 permutações, utilizando o programa Mantel-Struct (Miller, 1999).

A diversidade genética, dentro e entre as linhagens, foi determinada pelo índice de Shannon e pela porcentagem de *loci* polimórficos, calculados pelo programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

Resultados e discussão

Qualidade do DNA

A razão das absorbâncias a 260 nm e 280 nm variou de 1,8 a 2,2 para todas as amostras, conforme o recomendado por Ferreira e Grattapaglia (1998) e Barbosa (1998), indicando que não houve excesso de proteína que pudesse prejudicar a amplificação. Pela análise em gel de agarose, observou-se que não ocorreu degradação do DNA em nenhuma das amostras.

Loci polimórficos

Na Tabela 1, pode-se observar a sequência dos nove *primers* selecionados, o número de *loci*, o número de *loci* polimórficos e o tamanho dos fragmentos amplificados.

Os fragmentos amplificados variaram de 240 pb a 1400 pb, encontrando-se dentro dos limites de 200 pb a 1500 pb, nos quais a técnica RAPD, segundo

Liu et al. (1999), apresenta boa reprodutibilidade.

Tabela 1. Sequências nucleotídicas dos *primers*, número de *loci*, número de *loci* polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados nas linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Bouaké e Chitralada das gerações de reprodutores de 1997 e de 2002.

Primers	Sequência de nucleotídeos (3' → 5')	Nº de <i>loci</i>	Nº de <i>loci</i> polimórficos	Tamanho dos fragmentos (pb)
A-01 (C05)	CAG GCC CTT C	16	6	245-1078
A-04 (C08)	AAT CGG GCT G	14	9	240-285
A-09 (D01)	GGG TAA CGC C	8	4	250-500
A-10 (D02)	GTG ATC GCA G	8	3	260-605
A-11 (D03)	CAA TCG CCG T	11	7	255-1150
A-12 (D04)	TCG GCG ATA G	7	4	270-870
A-13 (D05)	CAG CAC CCA C	10	3	265-750
A-14 (D06)	TCT GTG CTG G	11	7	280-620
A-15 (D07)	TTC CGA ACC C	5	2	600-1400
Total	–	90	45	240-1400

Foi observado um alto grau de polimorfismo: dos 90 *loci* observados, 45 foram polimórficos (50,0%). O número de *loci* foi semelhante ao encontrado por Prioli et al. (2002), para o gênero *Astyanax* (10 *primers*: 87 *loci* com 90,0% polimórfico), e por Oliveira et al. (2002), para o gênero *Steindachnerina* (9 *primers*: 98 *loci* com 77,6% polimórfico). Valores superiores foram encontrados por Almeida e Sodré (2002), para a família Pimelodidae (7 *primers*: 132 *loci*), e por Sekine et al. (2002) em *Pseudoplatystoma corruscans* (36 *primers*: 152 *loci* com 27,0% polimórfico). O número de *loci* encontrado no presente trabalho, que segundo Telles et al. (2001) é mais importante que o de *primers*, está de acordo com o número obtido por vários autores para estimação da diversidade genética pela técnica de RAPD.

A linhagem Bouaké apresentou porcentagem de *loci* polimórficos de 18,9% para a geração de reprodutores de 1997 e de 12,2% para a geração de 2002. Valores superiores foram encontrados na linhagem Chitralada nas gerações de reprodutores de 1997 e de 2002, com 33,3% e 36,7%, respectivamente. Estes valores evidenciam uma diversidade genética semelhante entre as duas gerações de reprodutores em ambas as linhagens, indicando que não ocorreu perda significativa de alelos dos reprodutores na ausência de seleção intencional e controle da seleção não intencional. Também pode-se observar uma menor variabilidade genética na linhagem Bouaké, em relação a Chitralada, que pode ser explicada pelo efeito fundador (variabilidade com que as duas populações foram constituídas), pelos sistemas de acasalamento e também pelo tempo de introdução das duas linhagens (Bouaké foi introduzida em 1971 e Chitralada em 1996).

Valores de variabilidade genética em peixes,

obtidos pela porcentagem de *loci* polimórficos, foram determinados por Chiari e Sodré (2001) em oito espécies da família Anostomidae (29,3% a 58,7%), por Oliveira et al. (2002) no gênero *Steindachnerina* (27,6% sem mácula e 31,6% para os com mácula e intermediário) e por Yoon e Kim (2001) em Catfish (*Silurus asotus*) (45,7% para população de Kunsan e 40,8% para Yesan 40,8%).

