

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP –
CAUNESP

**Identificação de estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)
através do uso de marcadores moleculares**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Aqüicultura para obtenção
de título de Doutor em Aqüicultura – Área
de Concentração em Aqüicultura

Sandra Menezes Walmsley

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Jaboticabal
2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP –
CAUNESP

**Identificação de estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)
através do uso de marcadores moleculares**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Aqüicultura para obtenção
de título de Doutor em Aqüicultura – Área
de Concentração em Aqüicultura

Sandra Menezes Walmsley

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Jaboticabal
2004

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Fausto Foresti, que acreditou, investiu e incentivou meu trabalho, com paciência e compreensão com minha situação de pós-graduanda em São Paulo e docente no Paraná.

Aos meus co-orientadores, os Profs. Drs. Claudio Oliveira, Newton Castagnolli e Roberto Gomes da Silva, por todo apoio ao longo destes anos, acreditando no projeto desde a sua elaboração conjunta.

À equipe de trabalho do laboratório de Genética Molecular do Instituto de Biociências da UNESP, em especial a Fábio Porto Foresti e Renato Devidé pela ajuda na coleta de amostras, a Zootecnista Cláudia Haru Suganuma pelo processamento de amostras e organização de dados.

Aos amigos do CAUNESP, em especial a Veralice Cappatto, pelo trabalho abnegado e eficiente, e principalmente pela amizade preciosa.

A todos os professores que tive no CAUNESP, que além de conhecimento, também souberam deixar conosco seu exemplo, em especial ao Prof. Dr. Wagner C. Valenti, que não será esquecido por nenhum de seus ex-alunos.

À amiga Cleide Martins pela cessão de bibliografia especializada e revisão cuidadosa do texto da revisão literária.

Aos amigos da UNIOESTE, professores, alunos, ex-alunos e funcionários, pela compreensão e solidariedade com as minhas obrigações de pós-graduanda, em especial aos membros do GEMAq, aos meus orientados e ex-orientados, a Josemar Raimundo da Silva, que me incentivou a recomeçar diante da perda de muito de trabalho junto com um *harddisk*, a Lucy Barbieri e a Élio Diniz.

À minha família, pela ajuda em cada passo que dei em direção à realização profissional, desde a pré-escola até hoje.

Àqueles que me ajudaram e incentivaram na superação de cada um dos obstáculos. Que Deus lhes abençoe e agracie, cercando-os de pessoas tão boas como eles mesmos.

Àqueles que se esforçaram por dificultar minha jornada, pelo fortalecimento que veio da superação dos obstáculos interpostos e pelo crescimento que veio da experiência de levantar-me, sacudir a poeira e dar a volta por cima tantas vezes quantas foi necessário.

Resumo

Este trabalho apresenta os problemas relacionados à implantação de um programa de melhoramento genético das tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) a partir de linhagens importadas para o Brasil, e uma contribuição no sentido de superá-los. Uma revisão de literatura é apresentada, onde são discutidos aspectos genéticos da formação dos estoques nacionais e as dificuldades que este processo gera para o melhoramento genético, as possibilidades oferecidas pela genética molecular para superá-las, os princípios de funcionamento da seleção assistida por marcadores moleculares (MAS) de DNA e do uso dos marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), para subsidiar uma recomendação de procedimentos gerais para a formação de banco genético da espécie e condução de programas de MAS com a espécie. Os dois capítulos seguintes apresentam contribuições para este objetivo, na forma de artigo científico. A primeira delas tem objetivo de investigar o potencial genético de quatro linhagens comerciais provenientes de diferentes estoques cultivados no país, para fins de formação de plantel híbrido intraespecífico a ser utilizado em programa de melhoramento genético. O objetivo da segunda é investigar a viabilidade técnica da utilização de dois índices de forma do corpo, como fenótipos correlacionados ao rendimento de filé para programa de melhoramento genético.

Abstract

This work presents the main problems related to the implantation of a genetic improvement program of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) based on imported strains to Brazil and a contribution in order to overcome them. An overview is provided on the formation of national lineages, the difficulties brought by this process to genetic improvement, the possibilities offered by molecular genetic to overcome them, the DNA markers assisted selection (MAS), and the use of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers in this process. A series of recommendation of general procedures for the formation of genetic bank and conduction of the MAS program for such species. The two following chapters present contributions of these objectives in a scientific paper form. The first one intends to investigate the genetic potential of four commercial strains proceeding from different stocks in Brazil in order to form an intra-specific hybrid plantel used in a genetic improvement program. The second one investigates the technical viability in the application of two body form indexes as correlated phenotypes to the fillet and carcass yield in a genetic improvement program.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	3
3- REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1- FATORES IMPORTANTES PARA O SUCESSO DE UM PROGRAMA DE SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES	18
3.2- A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES RAPD NA SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES	23
3.3- AS LINHAGENS DE TILÁPIAS NILÓTICAS CULTIVADAS NO PAÍS	34
3.4- SUBSÍDIO À CONSTRUÇÃO DE UM PROGRAMA DE SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES PARA AS TILÁPIAS NILÓTICAS DO BRASIL	36
3.4.1- A SELEÇÃO DE CARACTERÍSTICAS PARA MELHORAMENTO E ANÁLISE DE LIGAÇÃO	40
3.4.2- A CONDUÇÃO DOS PROGRAMAS DE SELEÇÃO PARA CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS	42
3.4.3- O FLUXOGRAMA DO PROCESSO	44
4 – PERSPECTIVAS PARA O MELHORAMENTO DE TILÁPIAS (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>) A PARTIR DA COMBINAÇÃO DE LINHAGENS. I - VARIABILIDADE GENÉTICA	45
RESUMO	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAIS E MÉTODOS	48
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO	55
5 – PERSPECTIVAS PARA O MELHORAMENTO DE TILÁPIAS (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>) A PARTIR DA COMBINAÇÃO DE LINHAGENS. II – FORMA DO CORPO	64
RESUMO	65
INTRODUÇÃO	66
MATERIAIS E MÉTODOS	68
RESULTADOS	70
DISCUSSÃO	75
6- DISCUSSÃO GERAL	85
7 – CONCLUSÕES	87
8 – Referências	88

1- Introdução

As tilápias cultivadas no Brasil são animais exóticos, importados oficialmente de diferentes locais do continente africano, em dois momentos. A primeira importação oficial aconteceu em 1971, proveniente de Bouaké, na Costa do Marfim (Nugent, 1988). A segunda é originária da Alexandria, no Egito. Essa linhagem foi inicialmente introduzida no Japão, de lá foi transferida para a Tailândia e, em 1996, foi trazida para o Brasil (Zimmermann, 1999).

Dos locais que receberam as importações, estes peixes foram introduzidos em açudes, estações de piscicultura e piscigranjas particulares sem registros sistemáticos ou precauções uniformizadas para a preservação da variabilidade genética original da população importada. Existe evidência de que esta situação tenha causado estreitamento de base genética e desvios de frequência de heterozigotos em relação às esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em vários estoques (Moreira et al., 2000).

