

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE QUATRO LINHAGENS DE *Oreochromis niloticus* UTILIZANDO O MARCADOR RAPD

### GENETIC DIVERSITY OF FOUR *Oreochromis niloticus* STRAINS USING THE RAPD MARKER

Haluko MASSAGO<sup>1</sup>; Ricardo Pereira RIBEIRO<sup>2</sup>; Nelson Maurício Lopera BARRERO<sup>3</sup>; Jayme Aparecido POVH<sup>4</sup>; Newton CASTAGNOLLI<sup>5</sup>; Patrícia Cristina GOMES<sup>6</sup>

1. Mestre em Aqüicultura, Doutoranda, Centro de Aqüicultura – CA, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. [hmassago@yahoo.com.br](mailto:hmassago@yahoo.com.br); 2. Professor, Doutor, Centro de Ciências Agrárias - CCA, Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá, PR, Brasil; 3. Professor, Doutor, Departamento de Ciências, Facultad de Biología, Universidad del Tolima, Núcleo de Pesquisa PeixeGen. Barrio Santa Helena, Ibagué - Tolima, Colombia. [nelson.peixegen@gmail.com](mailto:nelson.peixegen@gmail.com); 4. Professor, Doutor, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Rondonópolis, Cuiabá, MT, Brasil; 5. Diretor da Castagnolli Consultoria S/S Ltda., Jaboticabal, SP, Brasil; 6. Mestre em Zootecnia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, CCA - UEM, Maringá, PR, Brasil.

**RESUMO:** O objetivo do presente estudo foi analisar a diversidade genética de quatro linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), utilizando o marcador RAPD. Foram coletadas amostras de nadadeira de estoques de juvenis das linhagens GIFT (G), Chitralada (C), Supreme (S) e Bouaké (B). Os 11 *primers* utilizados produziram 81 fragmentos dos quais 41,98% foram polimórficos. A porcentagem de fragmentos polimórficos (G: 18,52%; C: 19,75%; S: 20,99% e B: 24,79%) e os resultados do  $G_{st}$  confirmaram que houve alta (BxG: 0,231; BxC: 0,224; GxC: 0,194 e SxC: 0,208) e elevada (BxS: 0,315 e GxS: 0,270) diferenciação genética entre as linhagens. O fluxo gênico ( $N_m$ ) foi maior entre as linhagens GxC (2,082). Os valores de distância e identidade genética (0,044 e 0,957 respectivamente) e o dendrograma indicam que as linhagens GxC são as mais semelhantes geneticamente. A similaridade genética foi alta dentro das linhagens (G: 0,932; C: 0,903; S: 0,891 e B: 0,900). Os resultados deste estudo possibilitarão o correto manejo reprodutivo e genético das linhagens.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bouaké. Chitralada. GIFT. Supreme. Tilápia. Variabilidade genética.

## INTRODUÇÃO

Tilápia é o nome comum de aproximadamente 70 espécies de peixes taxonomicamente classificadas da família Cichlidae (FITZSIMMONS, 2000). Embora nativa da África e do Oriente Médio, a tilápia se tornou uma das espécies mais cultivadas em todo mundo, sendo produzida em mais de 100 países (ROMANA-EGUIA et al., 2004). No Brasil, o cultivo dessa espécie vem crescendo rapidamente desde a introdução da tilápia do Nilo no Nordeste, no início dos anos 70, com ênfase nas últimas décadas (CYRINO et al., 2004). O crescimento de sua produção, em todo o mundo, é devido a diversas características vantajosas para seu cultivo, tais como a alta rusticidade, precocidade, alta prolificidade, aceitação de uma grande quantidade de alimentos, boa conversão alimentar e reprodução durante quase todo o ano, segundo Melo et al. (2006).

As tilápias de maior importância econômica estão divididas em três gêneros principais: *Tilapia*, *Oreochromis* e *Sarotherodon* (KUBITZA, 2000). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais comum na piscicultura, com mais dos 40% da produção total de peixes (FAO, 2005). No Brasil, se

destacam duas linhagens desta espécie: Bouaké e Chitralada (LOVSHIN, 2000). A primeira é originária da Costa do Marfim e foi introduzida no Brasil em 1971; a segunda teve origem no Egito, foi para o Japão e daí exportada para Tailândia, lugar onde foi domesticada (MOREIRA, 1999), sendo introduzida no país em 1996.