O *primer* A-09 apresentou um *locus* com 250 pb presente somente na linhagem Bouaké, em todos indivíduos das duas gerações de reprodutores (1997 e 2002). Os *primers* A-12 e A-13 apresentaram os *loci* de 620pb e 610pb, respectivamente, presentes somente na linhagem Chitralada, em todos indivíduos das duas gerações de reprodutores. Estas bandas exclusivas podem ser utilizadas para a identificação destas linhagens com desenvolvimento de *primers* específicos (SCAR - *Sequence Characterised Amplified Region*), tornando-se marcadores para estas linhagens. Bardakci e Skibinski (1999) realizaram este procedimento para algumas linhagens de tilápia do Nilo (Manzala, Baobab, Reds, BFAR, Turkana e Baringo).

Segundo Mather (2001), a caracterização genética em populações de tilápia representa um importante recurso para o melhoramento do cultivo desta espécie. A identificação das linhagens pode orientar os cruzamentos, que podem ser usados para explorar o efeito da heterose e o aumento da variabilidade genética. No projeto GIFT (*“Genetic Improvement of Farmed Tilapia”*), que mostrou que é possível o melhoramento genético para características de importância econômica em tilápia do Nilo (Eknath et al., 1993; Dey e Gupta, 2000; Rye e Refstie, 2000; Gupta et al., 2001), os cruzamentos entre as linhagens, em geral, apresentaram baixa heterose. Esta prática pode ser empregada, entretanto, visando o aumento da variabilidade genética. Segundo Bentsen et al. (1998), foi observado, no projeto GIFT, um ganho de 85% no desempenho durante cinco gerações de seleção em relação à população base.

Divergência genética e índice de Shannon

Os valores de divergência genética nas linhagens de tilápia do Nilo, Bouaké e Chitralada, entre as gerações de reprodutores dos anos de 1997 e de 2002, podem ser observados na Tabela 2.

Não houve diferença de divergência genética na linhagem Bouaké entre as gerações de reprodutores de 1997 (0,089) e de 2002 (0,059), e o mesmo ocorreu com a linhagem Chitralada entre as gerações de 1997 (0,151) e de 2002 (0,157) (Tabela 3). Portanto, permaneceram uniformes os valores de

divergência genética nas linhagens Bouaké e Chitralada de uma geração de reprodutores (1997) para outra (2002), o que indica que, praticamente, não houve alteração genética entre as gerações. Desta forma, a ausência de seleção intencional e o controle da seleção não intencional foram eficientes para preservar a divergência genética nas linhagens Bouaké e Chitralada.

Tabela 2. Valores médios de divergência genética nas linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Bouaké e Chitralada e valores médios das gerações de reprodutores de 1997 e de 2002, obtidos pelos complementos dos coeficientes de Jaccard.

	Bouaké 1997	Bouaké 2002	Chitralada 1997	Chitralada 2002
Bouaké 1997	0,089	-	-	-
Bouaké 2002	0,077	0,059	-	-
Chitralada 1997	0,224	0,217	0,151	-
Chitralada 2002	0,231	0,221	0,156	0,157

Tabela 3. Correlações entre as matrizes (abaixo da diagonal) e probabilidade do erro (acima da diagonal) nas linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Bouaké e Chitralada, das gerações de reprodutores dos anos de 1997 e 2002, obtidas pelo teste de Mantel, com 1000 permutações, a partir da matriz de complementos dos coeficientes de Jaccard.

	Bouaké 1997	Bouaké 2002	Chitralada 1997	Chitralada 2002
Bouaké 1997	-	0,122 ^{ns}	0,001*	0,001*
Bouaké 2002	0,049	-	0,001*	0,001*
Chitralada 1997	0,795	0,793	-	0,276 ^{ns}
Chitralada 2002	0,764	0,729	0,022	-

*Significativo $P < 0,01$, ^{ns}Não significativo

Astolphi (2003), trabalhando com seleção na linhagem Chitralada, encontrou valores semelhantes de similaridade (Jaccard) entre os parentais (0,659) e as progênies (0,663). O mesmo não ocorreu, entretanto, com Moreira *et al.* (2003), que também utilizou o processo de seleção na linhagem Chitralada observou um decréscimo da similaridade (Jaccard) dos parentais (0,756) em relação à progênie (0,892). Freitas e Galetti Jr (2003) também observaram decréscimo na similaridade (Jaccard) dentro de algumas gerações de camarão *Litopenaeus vannamei* que, segundo os autores, pode ter sido causado por endocruzamentos.