Este estreitamento de heterozigose diminui o potencial de cada uma das linhagens, tomada em separado, para programas de seleção genética. A resposta à seleção genética é limitada pelo nível de variação genética (Falconer & MacKay, 1996). Uma estratégia para contornar este problema é a formação de estoques híbridos intraespecíficos que recuperem a perda de alelos pelas linhagens fundadoras em seus processos de deriva e seleção diferenciais.

A primeira providência a ser tomada na implantação de um programa de melhoramento genético de tilápias no Brasil é verificar a variabilidade genética dos estoques disponíveis, a fim de selecionar aqueles que efetivamente possam contribuir com a formação de um estoque híbrido intraespecífico com base genética suficientemente ampla para tal objetivo. Vandeputte (2003) aponta a variabilidade genotípica como pré-requisito para um programa de seleção efetivo. Este passo independe das características de interesse para as quais se deseja obter melhoramento. A partir desta escolha, uma série de procedimentos deve ser tomada para a manutenção destes estoques como banco genético

para quaisquer subprogramas de melhoramento direcionados à uma ou mais características zootécnicas de interesse.

Também são fatores importantes para a eficiência do processo de seleção a variabilidade da característica fenotípica a ser melhorada (Gjøem & Bentsen, 1997). O ganho genético potencial por geração é proporcional à variabilidade da característica e a sua herdabilidade. De modo também importante, a característica precisa exibir variação genética aditiva e não possuir correlação genética desvantajosa com outros fenótipos importantes (Falconer & Mackay, 1996).

É necessário aferir, em um primeiro momento, a variabilidade da característica desejada dentro do banco genético disponível. Se for detectada variação considerável entre os indivíduos, um grupo de reprodutores é selecionado com base em seus fenótipos e inicia-se um teste de progênie, para aferir a herdabilidade deste fenótipo. Se o valor obtido de herdabilidade for considerável, significa que a característica é majoritariamente controlada geneticamente, e é possível obter ganho genético por seleção a cada geração.

Uma importante ferramenta nos programas de seleção genética são os marcadores moleculares. Quando eles são utilizados como fenótipos de escolha de reprodutores, a seleção é denominada MAS (Marker Assisted Selection). A aplicação da MAS aos programas de melhoramento genético requer associações entre genótipos, representados por marcadores moleculares, e os correspondentes valores de fenótipos desejados. Essas associações devem existir porque os *loci* marcadores são ligados aos *loci* controladores das características quantitativas (QTLs) (Ferguson & Danzmann, 1999). Os indivíduos são escolhidos como reprodutores, uma vez que se detecte que os marcadores que eles possuem estão associados com desempenho superior relativo aos genótipos apresentados por outros membros de sua linhagem.

Este trabalho é uma contribuição ao processo de implantação de estoque híbrido intraespecífico de tilápias e de programas de melhoramento genético assistido por marcadores moleculares, para aspectos morfométricos potencialmente relacionados ao rendimento de filé e carcaça na espécie.

2- Objetivos

Os objetivos deste trabalho são: estabelecer os procedimentos gerais para a implantação de programa de seleção genética assistida por marcadores moleculares a partir de dados literários; investigar o potencial genético de quatro linhagens comerciais provenientes de diferentes estoques cultivados no país para fins de formação de plantel híbrido intraespecífico a ser utilizado em programa de melhoramento genético; e investigar a viabilidade técnica da utilização de dois índices de forma do corpo, como fenótipos correlacionados ao rendimento de filé para programa de melhoramento genético.

3- Revisão de literatura

As tilápias são peixes de hábito lêntico, que tendem a formar subpopulações em lagoas, lagos e remansos de bacias hidrográficas onde ocorrem naturalmente. Isso contribui para efeitos de deriva genética diferencial entre grupos relativamente isolados reprodutivamente, ainda que geograficamente próximos entre si e ocorrentes na mesma bacia hidrográfica.

Hassanien et al. (2004) mostrou que a diferenciação genética se dá entre populações bastante próximas de peixes de mesma bacia. Eles utilizaram marcadores RAPD e verificaram que *O. niloticus* de lagos do Delta do Nilo apresentaram menor variabilidade que populações do próprio rio Nilo, ocorrentes mais a jusante do Delta (Cairo, Assuit e Qena).

Trewavas (1983) descreveu sete subespécies africanas de *Oreochromis niloticus*, baseando-se em características morfométricas. Fuerst et al. (2000) estudaram a variabilidade genética de tilápias do complexo lacustre que compreende os lagos Vitória, Albert, Edward e Kyoga, no leste da África, onde várias introduções de *O. niloticus* ocorreram entre 1900 e 1960 de diferentes procedências. Os resultados obtidos com o uso de 10 loci microssatélites corroboraram a estrutura genética já investigada anteriormente pelo uso de marcadores RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA (Fuerst et al., 1997

apud Fuerst et al., 2000), composta de várias populações diferenciadas ocorrentes em um mesmo lago ou em lagos interligados.

A deriva genética acontece por fatores aleatórios, não ligados a vantagens adaptativas dos animais. Quanto menor for o número de reprodutores, maior será a probabilidade de que a geração seguinte possua diferenças de frequência gênica e/ou ocorrência de alelos em relação à anterior (Falconer & MacKay, 1996). Em ambiente natural, pode ocorrer por segregação reprodutiva etológica, separação física de populações por fenômenos geomorfológicos e/ou mortalidade massiva, causadas por condições ambientais anormais agudas.

A deriva é provavelmente a causa da diferenciação genética entre populações que originaram estoques fundadores de diferentes espécies para fins de cultivo em países onde essas não são nativas. Também pode ocorrer o fenômeno da deriva, se um número reduzido de indivíduos for capturado dos estoques originais para a exportação, ou se houver uma considerável mortalidade no transporte ou durante o período de quarentena no país de destino. Este processo pode causar o decréscimo da diversidade genética por efeitos de gargalo (Iguchi et al. 1999). Quanto menor for o número de indivíduos do estoque fundador, maior é a probabilidade de que o(s) alelo(s) menos freqüente(s) esteja(m) ausente(s) nos indivíduos da amostra, reduzindo a variabilidade genética em relação à população original.

A deriva também pode atuar dentro de um estoque já estabelecido, quando as práticas de manejo reprodutivo resultam na utilização de poucos reprodutores por ciclo, ou a utilização continuada dos mesmos animais a cada ciclo reprodutivo, independentemente do número disponível deles na piscicultura. Também são causas de deriva genética a ocorrência de mortalidade total em viveiro(s) de uma propriedade, eliminado do estoque reprodutor em formação para o ciclo seguinte, as proles estocadas nesta(s) unidade(s) produtiva(s). Entre as causas mais comuns de mortalidade total em um viveiro estão os acidentes ou falhas de manejo causadores de anoxia noturna, como erros de manejo alimentar, de estratégias de administração de fertilizantes e cal e ocorrência de *blooms*,

além de cortes prolongados de energia elétrica nas pisciculturas intensivas, dependentes de aeração mecânica.

