

Avaliação da variabilidade das gerações G_0 e F_1 da linhagem GIFT de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por RAPD

Enio Lupchinski Júnior^{1*}, Lauro Vargas², Jayme Aparecido Povh³, Ricardo Pereira Ribeiro², Claudete Aparecida Mangolin⁴ e Nelson Maurício Lopera Barrero¹

¹Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ²Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. ³Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Rondonópolis, Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil. ⁴Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: lupi0@yahoo.com.br

RESUMO. Este trabalho teve como objetivo analisar, pela técnica RAPD, a variabilidade e a divergência genética de duas gerações da linhagem GIFT. Foram estimados parâmetros para os reprodutores (G_0) e para a progênie (F_1). A variabilidade genética foi determinada pela porcentagem de *loci* polimórficos e pelo índice de Shannon. As gerações apresentaram 69,6% de *loci* polimórficos (G_0) e 60,0% de polimorfismo (F_1). Os valores para o índice de Shannon foram de 0,367 para a geração G_0 e de 0,317 para a F_1 . Os valores de divergência genética, calculados pelo teste de Mantel, foram de 0,213 para a G_0 e 0,208 para a geração F_1 . Os resultados obtidos indicaram que houve perda da variabilidade genética da geração G_0 para a F_1 . No entanto, um fato a ser destacado foi a alta variabilidade genética para as gerações G_0 e F_1 , característica fundamental para que ocorra ganho por melhoramento genético. O conjunto de dados indicou, ainda, que o status genético é favorável para a continuidade do programa de melhoramento genético para a linhagem GIFT, no Estado do Paraná.

Palavras-chave: índice de Shannon, gerações de cultivo, divergência genética, variabilidade genética.

ABSTRACT. Variability evaluation of G_0 and F_1 generations of GIFT Nile tilapia strain (*Oreochromis niloticus*) by RAPD. This study had as objective to analyze, by RAPD technique, the genetic variability and divergence of two GIFT Nile tilapia strain generations. Parameters were estimated for breeders (G_0) and offspring (F_1). The genetic variability was determined by the polymorphic *loci* percentage and Shannon index. The polymorphic *loci* percentages were 69.6% (G_0) and 60.0% (F_1). The Shannon index values were 0.367 for the G_0 generation and 0.317 for F_1 . Genetic divergence values, calculated using the Mantel test, were 0.213 for G_0 and 0.208 for the F_1 generation. The results indicated that there was a genetic variability loss from the G_0 to F_1 generation. However, it is important to observe the high genetic variability found for both the G_0 and F_1 generations, which is a fundamental characteristic in order to obtain gains in breeding programs. The data also indicated that the genetic status is favorable to the continuing of the GIFT improvement program in Paraná State.

Key words: Shannon index, cultivated generations, genetic divergence, genetic variability.

Introdução

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

Na produção aquícola por regiões, a América Latina e o Caribe se destacaram pela maior taxa de

crescimento anual entre todas as regiões: 21,3% ao ano, para o período compreendido entre os anos de 1950 e 2004 (FAO, 2006).

O cultivo de tilápias apresentou importante crescimento entre 1993 e 2003, na América Latina e no Caribe. O incremento do consumo nos Estados Unidos e a abertura de novos mercados, como o da União Européia, contribuíram substancialmente para este aumento. Em consequência, a produção latino-americana e caribenha cresceu de 24.100 t em 1993 para 127.000 t em 2004 (FAO, 2005).

A produção anual de 69.078 t, em 2004, elevou o

Brasil à sétima colocação entre os produtores mundiais de tilápia (FAO, 2006). No cenário nacional, o Estado do Paraná destacou-se como o segundo maior produtor de tilápias no ano de 2004, com um montante de 11.921,5 t ano⁻¹ (Ibama, 2005).

As tilápias são amplamente reconhecidas como as espécies, na aquicultura de água doce, com maior potencial para diversos sistemas de cultivo, desde o cultivo familiar em pequena escala até os sistemas superintensivos (Bentsen *et al.*, 1998). Dentre as diversas espécies de tilápia, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a mais representativa na aquicultura mundial (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Kamal e Mair, 2005).

A técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) emprega a metodologia baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e utiliza *primers* arbitrários para detectar as variações nas sequências de DNA, nos locais em que estes *primers* se anelam ao genoma (Yoke-Kqueen e Radu, 2006). Por esta característica randômica de anelamento e a habilidade de avaliar qualquer região do genoma, permite-se atribuir aos marcadores por RAPD uma boa representatividade para estudos de diversidade genômica (Sandoval-Castellanos *et al.*, 2007), mesmo sem qualquer conhecimento prévio de ferramentas em biologia molecular para a espécie em questão (Martinez *et al.*, 2006).

Em organismos aquáticos, observa-se o uso de RAPD para estudos em genética de diversas espécies, como, por exemplo, o cefalópode *Dosidicus gigas* (Sandoval-Castellanos *et al.*, 2007), o camarão *Pandalus borealis* (Martinez *et al.*, 2006), ciclídeos do gênero *Oreochromis* (Bardakci e Skibinski, 1994; Povh *et al.*, 2005), salmonídeos (Araneda *et al.*, 2005), ictalurídeos (Liu *et al.*, 1998) e ciprinídeos (Barman *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005).

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

A base populacional da linhagem GIFT foi composta por quatro linhagens comerciais de tilápias cultivadas na Ásia e quatro linhagens silvestres de tilápias de origem africana (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004). Tal base populacional, formada por oito linhagens puras, teve a finalidade de elevar a variabilidade genética, a partir

da qual seriam selecionadas as primeiras gerações desta linhagem.

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

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

Os marcadores moleculares representam uma das metodologias mais realísticas para a pesquisa e monitoramento do status genético em fazendas de alevinagem e cultivo (Alam e Islam, 2005). Segundo Romana-Eguia *et al.* (2004), os estoques de tilápia do Nilo não foram geneticamente caracterizados, nem mesmo os exemplares domesticados e melhorados, ou seja, nenhum dos marcadores moleculares disponíveis foi devidamente aplicado. Nesse sentido, a caracterização por RAPD representa uma importante informação sobre o status genético da linhagem GIFT, deste a sua introdução no País.

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

Material e métodos

Obtenção dos animais

Neste trabalho, foram utilizados 60 exemplares de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) da linhagem GIFT, sendo 30 exemplares da geração introduzida no país (G₀) e 30 exemplares da geração produzida no Brasil (F₁), progênie da geração G₀. As amostras dos exemplares da geração G₀ foram retiradas de um banco de tecidos que continha amostras das 560 tilápias sobreviventes, representantes das 30 famílias GIFT importadas da Malásia, de maneira totalmente randomizada. As amostras das tilápias da geração F₁ foram retiradas “*in vivo*”, de animais aleatoriamente capturados diretamente dos tanques de cultivo, entre os cerca de 2.500 peixes produzidos nesta geração (F₁).

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

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

Extração do DNA genômico

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

Os fragmentos de nadadeira caudal, com aproximadamente 250 mg, foram colocados em microtubos com 550 µL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl e 1% SDS) e 7 µL de proteinase K (200 µg mL⁻¹), e mantidos em banho-maria a 50°C por cerca de 12h. Em seguida, à solução foram acrescentados 400 µL de NaCl (solução aquosa saturada a 5 M) e as amostras foram centrifugadas por 5 min. a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e o DNA foi precipitado pela adição de 900 µL de etanol absoluto gelado, após serem incubados por 1h à temperatura de -20°C. Logo após, a solução foi centrifugada e o pellet foi lavado com etanol (500 µL de etanol 70%) e ressuspenso em 120 µL de TE (10 mM de Tris pH 8.0 e EDTA), e tratada com 5 µL de RNase. Após todo esse procedimento, a solução de DNA foi colocada em banho-maria a 37°C por cerca de 40 min. A solução de ácido nucléico foi armazenada a -20°C.

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

Amplificação do DNA

As amplificações por RAPD foram baseadas no método descrito por Williams *et al.* (1990) com modificações. As reações foram realizadas em microtubos para PCR (0,2 mL), contendo tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2 mM de MgCl₂, 100 ng de *primer* (oligonucleotídeos), 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®) e 15

ng de DNA molde, completando-se com água mili-Q para um volume final de 15 µL.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient®), programado para 40 ciclos, com uma desnaturação inicial por 4 min. a 94°C e extensão final a 72°C por 5 min. Cada ciclo consistiu em 1 min. a 94°C, 1 min. e 30 s a 40°C e 2 min. a 72°C. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em cada grupo de amplificação.