Novas linhagens têm sido introduzidas recentemente. A linhagem Supreme, proveniente da empresa GenoMar Supreme Tilapia (ex-GIFT), foi introduzida em 2002 no Brasil (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2003). A tilápia GIFT, proveniente do projeto de pesquisa *The Genetic Improvement of Farmed Tilapia* – GIFT, é uma linhagem que foi melhorada geneticamente baseando-se em quatro linhagens comerciais cultivadas na Ásia e quatro linhagens silvestres de origem africana (GUPTA; ACOSTA, 2004), chamando a atenção pelo pioneirismo na história do melhoramento genético em peixes tropicais. O *WorldFish Center* exerce uma política de transferência da linhagem e tecnologia GIFT a diferentes países, sobretudo os denominados “em desenvolvimento”. Atualmente no Brasil, o único núcleo desta linhagem está localizado nas instalações da Universidade Estadual de Maringá -

Paraná, onde foi introduzida em 2005 em um projeto elaborado em conjunto com o *WorldFish Center*—e com o apoio da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca - SEAP (LUPCHINSKI JR, 2007).

Apesar da alta produção e das condições zootécnicas satisfatórias desta espécie, práticas de manejo inadequadas podem levar à diminuição da variabilidade genética (AHO et al., 2006), tanto por falta de planejamento dos programas de seleção genética, como pelo uso de um número reduzido de reprodutores, com o conseqüente aumento do coeficiente de endogamia (KANG et al., 2006). Entre as várias técnicas de marcadores moleculares usadas para estimar a variabilidade genética, a técnica de RAPD apresenta como vantagem a simplicidade e rapidez, obtenção de muitos fragmentos com pouca quantidade de DNA, não necessita do conhecimento prévio da seqüência do DNA, além de um custo relativamente baixo (ALI et al., 2004; LIU; CORDES, 2004).

Vários trabalhos com marcadores moleculares RAPD têm sido realizados para *Oreochromis* analisando a estrutura e diversidade genética (WALMSLEY, 2004; POVH et al., 2005; VIEIRA et al., 2005; LUPCHINSKI Jr, 2007), para investigar a herdabilidade (APPLEYARD; MATHER, 2000; ASTOLPHI, 2003; CEPOLLARO; COLOMBO, 2003), construção de mapas genéticos (KOCHER et al., 1998) e discriminação sexual (BARDAKCI, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética de quatro linhagens de *Oreochromis niloticus* produzidas comercialmente no Brasil, utilizando o marcador RAPD.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material biológico

Amostras de nadadeira caudal de 0,5 cm<sup>2</sup> aproximadamente foram coletadas de juvenis das linhagens Bouaké (sete amostras - Fundação Municipal 25 de Julho – Joinville, SC), GIFT (oito amostras - Universidade Estadual de Maringá - PR), Supreme (oito amostras - Centro de Aquicultura da UNESP - SP) e Chitralada (sete amostras - Geneforte - MG).

### Extração e quantificação de DNA

Para a extração de DNA, foi utilizada a metodologia descrita por Povh et al. (2005) com algumas modificações. Os fragmentos de nadadeira caudal de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>, preservados a -20°C com etanol 70%, 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% de SDS) e 200 µg/mL de proteinase K e, em seguida, incubados em banho-maria a 50°C por 12 horas aproximadamente. Posteriormente, o DNA foi purificado com duas extrações com fenol e três de clorofórmio. O DNA obtido foi precipitado com duas vezes e meia de volume de etanol absoluto e um décimo de volume de acetato de sódio em relação ao volume recuperado e foi incubado por duas horas a -20°C. Em seguida, o DNA foi centrifugado, lavado com 2 mL de etanol 70%, ressuspendido em 60 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 40 minutos em banho-maria a 37°C, sendo em seguida conservado a -20°C.

A estimativa da quantidade de DNA presente em cada amostra foi feita pela comparação com DNA do fago λ, de concentração conhecida, por meio de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 10 mM ácido acético glacial; 1mM EDTA pH 8,0). Para a revelação do gel, utilizou-se um banho de brometo de etídeo a 0,5 µg/mL por 30 minutos e a imagem foi capturada pelo sistema EDAS (*Kodak 1D Image Analysis 3.5*). Com base nestas estimativas, as amostras foram diluídas para a concentração de 10 ng/µL.