Em vários países onde as tilápias são animais exóticos introduzidos para fins de cultivo comercial, os estoques foram estabelecidos há poucas décadas com números desconhecidos de exemplares. Esses estoques provêm de diferentes populações e têm sido cultivados em pisciculturas que utilizam diferentes práticas de manejo e níveis de intensificação. Os locais de cultivo apresentam diferenças climáticas pronunciadas entre si, como a amplitude de variação térmica nictemeral e sazonal. Esta combinação de fatores leva à seleção de diferentes genótipos, produzindo diferenciação entre linhagens cativas.

Kocher et al. (1998) consideram que os estoques comerciais de tilápias têm sido manejados de maneira pouco apropriada e deficiente, por três motivos principais. O primeiro é o efeito de gargalo (deriva genética). O segundo é a introgressão de genes entre as espécies utilizadas em programas de obtenção de proles monosexuais por hibridação (McAndrew, 1993 apud Kocher et al., 1998), e o terceiro motivo é a depressão endogâmica encontrada na maioria dos estoques existentes (Eknath et al., 1993 apud Kocher et al., 1993).

A seleção genética é um fator que atua onde a população enfrenta condições limítrofes de tolerância, às quais sobrevivem apenas aqueles animais cujo patrimônio genético lhes confira mecanismos de adaptação a condições adversas (Falconer & MacKay, 1996). Podem gerar seleção genética as situações agudas que resultem em mortalidade massiva, mas não total, em unidades produtivas.

A migração é a contribuição de indivíduos de outras populações para o genoma original, causando introgressão genética (Falconer & MacKay, 1996). Ela pode acontecer em pisciculturas comerciais quando há novas introduções de indivíduos a partir de outras linhagens cultivadas ou de novas importações.

Em uma espécie qualquer, os fenômenos de deriva, seleção, migração, ocorrência de alelos nulos e acasalamentos não aleatórios resultam em desvios das proporções entre

alelos que seriam esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Beaumont & Hoare, 2003). Os alelos nulos não influenciam de fato a frequência gênica, mas sim a sua aferição.

Gonçalves (1993) verificou a existência de comportamento de hierarquia de dominância reprodutiva entre tilápias do Nilo. Fêmeas dominantes são cortejadas e desovam antes das demais. Todavia, este padrão social não impede as fêmeas submissas de desovar após a(s) dominante(s). Os machos dominantes são os que nidificam, mas os submissos também espermiam nas proximidades do ninho durante a desova. Estas são indicações de que, embora exista um comportamento de corte não aleatório, gametas de reprodutores de qualquer nível hierárquico contribuem para a geração subsequente. Por este motivo, para efeitos genéticos, os acasalamentos podem ser considerados como aleatórios na espécie, restando como principais efeitos genéticos causadores de desvios da proporção de alelos entre linhagens de *O. niloticus* a deriva, a seleção e a migração.

A deriva genética atua diferencialmente sobre diferentes estoques aquícolas, gerando linhagens que se apresentam como grupos genéticos distintos entre si. A seleção genética, por sua vez, gera plantéis mais adaptados a situações específicas de cultivo, como a tolerância a características geoclimáticas regionais, o desempenho reprodutivo em esquemas de manejo aquícola diferenciados, e/ou resistência a patógenos de ocorrência ou virulência localmente diferenciadas. Deriva e seleção resultam em restrição da variabilidade genética dentro das linhagens cultivadas. A migração, por outro lado, pode funcionar como um mecanismo de ampliação da variabilidade, quando os animais somados ao plantel possuam patrimônio genético diferenciado dele (Vandeputte, 2003).

A variabilidade genética em organismos diplóides é a base da heterozigose e da flexibilidade fisiológica individual devida à heterose. Em todos os organismos ela é a base da diversidade genética e do potencial evolutivo (Borowsky, 2001). A variabilidade intraespecífica, tanto entre diferentes linhagens quanto dentro de cada linhagem, tem se tornado um aspecto chave em estudos de biologia populacional, ecologia e aquicultura.

Quando ações antrópicas ou fenômenos geoclimáticos eliminam barreiras físicas entre duas ou mais linhagens, ocorre reprodução entre indivíduos delas e os descendentes

gerados apresentam uma ampliação de variabilidade, pela combinação de alelos de *pools* gênicos distintos. Estes descendentes geralmente apresentam maior adaptabilidade e freqüentemente melhor desempenho zootécnico. A este fenômeno chamamos heterose positiva ou vigor híbrido.

A heterose é provavelmente causada pelo aumento do número de *loci* direcionalmente dominantes e/ou por redução de homozigose em *loci* recessivos deletérios (Falconer & MacKay, 1996). Esta relação é corroborada pela teoria de que um aumento da heterozigose diminui a probabilidade de redução de características relacionadas à aptidão individual (*fitness*) e indica a importância da heterozigose, que está inversamente relacionada ao coeficiente de endogamia e à depressão endogâmica (Shikano & Taniguchi, 2002).

A resposta à seleção genética é limitada pelo nível de variação genética (Falconer & Mackay, 1996). Uma importante diferença entre peixes e animais terrestres para o melhoramento genético é a de que os peixes têm maiores níveis de variação genética, e, portanto mais alcance para seleção do que a maioria dos mamíferos ou aves (Foresti, 2000). No entanto, a implantação de programas de melhoramento a partir de uma única linhagem cativa pode ser prejudicada pela sua própria restrição de variabilidade genética. Uma estratégia para contornar este problema é a formação de estoques híbridos intraespecíficos que recuperem a perda de alelos pelas linhagens fundadoras em seus processos diferenciais de deriva e seleção.

Shikano & Taniguchi (2002) demonstraram a importância da hibridação intraespecífica no desempenho zootécnico de populações cativas de peixes, utilizando como modelo populações de guppies (*Poecilia reticulata*). Eles verificaram que os descendentes que apresentaram maior efeito heterótico eram os produtos de cruzamento entre as linhagens que demonstravam as maiores distâncias e dissimilaridades genéticas entre si. A análise de regressão mostrou um aumento de 5,3% no efeito heterótico para cada 10% de distância genética e de 18,7% a cada 10% de aumento da dissimilaridade genética.

A implementação de métodos de identificação confiáveis e melhores técnicas de manejo de reprodutores poderiam então ajudar a manter e aumentar a produtividade dos estoques de tilápia. Isto poderia ser obtido com o uso de marcadores genéticos, uma vez que sejam conhecidos seus modos de transmissão (Appleyard & Mather, 2000). Neste sentido, vários trabalhos já têm sido realizados, com o uso de marcadores RAPD para a identificação de linhagens e espécies de tilápias (Bardacki & Skibinsky, 1994; Naish et al., 1995; Dinesh et al., 1996).