Para escolha dos oligonucleotídeos, foram avaliados 28 *primers* (Kit Operon®, Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), dos quais foram selecionados os 12 *primers* que apresentaram os melhores padrões de amplificação, com bandas mais claras e presentes nas várias corridas eletroforéticas.

Eletroforese e documentação dos resultados

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose (1,7%). Foram utilizados 10 µL do produto amplificado e 4 µL de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol). Este material foi submetido à corrida eletroforética em cuba horizontal a 70 V, contendo tampão TBE 0,5X (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de EDTA), durante 4h. Imediatamente após, os géis foram corados por 30 min. com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹). Os fragmentos de DNA foram visualizados por meio de um transiluminador com luz ultravioleta (UV) e fotografados usando-se o sistema EDAS® (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

Análise do padrão de fragmentos

A 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, os indivíduos foram marcados para a presença de determinado fragmento (1) ou para sua ausência (0). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com o padrão "100 pb DNA Ladder" (Invitrogen®). O programa NTSYS 1.7 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 1989) foi usado para estas análises.

Foi analisada a diferenciação genética entre as duas gerações e os indivíduos dentro de cada geração pelo teste de Mantel. Para ambas as gerações, foi construída uma matriz de dissimilaridade com os complementos dos coeficientes de Jaccard entre indivíduos e uma matriz modelo com a identificação da geração de cada indivíduo, e as possíveis combinações de correlações foram calculadas pelo método de Monte Carlo (10.000 permutações), com a

utilização do programa Mantel-Struct (Miller, 1999).

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

Resultados e discussão

Loci polimórficos por RAPD

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

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

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

Primers Primers	Sequências dos nucleotídeos Nucleotide sequences	(G+C) (G+C)	Loci Loci	Fragmentos (pb) Fragments (bp)
OPA01	⁵ CAG GCC CTT C ³	70	8	450–2,020
OPA02	⁵ TGC CGA GCT G ³	70	11	400–2,000
OPA10	⁵ GTG ATC GCA G ³	60	10	650–2,820
OPA16	⁵ AGC CAG CGA A ³	60	7	700–2,030
OPW01	⁵ CTC AGT GTC C ³	60	9	350–1,600
OPW02	⁵ ACC CCG CCA A ³	70	10	420–2,700
OPW03	⁵ GTC CGG AGT G ³	70	7	1.000–3,050
OPW08	⁵ GAC TGC CTC T ³	60	9	500–2,800
OPW13	⁵ CAC AGC GAC A ³	60	12	510–2,900
OPW19	⁵ CAA AGC GCT C ³	60	9	460–2,100
OPX1	⁵ CTG GGC ACG A ³	70	12	380–2,150
OPX3	⁵ TGC CGC AGT G ³	70	11	340–2,600
Total		-	115	340-3,050

O número de fragmentos, obtidos com o marcador RAPD, variou de sete, para os *primers* OPA16 e OPW03, a 12 *loci* gerados pelos *primers* OPW13 e OPX1. O maior fragmento produzido foi de 3.050 pares de bases, obtido pelo *primer* OPW03, e o *primer* OPX3 gerou o menor fragmento, com cerca de 340 pares de bases.

Para Wang e Li (2004), cada fragmento produzido por RAPD pode ser considerado um *locus* independente, e cada indivíduo pode ser marcado para a presença do referido *locus* (1), ou ausência (0), como ressaltaram Sandoval-Castellanos *et al.* (2007), apenas os *primers* que produziram bandas claras e destacadas foram selecionados para as análises. Os *primers* utilizados produziram 115 fragmentos, com polimorfismo de 75,7%, ou seja, foram produzidos 87 *loci* polimórficos, quando levadas em consideração ambas as gerações de cultivo.

Em relação a cada geração produtiva da linhagem GIFT, a geração parental G₀ apresentou porcentagem de *loci* polimórficos igual a 69,6%,

enquanto que para a progênie F₁ o valor encontrado foi igual a 60,0%. Esta redução em relação ao polimorfismo foi esperada, pois diversos autores afirmam que há diminuição gradual na variabilidade genética em populações de cativeiro (Islam e Alam, 2004; Alam e Islam, 2005; Wasko, 2005; Li *et al.*, 2006).