A divergência genética entre as linhagens apresentou diferença quando comparadas ambas as linhagens de 1997 (0,224) e de 2002 (0,221): Bouaké de 1997 com Chitralada de 2002 (0,231) e Bouaké de 2002 com Chitralada de 1997 (0,217) (Tabela 3). Os valores de divergência genética entre as linhagens Bouaké e Chitralada, em todas as gerações comparadas, revelam que estas são geneticamente diferentes e que, inclusive, apresentam *loci* que podem tornar-se marcadores para estas linhagens. Dinesh *et al.* (1996) encontraram para a espécie tilápia do Nilo divergência genética de 0,269, superior ao obtido

para as duas linhagens desta espécie.

Shikano e Taniguchi (2002) encontraram no peixe “Gruppy” (*Poecilia reticulata*) valores de divergência genética, pelo coeficiente de Jaccard, de 0,074 a 0,133 dentro das linhagens, e 0,125 a 0,320 na combinação das linhagens. Os autores também relataram que o híbrido obtido do cruzamento de linhagens teve um aumento de 18,7% a 10,0% na divergência genética. Estudos posteriores com híbridos entre as linhagens de tilápia do Nilo estudadas poderiam confirmar um aumento da divergência genética, o que poderia proporcionar melhores resultados no processo de melhoramento genético, principalmente, para a linhagem Bouaké, que apresentou alta similaridade genética. Segundo Moreira (1999), a linhagem Bouaké não possui variabilidade suficiente para o desenvolvimento de linhagens ou execução de um programa de seleção, portanto qualquer programa de desenvolvimento de linhagens, no Brasil, deveria iniciar pela combinação do material da linhagem Bouaké com a Chitralada, visto que a primeira já se encontra adaptada às nossas condições.

A menor divergência genética da linhagem Bouaké pode ser explicada pelo tempo de introdução das duas linhagens, no qual houve maior número de gerações de seleção, intencional ou não, na linhagem Bouaké. Um segundo fator que pode explicar a menor divergência na Bouaké é que reprodutores desta linhagem já foram introduzidos no Brasil com baixa dissimilaridade (efeito fundador). O endocruzamento também pode ser um terceiro fator, pois proporciona um aumento da homozigose e, conseqüentemente, da similaridade.

O aumento da endogamia, que não é difícil de ocorrer devido à maioria dos estoques de reprodutores serem pequenos e fechados, pode proporcionar grandes perdas na piscicultura, porque o aumento da homozigose possibilita que alelos deletérios raros (genes que levam o indivíduo à morte) e alelos detrimenais (genes que diminuem o potencial do indivíduo) tenham uma maior chance de se expressarem, reduzindo a viabilidade, a sobrevivência, o crescimento, a produção de óvulos e aumentando a porcentagem de anormalidades. Entretanto, Moreira (1999) relata que o fato da tilápia do Nilo conseguir sobreviver e se reproduzir em condições ambientais tão diferentes com alto grau de endogamia, observado pelo marcador microsatélite, pode acontecer porque os genes deletérios teriam sido eliminados.

Segundo Moreira (2001), uma das maneiras de se evitar o aumento da endogamia é manter o número efetivo de reprodutores (N_e) tão grande quanto for

possível para que não ocorra detrimento do potencial genético. O autor também relatou que os efeitos negativos da endogamia podem ser minimizados através do cruzamento de peixes geneticamente diferentes e, portanto, a estimação da divergência genética possibilitará orientar os cruzamentos.

Apesar dos efeitos negativos, a consangüinidade pode ser aplicada em situações como: quando há interesse em aumentar a participação no estoque de um determinado reprodutor; na criação de linhagens endocruzadas que serão utilizadas para produzir híbridos F_1 de crescimento rápido e fixação de características externas (Moreira, 2001).