A aplicação de um regime de seleção organizado e intensivo a qualquer espécie cultivável de peixe deve produzir maiores ganhos que os obtidos na piscicultura tradicional (Jackson et al., 2003). Tal regime de seleção deverá incorporar instrumental de MAS, que ocorre quando se verifica correlação entre a ocorrência de bandas específicas com uma manifestação fenotípica de interesse. Esta ferramenta é particularmente útil quando a característica desejada é do tipo contínuo ou quantitativo (QTL), dependente de mais de um gene ou bloco de genes. Os reprodutores podem ser precocemente selecionados pela presença da(s) banda(s) ligada(s) à QTL's, independentemente de sua manifestação fenotípica, em programas de melhoramento genético (Moore et al., 1999). Os marcadores de DNA que demonstrarem ser geneticamente ligados a uma característica de interesse, podem ser também usados para a clonagem gênica e diagnóstico médico (Tanksley et al., 1989; Williams et al., 1990). Na MAS se procura aumentar a frequência gênica de marcadores que estejam ligados a genes ou bloco de genes responsáveis por características de interesse, utilizando-se da seleção de indivíduos portadores destes alelos. Por outro lado, também é possível tentar eliminar do grupo selecionado os indivíduos portadores de marcadores moleculares ligados a características patológicas e/ou indesejáveis por qualquer motivo. Como instrumental da MAS, os marcadores moleculares podem ser utilizados tanto para a determinação de parentais (como requisito à atribuição de efeitos maternos, paternos ou de interação de parentais pelos modelos matemáticos), como para a verificação de correlação entre sua ocorrência e a de uma característica desejável.

Os marcadores moleculares podem ser utilizados para quantificar a heterozigose geral individual ou populacional, possibilitando a predição da média e variância da heterose advinda da combinação de linhagens (Shikano e Taniguchi, 2002). Embora a correlação entre diversidade de marcadores moleculares anônimos não flanqueados por seqüências únicas tenha sido recentemente questionada (Reed & Frankham, 2001), os próprios autores questionadores reconhecem haver uma correlação entre a diversidade molecular e a variância fenotípica (Jackson et al., 2003).

Operacionalmente, os marcadores oferecem a possibilidade de geração de padrão individual de bandas obtidas a partir do DNA do espécime. Este padrão é utilizado em estudos ecológicos de marcação e recaptura, e possibilita delineamentos experimentais de cultivo comunal de indivíduos de diferentes *pools* genéticos, excluindo os efeitos ambientais como fonte de variação.

Agrupando dados moleculares individuais por OTUs (Operational Taxonomic Units - unidades taxonômicas operacionais: populações, espécies ou táxons superiores) é possível estabelecer marcadores OTU específicos, quantificar a variabilidade genética por OTU, aferir distâncias genéticas entre OTUs.

O tratamento estatístico dos dados obtidos com marcadores moleculares tem instrumentado estudos de ecologia populacional e comportamental, indo da avaliação genética de parentesco e sistemas de reprodução a explorações profundas da história filogeográfica e demográfica (Avice, 1994; Pearse et al., 2001); e de monitoramento de endogamia em populações selvagens e estoques fundadores de reprodutores (Davis & DeNise, 1998). Variações temporais de freqüência de marcadores moleculares de OTUs fornecem dados para estudos de deriva genética populacional, que é o conjunto de mudanças genéticas causadas por fenômenos aleatórios não relacionados à seleção (Jonsson & Jonsson, 2001). É possível inclusive estabelecer hipóteses sobre diferenças temporais de áreas de ocorrência e/ou verificar a existência de translocações de OTUs.

Wasko & Galetti Jr. (2002) puderam estabelecer, baseados em dados de RAPD, um modelo de diferenciação genética causada por migração reprodutiva de populações

simpátricas de *Brycon lundii* do rio São Francisco em direção a afluentes distintos, sendo a rota migratória de um dos grupos interrompido pela hidrelétrica de Três Marias.

Baseados em dados de RAPD, Oliveira et al. (2002) puderam confirmar o efeito da construção da barragem de Itaipu sobre a dispersão da espécie *Steindachnerina insculpta*, antes ocorrente apenas a jusante de Sete Quedas. Após a inundação deste obstáculo natural, a espécie passou a ser capturada mais a montante da bacia do Paraná, em simpatria com as outras três espécies do gênero.

Dados obtidos com a utilização de marcadores moleculares demonstraram a ocorrência de fluxo gênico entre populações de *Astyanax altiparanae* do Rio Iguaçu e do Alto Paraná (Prioli et al., 2002). Como não é concebível que estes lambaris tenham migrado rio acima por sobre as Cataratas do Iguaçu, os autores puderam inferir que a espécie não é endêmica e que muito provavelmente foi introduzida recentemente na bacia do rio Iguaçu, mantendo sua identidade genética ancestral.

Dergam et al. (2002) verificaram a existência de duas OTUs diferentes de traíras, com o uso de marcadores RAPD, uma nos lagos Carioca e Dom Helvécio e outra nos rios e outros lagos. Estes resultados estão em concordância com a situação geográfica, que consta de duas sub-bacias neste sistema lacustre.

Wasko et al (2004) utilizaram marcadores do tipo RAPD para comparar a variação genética entre *Brycon cephalus* selvagens da amazônia e descendentes cultivados por três gerações em regime de cativeiro. Verificaram que as populações cultivadas apresentaram variação genética consideravelmente inferior que as selvagens. Este fato pôde ser atribuído às práticas convencionais de manejo de reprodução, onde um pequeno número de reprodutores é utilizado em cruzamentos de animais não identificados.

Os marcadores RAPD e isoenzimáticos não têm sido utilizados em estudos de filogenia e biogeografia tão freqüentemente quanto os microssatélites e seqüências de bases de segmentos de mtDNA, embora sejam muito empregados para verificação de polimorfismos intraespecíficos. Uma exceção a esta regra é o trabalho de Almeida et al. (2001), que construíram dendrograma genético para espécies de pimelodídeos,

Iheringichthys labrosus, *Pimelodus maculatus* e *P. absconditus* de quatro localidades brasileiras (Sertaneja, Londrina, Saponema e Tibagi). *P. maculatus*, que é a única espécie migradora das três, foi a única que apresentou diferenças significativas entre populações de diferentes localidades. Os autores verificaram que os perfis obtidos por RAPD e isozimas apresentaram resultados conflitantes para *P. absconditus* e *I. labrosus*. É possível que o polimorfismo detectado por pelo menos um dos tipos de marcadores utilizados não apresente taxa de evolução estabelecida ao nível de divergências entre as espécies em questão.

Já existem vários marcadores moleculares disponíveis para o subsídio da MAS em tilápias. Sete *primers* RAPD que demonstraram amplificar bandas polimórficas entre 200 e 1800 bp em estudo realizado por Appleyard, (1998) foram selecionados por Appleyard e Mather (2000) para estudar a herança de fragmentos em sete casais de tilápia (*O. mossambicus*). Não foram encontrados marcadores não parentais nas proles e a segregação dos marcadores mostrou ser mendeliana, com evidência da existência de parentais heterozigotos. Também não se verificou nenhuma ausência de bandas em proles (10 a 15 indivíduos testados por prole e 55 ao todo), onde ambos os parentais apresentavam o fenótipo. Os autores concluíram que marcadores do tipo RAPD podem ser utilizados em programas de seleção assistidos por marcadores.