### Amplificação e eletroforese do DNA

As condições de amplificação foram baseadas nas descritas por Williams et al. (1990) com algumas modificações. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 15 µL, no qual se utilizou tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,46 mM de *primer* (oligonucleotídeos), 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de *Taq* DNA Polimerase, e 10 ng de DNA molde. As reações de RAPD foram amplificadas num 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 consistiu de um minuto de desnaturação a 94°C, um minuto e trinta segundos de anelamento a 40°C e dois minutos de extensão a 72°C.

Foram avaliados 60 *primers* do Kit *Operon (Operon Technologies Inc.)*. Para avaliar as diferentes linhagens de *O. niloticus* foram selecionados 11, os quais apresentaram adequado padrão de nitidez e reprodutibilidade. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,7%. Foram utilizados 15 µL do produto amplificado e 2 µL de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de

azul de bromofenol) em eletroforese horizontal. A eletroforese foi conduzida em 60 volts por quatro horas em uma cuba horizontal usando tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA). Foi utilizado um controle negativo para cada reação, onde sua amplificação foi executada adicionando-se todos os componentes citados anteriormente, exceto o DNA alvo. Para a revelação do gel, utilizou-se um banho de brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, por 30 minutos. Posteriormente, os géis foram fotografados usando o sistema EDAS.

### Análise Estatística

O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão *ladder* 100 pb. A presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos 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 variabilidade genética foi determinada pela porcentagem de fragmentos polimórficos (critério 95%), pela diferenciação genética ( $G_{st}$ )

(determinada através do cálculo de NEI (1978) estabelecendo-se como método de diferenciação a definição de WRIGHT (1978), onde valores entre 0,00 a 0,05; 0,05 a 0,15; 0,15 a 0,25 e > 0,25 indicam pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética) e pelo fluxo gênico o qual é equivalente ao número de emigrantes por geração ( $N_m$ ). Estas análises estatísticas, junto com a determinação da distância e identidade genética (NEI, 1973) foram determinados através do programa PopGene 1.31 (YEH et al., 1999). A significância do  $G_{st}$  foi analisada pelo teste  $X^2$ . A similaridade genética dentro de cada estoque foi obtida com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard. Foi elaborado um dendrograma da distância genética baseado em Nei (1972); pelo agrupamento UPGMA, utilizando o programa estatístico NTSYS 1.7 (ROHLF, 1989).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentadas as seqüências dos *primers*, a porcentagem das bases pirimidínicas (G e C), o número de fragmentos amplificados, seu polimorfismo e o tamanho em pares de bases (pb).

**Tabela 1.** Seqüência de nucleotídeos dos *primers*, porcentagem de bases pirimidínicas (G e C), número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para as linhagens de *Oreochromis niloticus*.

<i>Primers</i>	Seqüência nucleotídeos (5'→3')	% G e C	No. de fragmentos	No. de fragmentos polimórficos	Tamanho dos fragmentos (pb)
OPA01	CAGGCCCTTC	70	8	2	300-2000
OPA02	TGCCGAGCTG	70	10	5	400-2500
OPA03	AGTCAGCCAC	60	8	5	600-1500
OPA12	TCGGCGATAG	60	9	6	450-2500
OPA16	AGCCAGCGAA	60	7	3	200-2000
OPA20	GTTGCGATCC	60	8	4	350-2500
OPW01	CTCAGTGTCC	60	5	1	350-1100
OPW04	CAGAAGCGGA	60	6	2	500-1300
OPW08	GACTGCCTCT	60	7	1	600-1700
OPW19	CAAAGCGCTC	60	6	1	500-1400
OPX01	CTGGGCACGA	70	7	4	250-1400
TOTAL	----	----	81	34	200-2500