Hatanaka e Galetti Jr. (2003) avaliaram a similaridade em três populações de *Prochilodus marginatus*, em três regiões do Rio São Francisco, e encontraram considerável discrepância genética de uma região em relação às outras. Alterações no pool gênico das populações podem ser irreversíveis e culminam, em longo prazo, com a extinção das populações locais e formação de uma nova população híbrida na região (Oliveira et al., 2002). Desta maneira, estudo populacional com a técnica de RAPD é de grande importância, pois permite distinguir populações da mesma espécie de peixe (Paiva, 2001; Yoon e Kim, 2001; Barman et al., 2003) e de grupos geneticamente diferentes que, embora muitas vezes apresentem características fenotipicamente semelhantes, pertencem a grupos geneticamente diferentes e, portanto, tratam-se de espécies diferentes (Dergam et al., 1998, 2002; Almeida e Sodré, 2002).

Os valores do  ndice de Shannon para as linhagens Bouaké e Chitralada, das gerações de reprodutores de 1997 e 2002, encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4.  ndice de Shannon nas linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Bouaké e Chitralada, das gerações de reprodutores dos anos de 1997 e 2002, obtido pelo programa Popgene.

Gerações de reprodutores	�ndice de Shannon
Bouaké de 1997	0,104
Bouaké de 2002	0,068
Chitralada de 1997	0,198
Chitralada de 2002	0,214
Geral	0,239

Os menores valores de  ndice de Shannon para a linhagem Bouaké indicam, do mesmo modo que a menor porcentagem de *loci* polimórficos, uma menor variabilidade genética na Bouaké em rela   o   Chitralada.

Esta baixa variabilidade pode ser explicada pelo tempo de introdu   o das duas linhagens e pelo efeito

fundador. Moreira (1999) constatou baixa variabilidade genética com o marcador microsatélite em estoques de reprodutores de tilápia do Nilo, obtida pelo  ndice de heterozigose e número de alelos, e também destacou como sendo um possível reflexo do efeito fundador e o método de expansão posterior dos estoques de reprodutores. O autor também relatou que a redu   o da variabilidade genética pode ser causada pela seleção (natural ou artificial) e pelo desequilíbrio entre o número de machos e fêmeas na reprodu   o. Entretanto, esta hipótese foi descartada pelo autor, porque houve igual efeito sobre todos os *loci*.

Foram semelhantes os valores de  ndice de Shannon entre as gerações de reprodutores nas duas linhagens, indicando, assim, com a porcentagem de *loci* polimórficos, que a variabilidade genética da gera   o de reprodutores de 1997 foi mantida na gera   o de 2002 na ausência de sele   o intencional e controle da sele   o da não-intencional.

Valores do  ndice Shannon semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2002) nas populações *Steindachnerina* sem mácula, com mácula e intermediária com 0,122, 0,152 e 0,176, respectivamente, mas entre as três populações foi muito superior, com  ndice de 0,446.  ndices de Shannon superiores (0,500, 0,540 e 0,580), entretanto, foram obtidos por Prioli et al. (2002) em três populações do g nero *Astyanax*.

Uma grande varia   o de genética permite que possa ocorrer sucesso de implementa   o de programas de sele   o (Rye e Ref stie, 2000). A variabilidade genética é o requisito inicial para aplica   o da sele   o e, portanto, o conhecimento desta nas populações é o primeiro passo para um programa de melhoramento (Astolphi, 2003). Segundo Appleyard et al. (2001), a sele   o de tilápia do Nilo da linhagem Chitralada com microsatélite, baseada na heterozigose, melhorou pouco o ganho de peso. Ocorreu, porém, um relativo aumento do nível de variabilidade genética, que é de grande importância para um programa de melhoramento genético.

Pelo dendrograma da Figura 1, fica claro que os indivíduos da linhagem Bouaké formam um grupo separado dos indivíduos da linhagem Chitralada e, também, fica claro que a variabilidade genética na linhagem Bouaké é bem menor que na Chitralada. Benites (2003), utilizando a técnica RAPD e o coeficiente de Jaccard, não encontrou a forma   o de grupos distintos para as linhagens Bouaké, Chitralada e Híbrida (macho Chitralada e fêmea Bouaké). Entretanto, segundo o autor, houve uma tendência de agrupamento.