Melo *et al.* (2006) destacaram que práticas inadequadas de larvicultura, com a utilização de pequeno número de reprodutores e o desbalanço entre os sexos, bem como situações em que a seleção intencional é executada de maneira pouco criteriosa, podem modificar a estrutura e composição gênica de estoques estabelecidos tanto para a produção comercial tanto para fins de repovoamento.

Segundo Li *et al.* (2006), uma maneira de mitigar o efeito da diminuição da variabilidade em estoques de cultivo é realizar o processo de seleção com grande número efetivo de reprodutores, em torno de 1.000 exemplares por geração de seleção, cuidado este que não pode ser observado na íntegra, pois o número de sobreviventes, que formaram a geração G₀, foi de 560 exemplares, os quais serviram de população base para a produção da próxima geração (F₁).

Segundo Melo *et al.* (2006), os marcadores moleculares podem ser utilizados para indicar aos criadores a redução da diversidade genética, ou seja, para o monitoramento genético das gerações de cultivo. Os autores destacaram que tais marcadores podem orientar os cruzamentos entre os indivíduos mais divergentes, visando ao aumento ou manutenção da variabilidade genética, condição essencial para o melhoramento genético de qualquer organismo.

Wang e Li (2004) estudaram três variedades de carpas coloridas cultivadas (*Cyprinus carpio*) e obtiveram o total de 219 *loci*, porém com a utilização de 31 *primers*, número bastante superior ao usado neste trabalho (12 *primers*). Em relação aos valores de polimorfismo, os maiores valores foram encontrados para a carpa colorida variedade *Oujiang* (79,5%), os valores intermediários para a variedade *Long-fin* (72,8%) e os valores menores para a carpa ornamental *Koi* (39,5%), fato atribuído, segundo os autores, ao menor número efetivo da população de carpas *Koi* (N_e), quando de sua introdução (Wang e Li, 2004).

Povh *et al.* (2005), quando trabalharam com tilápias do Nilo (*O. niloticus*), encontraram valores inferiores de *loci* polimórficos, em todo seu universo amostral. Para a linhagem Bouaké, os autores encontraram porcentagem de *loci* igual a 18,9% para a geração de reprodutores (1997) e apenas 12,2%

para a geração de 2002. Já para a linhagem Chitralada foram encontrados 33,3% de polimorfismo para os reprodutores (geração de 1997) e 36,7% para a geração cultivada em 2002.

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

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

Índice de Shannon

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

Tabela 2. Índices de Shannon para as gerações G_0 e F_1 da linhagem GIFT.

Table 2. Shannon index for G_0 and F_1 GIFT strain generations.

Geração Generation	Índice de Shannon Shannon index
G_0	0,367
F_1	0,317
Todos os loci All loci	0,371

Os valores do índice de Shannon foram ligeiramente inferiores para a progênie F_1 (0,317) em relação à geração parental G_0 (0,367); pode-se salientar, porém, que esta diminuição era esperada, pelo processo natural de redução gradual da variabilidade genética em populações de cativeiro (Islam e Alam, 2004; Alam e Islam, 2005; Wasko, 2005; Li *et al.*, 2006). Tanto para a porcentagem de loci polimórficos quanto para os resultados do índice de Shannon, observou-se o mesmo comportamento em relação à variabilidade genética, na passagem da geração G_0 para a F_1 , o que pode ser explicado pelo número de representantes da geração G_0 , 560 exemplares, portanto abaixo do mínimo preconizado por Li *et al.* (2006).

Lopera-Barrero *et al.* (2007b) encontraram

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

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

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

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

Os valores para o índice de Shannon, assim como a porcentagem de loci polimórficos, discutida anteriormente, indicaram que a alta variabilidade genética dentro de cada geração foi mantida (G_0 e F_1), bem como a da linhagem e espécie, como unidade taxonômica. Vale destacar que um dos principais objetivos do programa GIFT foi a seleção baseada em desempenho por ganho de peso (Eknath *et al.*, 1993; Bentsen *et al.*, 1998; Gupta e Acosta, 2004; Li *et al.*, 2006), e não a estabilidade ou o aumento da variabilidade genética; a manutenção de tal parâmetro, porém, é altamente desejável.