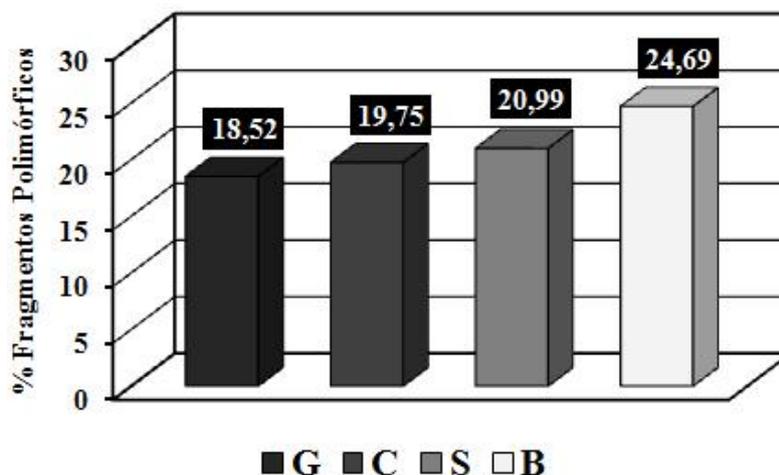
Pela análise em gel de agarose, observou-se que não ocorreu degradação do DNA e que também não houve excesso de proteína que pudesse prejudicar a amplificação. Desta forma, a extração de DNA de fragmentos de nadadeira utilizada neste trabalho mostrou-se eficiente, concordando com os resultados de Wasko et al. (2003) e Lopera-Barrero et al. (2008).

O número de fragmentos gerados por *primer* para as linhagens de *O. niloticus* variou de cinco a 10 e seu tamanho permaneceu entre 200 pb (OPA016) e 2500 pb (OPA02, OPA12 e OPA20). Dos 81 fragmentos analisados, 34 foram polimórficos (41,98%), concordando com os valores encontrados por Povh et al. (2005) para as linhagens Bouaké e Chitralada (90 fragmentos com 50% de polimorfismo). Telles et al. (2001), relatou que, para

a estimativa da diversidade genética pela técnica RAPD, o número de fragmentos obtido é mais importante do que o número de *primers* utilizados, propondo que 50 fragmentos eram suficientes para obter valores genéticos confiáveis. Isto demonstra que o número de fragmentos encontrados no presente estudo permitiu uma estimativa confiável da variabilidade genética das linhagens.

Não foram encontrados fragmentos exclusivos, discordando com o estudo realizado por Walmsley (2004), que encontrou 4,8% de fragmentos exclusivos ao analisar as linhagens Bouaké e

Chitralada. Os valores da porcentagem de fragmentos polimórficos ( $p < 0,05$ ) mostraram uma diferenciação genética entre as linhagens, sendo o maior polimorfismo apresentado pela linhagem Bouaké e o menor pela linhagem GIFT. Resultados similares foram encontrados por Walmsley (2004) que encontrou maior polimorfismo nas três linhagens Bouaké (85,7%, 85,7% e 83,3%) comparadas à Chitralada (78,6%). A porcentagem de fragmentos polimórficos das linhagens GIFT, Chitralada, Supreme e Bouaké são apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Porcentagem de fragmentos polimórficos obtidos para as linhagens GIFT (G), Chitralada (C), Supreme (S) e Bouaké (B) de *Oreochromis niloticus*.

Segundo Povh et al. (2005), o efeito fundador (variabilidade com que duas populações são constituídas), o sistema de acasalamento e o tempo de introdução da linhagem podem influenciar na variabilidade genética. Este fato foi observado por Hassanien et al. (2004), os quais encontraram valores mais altos de variabilidade genética na linhagem Chitralada quando comparada com a linhagem Bouaké. Esses resultados discordam dos observados neste estudo para a linhagem Bouaké, devido possivelmente a que os juvenis analisados são produto da participação de um grande número de reprodutores durante o acasalamento (B; 28♂x70; G: 30♂x30; C: 20♂x30; S: 10♂x30), que é uma estratégia utilizada comumente para evitar a redução da variabilidade genética (LOPERA BARRERO, 2007), pois ao aumentar o número efetivo de reprodutores ( $N_e$ ) aumenta o *pool* genético, diminuindo conseqüentemente o coeficiente de endogamia (KANG et al., 2006) e aumentando a variabilidade genética.

Embora a linhagem GIFT ter sido introduzida mais recentemente, apresentou a mais baixa variabilidade genética entre as linhagens

analisadas. Estes resultados podem ser produto de uma inadequada amostragem (coleta de amostras de indivíduos muito similares) ou de um inadequado manejo reprodutivo, porém esta última causa é descartada, pois Lupchinski Jr (2007) ao analisar as famílias de GIFT depois do manejo genético e reprodutivo realizado no Brasil, encontrou que as famílias não sofreram perda significativa de variabilidade genética. Este autor igualmente encontrou valores um pouco maiores de polimorfismo para a linhagem Bouaké (80,6%) quando comparada com a GIFT (79,2%).