Yue & Orban (2002) utilizaram dados depositados no GenBank e detectaram seis microsátélites de *O. mossambicus* e *O. niloticus*, nos genes do IGF-II, GH2, prolactina I e insulina. Em experimento com estes *primers*, verificaram que os *loci* eram polimórficos nas duas espécies, gerando 3 a 17 alelos por *locus* em *O. niloticus* e 4 a 21 em *O. mossambicus*.

Lee & Kocher (1996) isolaram 140 microssatélites de *O. niloticus*. Três deles apresentavam unidades de repetição compostas por três pares de bases e 133 eram formados por unidades monoméricas de apenas dois pares de bases. Carleton et al. (2002) verificaram que para esta espécie foram encontradas, em média, 20 alelos por *locus* de microssatélites ricos em CA.

Naish et al. (1995) construíram uma árvore filogenética envolvendo estoques cultivados de *O. niloticus* das Filipinas, baseando-se em três técnicas moleculares: RAPD, DNA *fingerprinting* de microssatélites e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de fragmentos de RAPD. Os resultados obtidos pelas três técnicas geraram diferentes distâncias genéticas, mas foram coerentes entre si. Estes autores verificaram que quatro dos estoques analisados eram indistintos, e que o quinto grupo, bastante diferente, era provavelmente originário de cruzamento interespecífico com *O. mossambicus*. Os autores verificaram que embora todas as técnicas tenham sido úteis, cada uma apresenta vantagens específicas: RAPD é tecnicamente mais fácil de ser aplicado e produziu resultados com menor erro estatístico; o DNA *fingerprinting* de microssatélites produziu maior variabilidade, sendo, portanto o melhor para estimar diversidade dentro de linhagens; e o RAPD/RFLP permitiu o cálculo do nível de heterozigose dos estoques. Concluíram que, pelo fato das três técnicas mostraram marcadores linhagem-específicos, podem ser utilizadas para marcação individual e mapeamento genético.

Em algumas poucas espécies de peixes, a MAS já vem sendo conduzida. Alegrucci et al. (1995) verificaram correlação entre alguns marcadores RAPD e a sobrevivência de *Dicentrarchus labrax* de diferentes estoques submetidos à aclimação em água doce, indicando que estes marcadores estavam ligados a genes de tolerância à aclimação. Caccone et al. (1997) confirmaram esta hipótese, comparando os mesmos marcadores entre populações naturais ocorrentes em água salgada e em lagunas do mar Mediterrâneo, usando como grupos externos *D. labrax* do Atlântico e *D. punctatus*. Estes autores verificaram a ocorrência de correlação entre os marcadores e o tipo de ambiente, independentemente da distribuição geográfica das populações estudadas.

Volckaert & Hellemans (1999) conduziram experimento de seleção simultânea para várias características de interesse, em estoques de bagre africano (*Clarias gariepinus*), com indivíduos cultivados comunalmente, e puderam verificar as taxas de sobrevivência de cada família por período, utilizando amostragens periódicas para a verificação de paternidade e dos efeitos parentais. Verificaram efeito maternal significativo sobre a sobrevivência nos

estágios iniciais de vida e um crescimento gradual de intensidade de efeitos paternais e familiares ao longo do crescimento.

Os autores salientam que a identificação de um número suficiente de marcadores moleculares é criticamente importante para o mapeamento genético, para a MAS e para eventual clonagem de genes benéficos do bagre de canal (Liu et al., 1999), o que pode ser estendido para várias outras espécies de recursos pesqueiros cultiváveis.

Fishback et al. (2000) verificaram, em população cativa de trutas arco-íris, a ocorrência de dois grupos genéticos segregados por diferenças na época de reprodução, que puderam ser discriminados com base em polimorfismos gerados por microssatélites. Estes marcadores viabilizaram a predição de época de reprodução de fêmeas, com base em seus marcadores moleculares. Este resultado, além de demonstrar a utilização prática direta do marcador para a separação de grupos de reprodutores em cultivos comerciais, é também importante para o aprofundamento de estudos de aspectos genéticos da reprodução na espécie. Uma vez que um gene ou genes determinantes de uma característica desejável para a aquicultura seja flanqueado por microssatélites, as sondas poderão ser utilizadas para a localização cromossômica da região. Desta forma, os genes poderão ser isolados por clonagem posicional ou por microdissecção (Phillips & Reed, 1996) e utilizados em aplicações biotecnológicas, como a transgênese.

Na aquicultura, no entanto, programas de seleção têm sido implementados apenas para algumas poucas espécies. De fato, muitas das espécies exploradas economicamente na aquicultura comercial são ainda essencialmente selvagens (Gjedrem, 2000).

Também é possível atingir melhoramento pela aplicação de técnicas de manipulação genética de gametas e embriões através da transgênese, onde os genes de interesse são diretamente acrescentados ao patrimônio genético do indivíduo, com vantagens em termos de rapidez do processo. No entanto, em muitos países tem havido proposta de regulamentação visando controlar a produção e uso de animais transgênicos (Hallerman & Kapuscinski, 1995). Estas leis vêm causando atraso significativo na adoção direta da tecnologia de transferência de genes no cultivo de peixes, e, neste meio tempo, outras

metodologias biotecnológicas menos controversas podem ser utilizadas (Foresti, 2000), como a MAS.

Além dos altos níveis de variabilidade genética, os peixes apresentam também outras características facilitadoras do processo de melhoramento e manipulação genética, como a flexibilidade de acasalamentos fornecida pela possibilidade de fertilização externa e a tecnologia de criopreservação de sêmen (Harvey & Kelly, 1984; Chao et al., 1987).

Beier (1998) listou as vantagens do zebrafish (*Danio rerio*) como modelo de estudos genéticos, que são extensíveis à maioria dos organismos aquáticos ovulíparos. A primeira delas é a de produzir embriões transparentes em grande quantidade, que se desenvolvem de forma sincrônica em poucos dias. Esta situação possibilita a pronta identificação dos indivíduos portadores de anormalidades embriológicas, particularmente as que afetam a formação de órgãos internos, para estudos de localização e seqüenciamento de genes responsáveis por etapas determinadas da embriogênese, que não podem ser visualizadas no modelo clássico da *Drosophila*. A segunda vantagem é que estes animais podem ser submetidos a uma grande variedade de manipulações genéticas que resultam em indivíduos de nível de ploidia variável, clones ginogenéticos haplóides e diplóides, incluindo indivíduos completamente ou parcialmente homocigotos. Dupont-Nivet et al. (2002) afirmam que a possibilidade de obtenção de proles em situação controlada e/ou manipulada viabiliza a aplicação de delineamentos experimentais otimizados de inferência de parâmetros genéticos.