Divergência genética

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

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

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

Geração Generation	G_0 G_0	F_1 F_1
G_0	0.213	-
F_1	0.228*	0.208

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

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

As duas gerações estudadas apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,01$) para os valores de divergência genética. Entretanto, a divergência dentro de cada geração foi alta, bem como foi elevada a divergência para o conjunto de dados, fato que se tornará evidente no transcorrer da discussão.

As variações genéticas sazonais, quando moderadas, podem ser explicadas por processos que envolvem efeitos estocásticos, de deriva genética (*genetic drift*) ou até mesmo por erro amostral (Sandoval-Castellanos *et al.*, 2007). Alam e Islam (2005) reforçaram que não se pode descartar o erro amostral como causa para a perda de variabilidade. Quaisquer destes fatores podem ter sido responsáveis pela diferença significativa quanto à divergência genética entre as duas gerações produtivas (G_0 e F_1).

O próprio número efetivo de 560 representantes da geração G_0 , portanto abaixo do recomendado por Li *et al.* (2006), de cerca de 1.000 exemplares por geração de seleção, pode explicar esta diminuição da divergência no estabelecimento da geração F_1 em relação a seus progenitores.

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

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

Lopera-Barrero *et al.* (2007c) estudaram a

divergência genética em duas gerações consecutivas de *B. orbignyianus*, cultivadas no Estado de São Paulo. Os autores não encontraram diferenças significativas entre a divergência genética dos reprodutores (0,160) e sua progênie (0,170). O valor da divergência genética da progênie em relação aos seus progenitores foi igual a 0,190 ($p > 0,01$).

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

Segundo Povh *et al.* (2005), os menores valores para a divergência genética na linhagem Bouaké, iguais a 0,089 e 0,059, podem ser explicados pelo maior tempo de introdução desta linhagem no Brasil (1971) (Castagnolli, 1992), para a qual houve maior número de gerações de seleção (intencional ou não). Um segundo fator é que os primeiros exemplares podem ter sido introduzidos já com baixa dissimilaridade (efeito fundador). Pode-se considerar, por analogia, que os presentes resultados evidenciaram o contrário, pois para a geração G_0 , encontrou-se valor relativamente alto de divergência genética (0,213), para a geração F_1 (0,208), bem como para os dados em conjunto (0,228).

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

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

Bentsen *et al.* (1998) e Li *et al.* (2006) afirmaram

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

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

Conclusão

A variabilidade genética encontrada foi alta, mesmo levando-se em consideração o processo de seleção ao qual foi submetida a linhagem. Contudo, houve redução da variabilidade na passagem das gerações G_0 para F_1 .

Os resultados obtidos indicaram que a linhagem não sofreu efeitos prejudiciais no decorrer de seu estabelecimento, fato evidenciado por todos os parâmetros encontrados para estimar o status genético da linhagem GIFT de tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

Referências

- ALAM, M.S.; ISLAM, M.S. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 246, n. 1-4, p. 151-160, 2005.
- ARANEDA, C. *et al.* Identification of a dominant SCAR marker associated with colour traits in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 247, n. 1, p. 67-73, 2005.
- ASTOLPHI, J.L.L. *Avaliação da diversidade genética entre a geração parental e sua progênie selecionada de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) da linhagem Chitralada com uso do marcador de RAPD*. 2003. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)–Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, London, v. 73, p. 117-123, 1994.
- BARMAN, H.K. *et al.* Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified Polymorphic DNA assay. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 217, n. 1-4, p. 115-123, 2003.
- BENTSEN, H.B. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 160, 1-2, p. 145-173, 1998.
- CASTAGNOLLI, N. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: Funep, 1992.
- EKNATH, A.E. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 111, n. 1-4, p. 171-188, 1993.
- FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome: FAO Information Division, 2002.
- FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Regional review on aquaculture development 1: Latin America and the Caribbean*. Rome: FAO Information Division, 2005.
- FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Fisheries technical paper: state of world aquaculture*. Rome: FAO Information Division, 2006.
- GUPTA, M.V.; ACOSTA, B.O. From drawing board to dining table: the success story of the GIFT project. *Naga: The ICLARM Quarterly*, Yaounde, v. 27, n. 2-3, p. 4-14, 2004.
- IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Estatística da pesca 2004 - Brasil: grandes regiões e unidades da federação*. Brasília: Ibama, 2005.
- ISLAM, M.S.; ALAM, M.D. Randomly amplified polymorphic DNA analyses of four different populations of the Indian major carp. *Labeo Rohita* (Hamilton). *J. Appl. Ichthyol.* Berlin, v. 20, n. 5, p. 407-412, 2004.
- KAMAL, A.H.M.M.; MAIR, G.C. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 247, p. 189-201, 2005.
- LI, S-F. *et al.* Improving growth performance and caudal fin stripe pattern in selected F6-F8 generations of GIFT Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection. *Aquac. Res.*, Oxford, v. 37, n. 12, p. 1165-1171, 2006.
- LIU, Z.J. *et al.* Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2 and backcross hybrids. *Anim. Genet.*, Oxford, v. 29, n. 1, p. 58-62, 1998.
- LONGALONG, F.M. *et al.* Response to bi-directional selection for frequency of early maturing females in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 178, n. 1, p. 13-25, 1999.
- LOPERA-BARRERO, N.M. *et al.* Comparison of DNA extraction protocols from preserved fish fins and larva for pcr amplification: modified salt extraction. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, 2007a. (No prelo).
- LOPERA-BARRERO, N.M. *et al.* RAPD analysis (Random Amplified Polymorphic DNA) in piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849) stocks of the southwest of