Ao analisar a variabilidade genética existente dentro das linhagens estimada pela porcentagem de fragmentos polimórficos, foi observada uma baixa variabilidade intrapopulacional, sendo confirmada pelos valores de similaridade genética (G: 0,932; C: 0,903; S: 0,891 e B: 0,900) que mostraram uma baixa diferenciação genética entre seus indivíduos. Nas linhagens Chitralada e Bouaké, uma perda da variabilidade genética é esperada, pois os estoques são originários das introduções realizadas em 1996 e 1971 respectivamente, o que representa anos de

seleção e cruzamento que contribuíram para uma diminuição de variabilidade. Isto é possível já que durante o manejo reprodutivo pode existir uma seleção não intencional, a qual pode levar ao aparecimento do efeito gargalo (*bottleneck effect*) que promove o aparecimento de endogamia (AHO et al., 2006), e em consequência ocasionará uma perda de variabilidade genética e um aumento da correlação negativa entre a similaridade genética e o número de gerações (FREITAS; GALETTI JR, 2005).

A porcentagem de fragmentos polimórficos (PAIVA et al., 2006; GOMES, 2007), e a similaridade genética (RAMELLA et al., 2006; SOFIA et al., 2006;), são parâmetros que têm sido utilizados com sucesso na estimativa de níveis de

diversidade genética em diferentes estoques e em populações naturais de peixes. Neste estudo essas estimativas mostraram-se eficientes na determinação da diversidade genética das linhagens de *O. niloticus*.

A diferenciação genética entre populações ( $G_{st}$ ) foi mais elevada nas linhagens BxS e GxS, que segundo a definição de Wright (1978) apresentaram elevada diferenciação genética. As outras linhagens apresentaram alta diferenciação genética. As quatro linhagens apresentaram diferenças significativas para os valores de  $G_{st}$ . Os valores da diferenciação genética entre as linhagens ( $G_{st}$ ), a classificação de Wright (1978) e o número de migrantes por geração ( $N_m$ ) são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Diferenciação genética ( $G_{st}$ ), classificação de Wright (1978) e número de migrantes por geração ( $N_m$ ) para as linhagens GIFT (G), Chitralada (C), Supreme (S) e Bouaké (B) de *Oreochromis niloticus*.

Linhagens	$G_{st}$	Wright (1978)	$N_m$
B x G	0,231*	Alta diferenciação	1,661
B x S	0,315*	Elevada diferenciação	1,085
B x C	0,224*	Alta diferenciação	1,736
G x S	0,270*	Elevada diferenciação	1,353
G x C	0,194*	Alta diferenciação	2,082
S x C	0,208*	Alta diferenciação	1,905

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

Diversos autores têm utilizado o parâmetro da diferenciação genética ( $G_{st}$ ) para analisar a diversidade genética de populações de peixes. Leuzzi et al. (2004), quando analisaram a espécie *Astyanax altiparanae* em diversas regiões do rio Paranapanema, encontraram alta diferenciação para a região inferior em relação à média (0,281), da inferior em relação à superior (0,291), valores moderados para as quatro populações do reservatório de Capivara (0,090 a 0,139) e para a região média em relação à superior (0,090), o que segundo os autores demonstrou diferentes estruturas genéticas. Almeida et al. (2003) encontraram moderada diferenciação genética para as populações de *Pimelodus maculatus* do rio Tietê, com valores de  $G_{st}$  de 0,072 a 0,104. Os valores para as linhagens de *O. niloticus* analisadas neste estudo variaram de 0,194 a 0,315, o que indica que entre as linhagens existe uma alta heterogeneidade genética, resultados similares a pesquisas realizadas por outros autores para *O. niloticus* (POVH et al., 2005; LUPCHINSKI JR, 2007).

Os valores de fluxo gênico ( $N_m$ ) mostraram as linhagens BxS como as mais divergentes, e as linhagens GxC as mais semelhantes. Apesar disso, os valores encontrados são concluintes para determinar que as linhagens se comportam como

unidades evolucionárias independentes, mantendo o antagonismo com os valores de  $G_{st}$  como relatado por Alam e Islam (2005). Desta forma, os resultados para a estimativa do  $N_m$  refletiram os resultados da análise da diferenciação genética de Nei, representada pelo parâmetro  $G_{st}$ .