Por motivos semelhantes, Thorgaard et al. (2002) consideram os salmonídeos um excelente modelo sob a ótica da genética quantitativa, por apresentarem alta fecundidade e fertilização externa. Estas duas características possibilitam uma grande flexibilidade de delineamentos experimentais, pela separação de óvulos em grupos fertilizados por espermatozoides de diferentes reprodutores e vice-versa, o que, por sua vez, possibilita a formação de famílias programadas em termos de número e parentais. Os autores apontam ainda outras vantagens desta família como modelo experimental e de produção, como a facilidade de manipulação de gametas, para a geração de proles manipuladas (gino e

androgenéticas), e de manuseio dos embriões, que podem ser transportados para diferentes ambientes de alevinagem e crescimento final; a possibilidade de obtenção de proles ao longo de todo o ano (através de manipulação de fotoperíodo), e a possibilidade de criopreservação de sêmen, possibilitando o cruzamento de populações isoladas reprodutivamente por diferenças de época de reprodução e a formação de banco de sêmen de populações selvagens e linhagens economicamente importantes.

Quando as técnicas moleculares são conjugadas com as da citogenética, é possível verificar a localização cromossômica das seqüências de DNA estudadas e suas variações entre OTUs. Oliveira (1999) verificou que as regiões ricas em seqüências satélites nos cromossomos de *O. niloticus* localizam-se principalmente nos centrômeros e regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, com exceção de regiões intersticiais em dois braços curtos de 2 pares de cromossomos.

Chew et al. (2002) verificaram que *O. niloticus* apresenta duas seqüências teloméricas intersticiais no cromossomo 1 (o maior), corroborando a hipótese de que tenha havido a fusão de três pares de cromossomos em relação ao teleósteo ancestral com $2n=48$, e confirmou que a seqüência $(T_2AG_3)_n$ é a seqüência telomérica em *O. niloticus*, como em outros vertebrados.

Martins et al. (2002) identificaram dois tipos de gene 5S rRNA de *O. niloticus*, diferentes em elementos repetidos em tandem no espaçador não transcrito, ocupando três diferentes localizações cromossômicas. O primeiro apresenta seqüência repetitiva de 1,4 kb (tipo I) e os outros dois 0,5 kb (tipo II). Estudos de seqüências de 5S rRNA entre espécies de peixes têm identificado tipos variantes de seqüências repetidas em tandem nos NTS do 5S rDNA. Enquanto o gene 5S rDNA é conservado, mesmo entre táxons não relacionados, o espaçador não transcrito mostra extensiva variação de comprimento e seqüência, o que dá um acentuado dinamismo aos genes 5S rRNA (Williams & Strobeck, 1985 apud Martins et al., 2002).

Tanto a análise de cromossomos metafásicos, como a hibridação interespecífica e intergenérica e a eletroforese de proteínas mostram a proximidade de animais dos gêneros

Oreochromis, *Sarotherodon* e *Tilapia* (Majumdar & McAndrew, 1983; Trewavas, 1983; McAndrew & Majumdar, 1984). Frank et al. (1992) observaram padrões de hibridação de DNA satélite muito semelhantes entre *Oreochromis* e *Sarotherodon*, que são, contudo, indistintos para quatro espécies de *Tilapia* (Majumdar et al., 1997).

Os cariótipos são similares entre várias espécies de tilápias, consistindo de 22 cromossomos metafásicos, com apenas 2 distintos dos demais pelo tamanho (Kocher et al., 1998). Estudos citogenéticos têm focado o estudo da composição molecular dos cromossomos de espécies desse grupo, principalmente de *O. niloticus* (Wright, 1989; Oliveira & Wright, 1998; Oliveira et al. 1999). O genoma das tilápias apresenta de 0,84 a 1,21 pg (1pg = 10^{-6} mg) de DNA, provavelmente por causa da evolução de famílias de DNA repetitivo (Kocher et al., 1998). Pelo menos dois tipos de determinação sexual estão presentes no gênero *Oreochromis*, e Foresti et al. (1993) confirmaram o tipo de cromossomos sexuais XX e XY para *O. niloticus*, pela técnica da visualização do complexo sinaptonêmico.

A construção de mapas de ligação é realizada com base na ordem em que ocorrem as seqüências (marcadores) nos cromossomos e nas distâncias entre estes marcadores. O processo envolve a verificação de ocorrência dos marcadores nos organismos e em seus descendentes, que podem ser proles diplóides normais, proles haplóides ou híbridos. A análise de segregação nos descendentes mostra, para cada par de marcadores, qual a probabilidade de que eles sejam herdados pelo mesmo descendente, que é diretamente proporcional à distância entre eles. Com os dados de distâncias entre cada um dos pares de marcadores estabelecidos, é possível construir grupos de ligação entre eles. Estes mapas constituem as bases para o desenvolvimento de outras ferramentas mais refinadas, de uso nos programas de melhoramento genético (Moore et al., 1999).

Liu et al. (1999) selecionaram 22 *primers* de RAPD em bagre de canal, que geraram 171 marcadores RAPD altamente reproduzíveis, transmitidos aos híbridos F1 no “blue catfish” e segregados de modo mendeliano nas progênes F2 e recíprocas. Verificaram

também que marcadores são utilizáveis no mapeamento rápido dessas espécies, devido à fertilidade dos híbridos e às características do marcador.

Postlethwait et al. (1994) usaram marcadores RAPD para construir mapa genético de zebrafish (*Danio rerio*). Marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) também já foram utilizados no mapeamento genético de zebrafish (Vos et al., 1995).

Knapik et al. (1998), no entanto, contestam a utilização deste tipo de marcadores para a realização de mapeamento, porque não consideram ser adequado usar marcadores RAPD para diferentes linhagens, sem tê-los clonado e seqüenciado. Os autores construíram outro mapa genético para a espécie, utilizando marcadores microssatélites.

Kocher et al. (1998) utilizaram a análise de segregação em proles haplóides de 62 marcadores microssatélites e 112 AFLP para construir o primeiro mapa de ligação de *Oreochromis niloticus*. Obtiveram 30 grupos de ligação, 24 dos quais contendo pelo menos um *locus* polimórfico microssatélite, cobrindo todos os 22 pares de cromossomos. A estimativa obtida de comprimento do mapa é de 1000 a 1200 cM. A estratégia de utilizar proles haplóides é adequada para facilitar a interpretação dos dados de marcadores dominantes, porque só ocorrem duas possibilidades, a presença ou ausência da banda no único alelo por *locus* do indivíduo haplóide, ao invés de ser contado como positivo o indivíduo diplóide homo ou heterozigoto dominante.

Agresti et al. (2000) criaram um centro artificial de origem, pelo cruzamento de linhagens de *Oreochromis niloticus* selvagens e cultivadas, tilápia vermelha (*Oreochromis* spp.), *O. aureus*, *O. mossambicus* e *Sarotherodon galilaeus*, para realizar o mapeamento de parentais e o aumento artificial de número de alelos por *locus*, em híbridos de variabilidade maximizada para programas de melhoramento. Nas proles híbridas, obtiveram 229 marcadores segregantes (62 microssatélites e 167 AFLPs), dos quais 60 microssatélites e 154 AFLPs estavam ligados em 24 grupos de ligação, cobrindo um total de 1632 cM.