- Brazil: genetic variability and preservation. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, 2007b. (No prelo).
- LOPERA-BARRERO, N.M. *et al.* Genetic diversity in piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) stocks. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Curitiba, 2007c. (No prelo).
- LUPCHINSKI JR., E. *et al.* Aplicação de RAPD para avaliação da composição genética de três linhagens de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. In: CONGRESSO AQUACIÊNCIA, 2006, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: AquaCiência, 2006.
- MARTINEZ, I. *et al.* The genetic structure of *Pandalus borealis* in the Northeast Atlantic determined by RAPD analysis. *J. Mar. Sci.*, Dauphin Island, v. 63, n. 5, p. 840-850, 2006.
- MELO, D.C. *et al.* Caracterização genética de seis plantéis de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 87-93, 2006.
- MILLER, M. MANTEL-ESTRUCT: a program for the detection of population structure via mantel tests. *J. Heded. Cary*, v. 90, p. 258-259, 1999.
- MOREIRA, H.L.M. *et al.* The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. In: WORLD AQUACULTURE, 2003, Salvador. *Abstracts...* Salvador: INVE, 2003. v. 2, p. 460.
- POVH, J. A. *et al.* Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Sci. Anim. Sci.*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.
- PRIOLI, S.M.A.P. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Gen. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.
- ROHLF, F.J. *NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. New York: Exeter Publishers, 1989.
- ROMANA-EGUIA, M.R.R. *et al.* Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 236, n. 1-4, p. 131-150, 2004.
- SANDOVAL-CASTELLANOS, E. *et al.* Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analyses. *Fish. Res.*, New York, v. 83, n. 1, p. 113-118, 2007.
- WANG, C.H.; LI, S.F. Phylogenetic relationships of ornamental (Koi) carp, Oujiang color carp and Long-fin carp revealed by mitochondrial DNA COII gene sequences and RAPD analysis. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 231, n. 1, p. 83-91, 2004.
- WASKO, A.P. A importância do monitoramento genético em estoques cultivados de matrinxã e piracanjuba. *Rev. Panor. Aquicult.*, Botafogo, v. 15, n. 88, p. 47-49, 2005.
- WASKO, A.P. *et al.* Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinxã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programs. *J. Appl. Ichthyol.*, Berlin, v. 20, n. 1, p. 48-52, 2004.
- 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.
- WINKLER, F. M. *et al.* Genetic differences among year classes in a hatchery population of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792)) in Chile. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 173, n. 1-4, p. 425-433, 1999.
- YAN, J. *et al.* RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) X common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 243, n. 1-4, p. 49-60, 2005.
- YEH, F.C. *et al.* *POPGENE version 131*: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.
- YOKE-KQUEEN, C.; RADU, S. Random amplified polymorphic DNA analyses of genetically modified organisms. *J. Biotechnol.*, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 161-166, 2006.

Received on March 13, 2007.

Accepted on May 30, 2008.