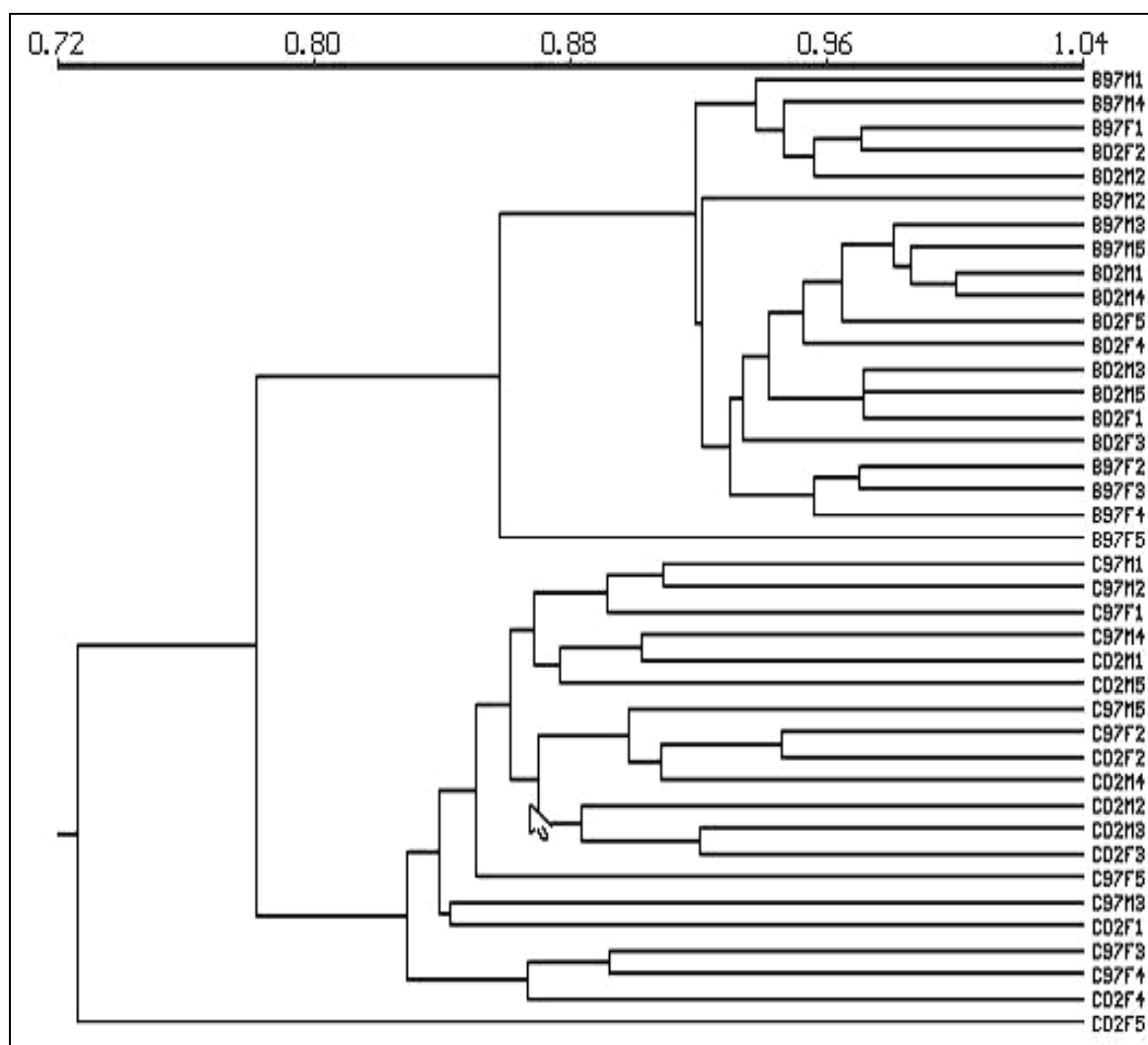


Figura 1. Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA dos reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) das linhagens Bouaké e Chitralada das gerações de reprodutores de 1997 e 2002, pelo coeficiente de Jaccard, utilizando o programa NTSYS. B97M: Bouaké da geração de 1997 e macho; B97F: Bouaké da geração de 1997 e fêmea; B02M: Bouaké da geração de 2002 e macho; B02F: Bouaké da geração de 2002 e fêmea; C97M: Chitralada da geração de 1997 e macho; C97F: Chitralada da geração de 1997 e fêmea; C02M: Chitralada da geração de 2002 e macho; C02F: Chitralada da geração de 2002 e fêmea.