Os valores de  $G_{st}$  (0,194) e  $N_m$  (2,082) demonstraram uma relação mais estreita entre a linhagem Chitralada em relação à GIFT. Esta relação é demonstrada mais claramente nos valores encontrados de distância e identidade genética (Tabela 3).

Esses resultados podem ser explicados pela origem das linhagens. A Chitralada foi importada da Tailândia e passou por várias gerações de cultivo e domesticação, ou seja, é uma linhagem comercial desenvolvida na Ásia (KUBITZA, 2000). A linhagem GIFT foi formada da mistura de oito linhagens entre as quais se encontram quatro linhagens comerciais asiáticas (GUPTA; ACOSTA, 2004) e a linhagem Bouaké foi importada da Costa do Marfim (África) em 1971 (CASTAGNOLLI, 1992). A linhagem Supreme foi introduzida em 2002 a partir de bases genéticas de outras linhagens (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2003).

Fica claro que, por motivos geográficos, justifica-se a maior diferenciação genética da

linhagem Bouaké em relação às outras linhagens, assim como o menor grau de similaridade genética entre a linhagem BxG e GxS, para as quais se encontrou um alto valor de diferenciação genética ( $G_{st} = 0,231$  e  $0,270$ ) e um menor valor de fluxo

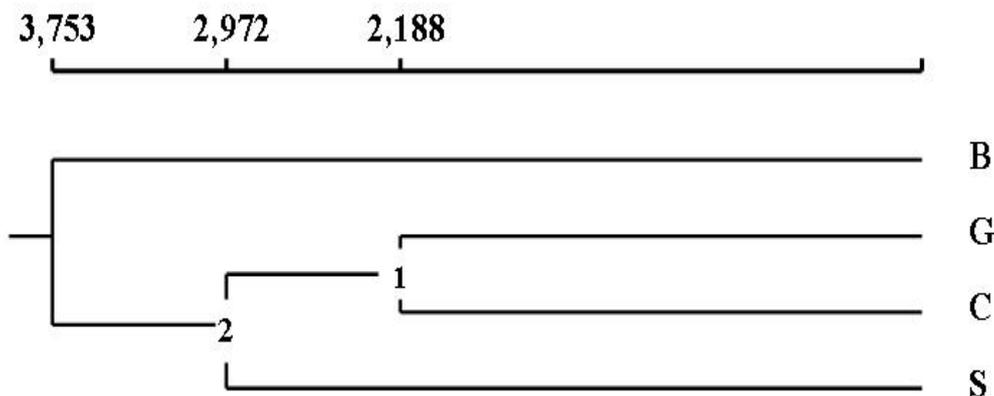
gênico ( $N_m = 1,661$  e  $1,353$ ), pois teoricamente estas linhagens tiveram uma menor probabilidade de se relacionar reprodutivamente. As linhagens BxS apresentaram o menor grau de similaridade ( $G_{st} = 0,315$ ).

**Tabela 3.** Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (embaixo da diagonal) para as linhagens GIFT (G), Chitralada (C), Supreme (S) e Bouaké (B) de *Oreochromis niloticus*.

Linhagens	G	C	S	B
G	----	0,957	0,932	0,9381
C	0,044	----	0,953	0,942
S	0,070	0,049	----	0,904
B	0,064	0,060	0,101	----

No dendrograma observa-se que as linhagens Chitralada e GIFT apresentam maior proximidade genética e a linhagem Bouaké apresenta a maior distância genética das demais. Isso demonstra a possibilidade de se obter maior variação genética

quando esta linhagem (Bouaké) for cruzada com as demais, pressupondo o aumento da variabilidade genética de futuros cruzamentos, como se pode observar no dendrograma (Figura 2).



**Figura 2.** Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1972), obtido pelo Método UPGMA, para as linhagens GIFT (G), Chitralada (C), Supreme (S) e Bouaké (B) de *Oreochromis niloticus*.

Com os resultados obtidos neste estudo foi possível obter um perfil genético dos juvenis destas quatro linhagens. A correta identificação de linhagens pode servir como ferramenta para o estabelecimento das bases da seleção, visando os cruzamentos direcionados que podem aumentar a variabilidade genética e explorar positivamente o efeito da heterose (MATHER, 2001).

A melhoria da qualidade genética do *O. niloticus* é fundamental para assegurar o futuro da tilapicultura, inclusive no Brasil (LI et al. 2006). Para isso, o marcador molecular RAPD foi eficaz e ofereceu bons resultados.