McConnell et al. (2000) construíram mapa genético de *O. aureus* e verificaram grupos de ligação muito semelhantes aos já construídos para *O. niloticus* e *O. mossambicus* nos estudos de Kocher et al. (1998) e Agresti et al. (2000).

O marcador UNH 111 foi utilizado nos três estudos citados anteriormente. Palti et al. (2001), no entanto, demonstraram que este par de *primers* amplificou mais de uma banda em indivíduos haplóides de *O. aureus* e *O. niloticus*, sugerindo que dois *loci* são amplificados com estes pares de *primers*. Como no trabalho de Kocher et al. (1998), também com proles haplóides, isto não foi verificado, é provável que diferentes linhagens apresentem números diferentes de *bci* amplificados por este marcador. A duplicação de diferentes *loci* microssatélites já foi observada no genoma humano (Phillips et al., 1993 apud Palti et al. 2001), e os autores recomendam cuidado na utilização deste marcador em análise de ligação de diferentes populações de tilápia.

Além dos avanços no mapeamento de ligação de tilápias, também o mapeamento físico começa a ser conduzido. Martins et al. (2004) lançaram as bases do mapeamento genômico físico de *O. niloticus* através da integração de dados de localização cromossômica de seqüências repetitivas de DNA, satélites, telômeros, rDNAs 45S e 5S e elementos nucleotídicos intercalados do DNA nuclear curtos (SINEs) e longos (LINEs). O adensamento destes mapas é uma das mais importantes ferramentas para estudos de melhoramento genético da espécie.

3.1- Fatores importantes para o sucesso de um programa de seleção assistida por marcadores moleculares

Herbinger et al. (1999) compararam crescimento inicial e sobrevivência de proles de salmão do Atlântico em tanques distintos e no mesmo tanque. Identificaram os parentais com quatro *loci* microssatélites e chegaram a interessantes conclusões. A primeira delas foi que a correlação entre as taxas de crescimento de famílias cultivadas comunalmente e separadamente não foi significativa, evidenciando influência ambiental mais pronunciada que a genética para esta característica. A segunda conclusão foi a de que nem a taxa de crescimento da família em tanques individuais nem a de comunais estiveram fortemente correlacionadas com crescimento subsequente até o estágio de “smolt”, quando mudanças

no sistema de osmoregulação dão início ao processo de migração para água salgada. Verificaram ainda que a sobrevivência de cada família mostrou forte correlação entre as famílias cultivadas em tanques separados e em tanque comum, indicando, de um lado, significativo efeito genético, e de outro, um grau insignificante de influência das variações ambientais experimentadas pelos animais em relação a sobrevivência.

Este experimento demonstra vários aspectos importantes no planejamento e condução de programas de melhoramento genético. O primeiro deles é relacionado à “padronização” ambiental e aos seus efeitos sobre as variáveis resposta. Embora as condições estivessem suficientemente uniformizadas para que fosse possível aferir efeitos genéticos sobre a sobrevivência, elas influenciaram fortemente as aferições da taxa de crescimento. Outros autores, trabalhando com a mesma espécie, obtiveram resultados significativos de seleção sobre o crescimento. O’Flynn et al. (1999) fizeram experimentos de seleção também com o salmão do Atlântico, sem a utilização de marcadores moleculares, cultivando as famílias em unidades experimentais diferentes e verificaram efeitos de seleção familiar de 880g por peixe (controle 3,51 x melhorado 4,39 kg). Thodesen et al. (2001) verificaram efeitos genéticos para esta espécie na taxa de ingestão, crescimento e utilização de alimentos que responderam por 31 a 32% da variação. A discrepância entre os resultados descritos nestes trabalhos tanto poderia ser explicada por problemas de amostragem, como defendem os autores, como pelas diferenças ambientais associadas as condições de cada experimento. É possível que o ambiente tenha sido suficientemente uniforme em termos de ocorrência de organismos patógenos e/ou oportunistas e também nas flutuações de qualidade de água potencialmente impactantes no sistema imunológico, permitindo a aferição de efeitos genéticos sobre a sobrevivência. Por outro lado, outros fatores ambientais relacionados diretamente à taxa de conversão alimentar, podem não ter sido tão uniformes quanto seria desejável para que não se sobrepusessem aos potenciais efeitos genéticos. Estes fatores incluem um imenso espectro de fatores ecológicos de difícil manejo, que influenciam a produtividade de alimento natural nos tanques, o apetite, a

localização do alimento, a hierarquia de dominância alimentar, a taxa de ingestão, o gasto energético em funções homeostáticas e a taxas de excreção, entre outros.

O segundo ponto importante do experimento de Herbinger et al. (1999) para fins de planejamento de MAS, é a falta de correlação detectada entre as taxas de crescimento iniciais e posteriores. Esta é uma indicação de que diferentes genes vão controlar funções relacionadas ao crescimento em diferentes fases de vida, exigindo que os programas de melhoramento genético para esta característica constem de aferições de fenótipo no(s) período(s) comercialmente importante(s).

A verificação da proximidade entre o marcador e o bloco gênico de interesse é aferida indiretamente, pela probabilidade de ocorrência conjunta dos dois, versus a de ocorrência em separado de cada um, ao invés de uma determinação direta de número de pares de bases entre os dois segmentos do genoma. Por conta disso, alguns cuidados para evitar falsas inferências devem ser tomados.

Um importante aspecto deste processo é o tipo de marcador a ser escolhido, que deve apresentar a maior probabilidade possível de localizar-se próximo a regiões codificantes de genes responsáveis pelas QTLs desejadas.

Ferguson & Danzmann (1999) apontam também três possíveis fontes de erro na utilização de marcadores de haplótipos de RFLP mitocondriais para fazer MAS: a) a seleção será efetiva apenas se a variação associada com o haplótipo exceder aquela associada com valores genéticos dos parentais individuais; b) a ocorrência de falta de reprodutibilidade entre estudos e ambientes limita a utilização da MAS; c) um alelo em particular pode ser associado tanto com uma baixa como com uma alta performance de um QTL em diferentes famílias, por causa da ocorrência de recombinação e segregação; d) peixes com desempenho superior podem possuir alelos comuns apenas por causa da origem comum.

Os marcadores do tipo RAPD, por serem distribuídos ao longo do DNA, são bastante úteis para este fim. Haley et al. (1993) utilizaram marcadores RAPD para mapeamento de bloco genético de resistência de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) à doença causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus*. Verificaram uma banda a 2,15+/-1,5 cM do bloco gênico

responsável pela QTL e uma outra herdada em conjunto com ele em 100% das 97 plantas examinadas (Haley et al., 1993).