Também pode ser observado, no dendrograma (Figura 1), que ambas as linhagens não apresentaram separação de grupos distintos entre as gerações de reprodutores, o que caracteriza ainda mais que não houve alteração da variabilidade genética da geração de reprodutores de 1997 e 2002 para as duas linhagens, demonstrando que, realmente, a ausência de seleção intencional e o controle da seleção não-intencional preservaram o padrão genético nas linhagens Bouaké e Chitralada. Astolphi (2003), utilizando RAPD e o coeficiente de Jaccard, obteve resultados diferentes quando os peixes foram submetidos a um processo de seleção e, embora não tenham formado dois grupos distintos, observou a tendência de formação de um grupo com os parentais e outro com a progênie.

A técnica de RAPD apresentou-se adequada para a análise da diversidade genética nas linhagens de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) Bouaké e Chitralada. Esta técnica destaca-se das demais pela facilidade de execução, por produzir resultados com baixo erro estatístico (Naish *et al.*, 1995b) e por ser bastante viável pela simplicidade e rapidez, em relação às demais técnicas moleculares (Bártfai *et al.*, 2003).

Segundo Moreira (1999), quando não for possível o emprego de marcadores moleculares, práticas como rodízio de reprodutores, igual proporção de sexos na reprodução, renovação constante de reprodutores e também o controle da incorporação de novos reprodutores podem permitir a conservação dos níveis de variabilidade genética.

Conclusão

A técnica RAPD foi eficaz para diferenciar as linhagens Bouaké e Chitralada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A Bouaké apresentou menor divergência e variabilidade genética em relação a Chitralada.

A divergência e a variabilidade genética foram uniformes de uma geração de reprodutores (1997) para outra (2002), em ambas as linhagens, indicando que a ausência de seleção intencional e o controle da seleção não-intencional foi eficiente para preservar a diversidade genética dos reprodutores.

Referências

- ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K. Comparative study by RAPD analysis of six species of the Pimelodidae family (Osteichthyes, Scleropharyngiformes) from the Tibagi River, state of Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.24, n.2, p. 513-517, 2002.
- APPLEYARD, S.A.; MATHER, P.B. Investigation into the mode of inheritance of allozyme and Random Amplified Polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquac. Res.*, Oxford, v. 31, p. 435-445, 2000.
- APPLEYARD, S.A. et al. Individual heterozygosity levels and relative growth performance in *Oreochromis niloticus* (L.) cultured under Fijian conditions. *Aquac. Res.*, Oxford, v.32, p. 287-296, 2001.
- 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.
- BARBOSA, M.M. Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998. p. 99-106.
- 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.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. A polymorphic SCAR-RAPD marker between species of tilapia (*Pisces: Cichlidae*). *Anim. Genet.*, Oxford, v.30, p. 78-79, 1999.
- BARMAN, H.K. et al. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. *Aquaculture*, Amsterdam, v.217, p. 115-123, 2003.
- BÁRTFAI, R. et al. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v.219, p. 157-167, 2003.
- BASSAM, B.J. et al. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Academic Press*, Orlando, v.196, p. 80-83, 1991.
- 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.
- 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, p. 145-173, 1998.
- BORGHETTI, N.R.B. et al. *Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003.
- CASTAGNOLLI, N. Espécies exóticas próprias para a piscicultura. In: CASTAGNOLLI, N. (Ed.) *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: Funep, 1992, p. 71-96.
- CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces Characiformes) by RAPD analysis. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.23, n.2, p. 445-451, 2001.
- DERGAM, J.A. et al. Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi, and Paraná Rivers. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v.21, n.4, p. 1-8, 1998.
- DERGAM, J.A. et al. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces: Teleostei) in southeastern Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v.25, n.4, p. 379-387, 2002.
- DEY, M.M.; GUPTA, M.V. Socioeconomics of disseminating genetically improved Nile tilapia in Asia: an introduction. *Aquac. Econ. Manag.*, Oxford, v.4, n.1, p. 5-11, 2000.
- DINESH, K.R. et al. RAPD analysis: an efficient of DNA fingerprinting in fisher. *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, p.19-30, 1996.
- 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, p. 171-188, 1993.
- ELO, K. et al. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture*, Amsterdam, v.152, p. 55-65, 1997.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: Mbrapa, 3 ed. 1998.
- FITZSIMMONS, K. Tilápia: the most important aquaculture species of the 21st Century. In: TILAPIA AQUACULTURE IN THE 21st CENTURY, 1., 2000, Rio de Janeiro. *Proceedings...* Rio de Janeiro: Panorama da Aqüicultura, 2000. p. 3-8.
- FREITAS, P.D.; GALETTI Jr, P.M. Genetic diversity in broodstocks of the shrimp *Litopenaeus vannamei* using RAPD analyses. IN: WORLD AQUACULTURE, 2003, Salvador. *Abstracts...* Salvador: INVE, v.1, 2003. p. 292.
- GUPTA, M.V. et al. Fish Genetics Research at the International Center for Living Aquatic Resources