## CONCLUSÕES

Foi encontrada uma alta variabilidade genética entre as linhagens e uma baixa diferenciação genética dentro de cada linhagem.

A linhagem Bouaké apresentou maior distância genética em relação às demais linhagens e foi observado um menor grau de similaridade genética entre as linhagens Bouaké x GIFT e GIFT x Supreme. Houve uma baixa similaridade genética entre as linhagens Bouaké e Supreme.

O marcador RAPD foi eficaz para caracterizar geneticamente as linhagens de *Oreochromis niloticus*.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação 25 de Julho, UEM, Geneforte e Caunesp, por ceder os alevinos de tilápia. À Mogiana Alimentos pela doação da ração e ao Caunesp, por disponibilizar as estruturas e os equipamentos para o crescimento dos peixes. Aos professores, estudantes e estagiários do laboratório de Genética de Peixes do Grupo de Pesquisa

PeixeGen - DZO (UEM) pelo valioso auxílio nas diversas etapas deste trabalho. Ao CNPq (Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de estudo.

---

**ABSTRACT:** The aim of this study was to analyze the genetic diversity of four Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains using the RAPD marker. Fin samples of GIFT (G), Chitralada (C), Supreme (S) and Bouaké (B) juvenile stocks have been collected. The 11 primers used yielded 81 fragments of which 41.98% were polymorphic. The percentage of polymorphic loci (G: 18.52%; C: 19.75%; S: 20.99% and B: 24.79%) showed that there was a genetic differentiation among the strains, showing the  $G_{st}$  values a high (BxG: 0.231; BxC: 0.224; GxC: 0.194 and SxC: 0.208) and elevated (BxS: 0.315 and GxS: 0.270) differentiation. The highest gene flow ( $N_m$ ) was among the GxC (2.082) strains. The distance and genetic identity values (0.044 and 0.957 respectively) and the dendrogram indicate that the GxC is the most genetically similar strains. The genetic similarity was high among of the strains (G: 0,932; C: 0,903; S: 0,891 AND B: 0.900). These results will enable a correct reproductive and genetic strains management.

**KEYWORDS:** Bouaké. Chitralada. Genetic variability. GIFT. Supreme. Tilapia.

---

## REFERÊNCIAS

AHO, T.; RÖNN, J.; PIIRONEN, J.; BJÖRKLUND, M. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 253, n. 1-4, p. 244-248, 2006.

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.

ALI, B. A.; HUANG, T. H.; QIN, D. N.; WANG, X. M. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 14, n. 4, p. 443-453, 2004.

ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiete and Paranapanema rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 301-305, 2003.

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). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 435-445, 2000.

ASTOLPHI, José Luís de Lima. **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. 39 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

BARDAKCI, F. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in sex discrimination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Turkish Journal of Biology**, Kavaklidere, v. 24, n. 1, p. 169-175, 2000.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189 p.

CEPOLLARO, F.; COLOMBO, L. Optimization of semi-automated microsatellite and AFLP analysis for marker-assisted selection in tilapia breeding programs. In: WORLD AQUACULTURE SOCIETY SYMPOSIUM, 2003, Salvador. **Anais...** Salvador: World Aquaculture Society, 2003. p. 169.

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. 533 p.

- FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21 century. In: FITZSIMMONS, K.; CARVALHO FILHO, J. (Ed.). **Proceedings from the fifth international symposium on tilapia aquaculture**. Rio de Janeiro: Panorama da Aqüicultura, 2000. p. 3-8.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Regional review on aquaculture development 1. Latin America and the Caribbean**. Rome: FAO Information Division, 2005.
- FREITAS, P. D.; GALETTI JR, P. M. Assessment of the genetic diversity in five generations of commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 4, n. 12, p. 1362-1367, 2005.
- GOMES, Patrícia Cristina. **Diversidade genética de três populações de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando marcadores moleculares**. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- GUPTA, M. V.; ACOSTA, B. O. From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. **NAGA - Worldfish Center Quarterly**, Penang, v. 27, n. 2-3, p. 4-14, 2004.
- HASSANIEN, H. A.; ELNADY, M.; OBEIDA, A.; ITRIBY, H. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 587-593, 2004.
- KANG, J. H.; NOH, J. K.; KIM, J. H.; LEE, J. H.; KIM, H. C.; KIM, K. K.; KIM, B. S.; LEE, W. J. Genetic relationship between broodstocks of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) using microsatellite markers. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 37, n. 7, p. 701-707, 2006.
- KOCHER, T. D.; LEE, W. J.; SOBOLEWSKA, H.; PENMAN, D.; McANDREW, B. Genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics**, Ottawa, v. 148, n. 3, p. 1225-1232, 1998.
- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 1. ed. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 287 p.
- LEUZZI, M. S. P.; ALMEIDA, F. S.; ORSI, M. L.; SODRÉ, L. M. K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 355-362, 2004.
- LI, S. F.; HE, X. J.; HU, G. C.; CAI, W. Q.; DENG, X. W.; ZHOU, P. Y. Improving growth performance and caudal fin stripe pattern in selected F6-F8 generations of gift Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection. **Aquaculture research**, Oxford, v. 37, n. 12, p. 1165-1171, 2006.
- LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 238, n. 1-4, p. 1-37, 2004.
- LOPERA BARRERO, Nelson Mauricio. **Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural**. 2007. 92 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- LOPERA-BARRERO, N. M.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; GOMES, P. C.; JACOMETO, C. B.; LOPES, T. S. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 35, n. 1, p. 77-86, 2008.
- 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, 2000. p. 133-140.

- LUPCHINSKI JR, E. **Avaliação da composição genética de linhagens de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e das gerações G<sub>0</sub> e F<sub>1</sub> da linhagem GIFT**. 2007. 76 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- MATHER, P. B. Overview of fish genetics research at Queensland University of Technology. 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, 2001. p. 133-139.
- MELO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; RIBEIRO, L. P.; TEIXEIRA, C. S.; SOUZA, A. B.; COELHO, E. G. A.; CREPALDI, D. V.; TEIXEIRA, E. A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 87-93, 2006.
- MOREIRA, H. L. M. **Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélite**. 1999. 82 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Nature**, Chicago, v. 106, n. 949, p. 283-292, 1972.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Baltimore, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.
- PAIVA, S. R.; DERGAM, J. A.; MACHADO, F. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). **Hydrobiologia**, Den Haag, v. 560, n. 1, p. 393-404, 2006.
- POVH J. A.; MOREIRA, H. L. M.; RIBEIRO, R. P.; PRIOLI, A. P.; VARGAS, L.; BLANCK, D. V.; GASPARINO, E.; STREIT JR, D. P. Estimativa da variabilidade genética em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.
- RAMELLA, M. S.; KROTH, M. A.; MEURER, S.; NUÑER, A. P. DE O.; ZANIBONI FILHO, E.; ARISI, A. C. M. Genetic Variability in four fish species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. **Brazilian Archives of Biology and technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 589-598, 2006.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York, Exeter Publishers, 1989. 191 p.
- ROMANA-EGUIA, M. R. R.; IKEDA, M.; BASIAO, Z. U.; TANIGUCHI, N. 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.
- SOFIA, S. H.; SILVA, C. R. M.; GALINDO, B. A.; ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; MARTINEZ, C. B. R. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. **Hydrobiologia**, Den Haag, v. 553, n. 1, p. 245-254, 2006.
- TELLES, M. P. C.; MONTEIRO, M. S. R.; RODRIGUES, F. M.; SOARES, T. N.; RESENDE, L. V.; AMARAL, A. G.; MARRA, P. R. Marcadores RAPD na análise de divergência genética entre raças de bovinos e número de *locos* necessários para a estabilidade da divergência estimada. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 87-95, 2001.

VIEIRA, V. P.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; MOREIRA, H. L. M.; POVH, J. A.; LOPERA BARRERO, N. M. Avaliação da variabilidade genética de linhagens de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com o uso de marcador de RAPD. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 3, n. 3, 41-49, 2005.

WALMSLEY, Sandra Menezes. **Identificação dos estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de marcadores moleculares**. 2004. 113 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura - Centro de Aqüicultura) – Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Nondestructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. **Hereditas**, Oxford, v. 138, n. 3, p. 161-165, 2003.

WILLIAMS, J. G. K.; RAFALSKI, J. A.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of population**. University of Chicago Press, Chicago, 1978. 580 p.

YEH, F. C.; BOYLE, T. Y. Z.; XIYAN, J. M. **PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research, Alberta, 1999. 29 p.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. **Tilapicultura intensiva**. In: \_\_\_\_\_. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 9, p. 239-266.