- Management. In: GUPTA, M.V.; ACOSTA, B.O. (Ed.) *Fish genetics research in member countries and institutions of the International Network on Genetics in Aquaculture*. Penang: ICLARM, p. 64-179, 2001.
- HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P.M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v.26, n.1, p. 19-25, 2003.
- KUBTIZA, F. Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial. 1. ed. Jundiaí: F. Kubtiza, 2000, 289 p.
- LIU, Z.J. *et al.* Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, Amsterdam, v.174, p. 59-68, 1999.
- LOVSHIN, L.L. Tilapia culture in Brazil. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. (Ed.). *Tilapia aquaculture in the Americas*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, v.2, p. 133-140, 2000.
- MATHER, P.B. 2001. Overview of fish genetics research at Queensland University of Technology, p. 133-139. In: GUPTA, M.V.; ACOSTA, B.O. (Ed.). *Fish genetics research in member countries and institutions of the International Network on Genetics in Aquaculture*. Brisbane: ICLARM, p. 64-179, 2001.
- MILACH, S. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998. p. 17-28.
- 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. *Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do nilo (Oreochromis niloticus) estimadas por microsatélite*. 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.* Maringá. *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, 2003b, Salvador. *Abstracts...* Salvador: INVE, v.2, 2003. p. 460.
- NAISH, K.A. *et al.* Use of DNA fingerprinting, RAPD, e RAPD/RFLP markers for estimating variation between aquacultural strains of Tilápia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, Amsterdam, v.137, p. 48-49, 1995a.
- NAISH, K.A. *et al.* Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Mol. Ecol.* Oxford, v.4, p. 271-274, 1995b.
- OLIVEIRA, A.V. *et al.* Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. *Genetica*, Dordrecht, v.115, n.3, p. 259-257, 2002.
- PAIVA, S.R. *Influência de obstáculos naturais na divergência de populações de Astyanax bimaculatus na bacia do rio Doce-MG*. 2001. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- PARTIS, L.; WELLS, R.J. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes*, [S.L.], v.10, p.435-441, 1996.
- POPMA, T.J.; LOVSHIN, L.L. Tilápia especial. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v.5, n.27, p. 7-13, 1995.
- PRIOLI, S.M.A. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 421-432, 2002.
- RIESEBERG, L.H. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol. Ecol.*, Oxford, v.5, p. 99-105, 1996.
- ROHLF, F.J. *NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. New York: Exeter Publishers, 1989.
- RYE, M.; REFSTIE, T. Genetic improvement in tilapia: importance and alternative strategies. In: TILAPIA AQUACULTURE IN THE 21st CENTURY, 1., 2000, Rio de Janeiro. *Proceedings...* Rio de Janeiro: Panorama da Aqüicultura, 2000. p. 58.
- SEKINE, E.S. *et al.* Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paraná River. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.24, n.2, p. 507-512, 2002.
- SEYOUM, S.; KORNFIELD, I. Identification of the subspecies of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) using restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Aquaculture*, Amsterdam, v.102, p. 29-42, 1992.
- SHIKANO, T.; TANIGUCHI, N. Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Poecilia reticulata*) as a fish model. *Aquaculture*, Amsterdam, v.204, p. 271-281, 2002.
- SÜLTSMANN, H. *et al.* Phylogenetic analysis of Cichlid fishes using nuclear DNA markers. *Mol. Biol. Evol.*, Chicago, v.12, n.6, p. 1033-1047, 1995.
- TELLES, M.P.C. *et al.* Marcadores RAPD na análise de divergência genética entre raças de bovinos e número de loci necessários para a estabilidade da divergência estimada. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.2, n.2, p. 87-95, 2001.
- WAGNER, P.M. *Avaliação de linhagens de tilápia do Nilo Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) em diferentes fases de criação*. 2002. Dissertação (Mestrado em Produção Animal)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2002.
- WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- YEH, F.C. *et al.* 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.

Received on October 21, 2004.

Accepted on March 30, 2005.