Além da adequação do tipo de marcador, é preciso observar o número efetivo de reprodutores a ser utilizado a cada geração. A endogamia é inevitável durante um programa de seleção (Su et al., 1996; Pante et al., 2001b) e há ampla evidência de depressão endogâmica para peixes (Kinkaid, 1983; Eknath & Doyle, 1990; Su et al., 1996; Pante et al., 2001a). Gall & Bakar (2002) afirmam que programas de seleção de longo prazo devem utilizar populações relativamente grandes, com 25 machos e 100 fêmeas a cada geração, sendo este o teto mínimo razoável para programas que visem um horizonte de 15 a 20 gerações. Este número deve ser ajustado para cada programa, levando em consideração um percentual máximo admitido de perda de variabilidade genética por geração e o número de gerações com o qual se projeta trabalhar.

Na condução dos programas, é preciso levar em conta o efeito da plasticidade fenotípica. Jonsson & Jonsson (2001) definem plasticidade fenotípica como a expressão de uma característica que é influenciada pelo ambiente, independentemente do genótipo, e por Morita & Suzuki (1999), como a habilidade de um único genótipo em produzir mais de uma forma alternativa de morfologia, estado fisiológico e/ou comportamento em resposta a condições ambientais (West-Eberhard, 1989). O tipo de plasticidade mais relatado para caracteres quantitativos de peixes é a modulação fenotípica. Este processo geralmente produz variação de fenótipos contínuos e é descrito como um padrão de reação, que atribui um valor de fenótipo produzido pelo genótipo como uma função das condições ambientais (Swain & Foote, 1999).

Uma resposta de plasticidade fenotípica a uma condição experimentada recentemente, pode ser seguida de mudanças genéticas nesta mesma direção, num processo denominado assimilação genética (Chapman et al., 2000). Por outro lado, uma diferenciação morfológica interpopulacional pode refletir tanto um processo de seleção genética quanto simplesmente uma indução ambiental (Swain & Foote, 1999). Seguem alguns exemplos de modulação ambiental sobre características de interesse em aquicultura.

Algumas modificações patológicas de forma podem ser induzidas por condições do processo de larvicultura de peixes cultivados. Chatain (1994) observou que velocidade de corrente maior que 20 cm/s nos tanques de incubação pode provocar lordose e vesículas vasosas não funcionais em *Dicentrarchus labrax* e *Sparus auratus*. Má formação esquelética na fase larval também pode ser induzida pela temperatura (Sfakianakis et al., 2004), intensidade de luz e salinidade (Johnson & Katavic, 1984), pela ação moduladora do estado nutricional sobre a resistência à ação de patógenos (Madsen & Dalsgaard, 1999), triploidia induzida (Sadler et al., 2001), e deficiências nutricionais (Cahu et al., 2003).

Mesmo após a fase de alevino ou jovem, as condições de cultivo podem promover crescimento alométrico nos animais. Sara et al. (1999) apontam fatores como a densidade de estocagem, o volume da estrutura de cultivo, a quantidade, tipo e qualidade do alimento como causadores de alterações no crescimento. Os autores compararam o crescimento de *Diplodus puntazzo* durante oito meses em ambientes de gaiola submersa e de tanques, e verificaram formas diferenciadas entre os grupos. Os animais cultivados em tanques apresentaram formato mais largo na região cefálica ('goitred') e achatados no dorso ('dorsal flat'), enquanto os de gaiolas mostraram maior frequência de animais de ventre saliente ('belly').

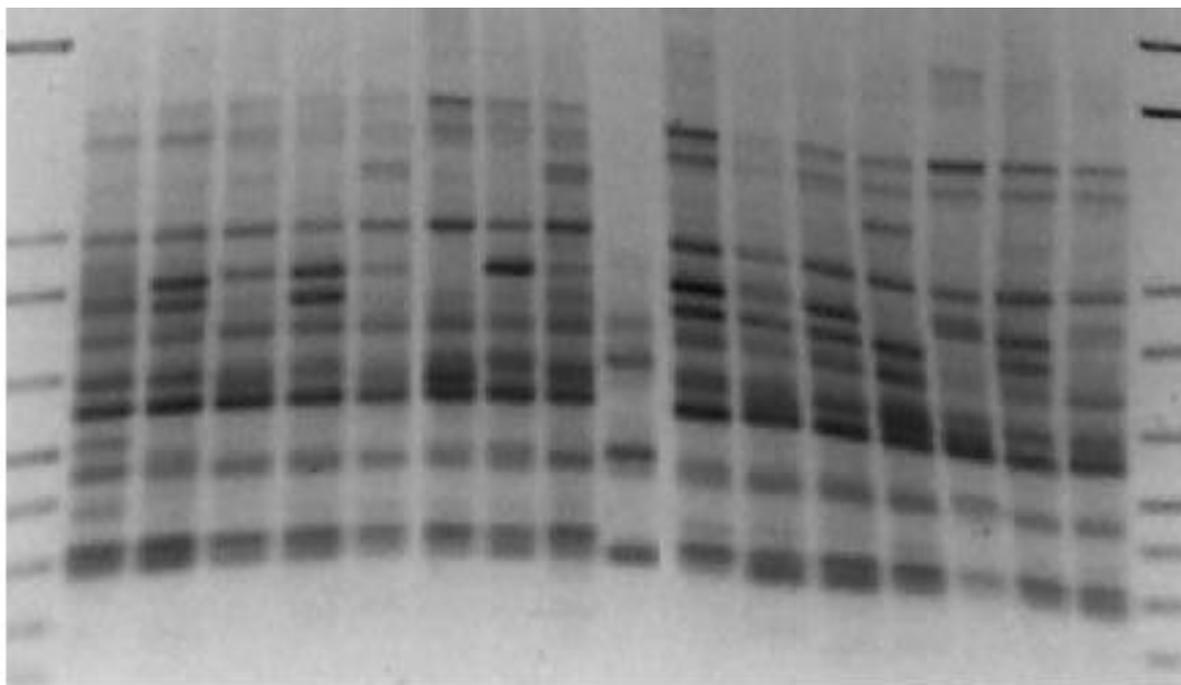
Einen et al. (1998) verificaram que o tempo de jejum afetou a área de seção transversal, largura e altura em dois pontos do corpo para salmão do Atlântico. Estas modificações foram acompanhadas por decréscimo de peso corporal, com crescimento em comprimento, indicando que o crescimento vertebral e o desenvolvimento muscular são dois processos relativamente independentes entre si, em situação de restrição alimentar. Estes resultados indicam que os peixes podem utilizar suas reservas viscerais e musculares para sustentar o crescimento vertebral.

Um programa de melhoramento corretamente conduzido buscará uniformizar ao máximo as condições ambientais, para minimizar o efeito plástico sobre as manifestações fenotípicas em regime de melhoramento.

3.2- A utilização de marcadores RAPD na seleção assistida por marcadores moleculares

A técnica de obtenção desta classe de marcadores moleculares foi desenvolvida independentemente por dois grupos de pesquisadores, que a publicaram simultaneamente no mesmo periódico (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990). Utiliza-se da amplificação seletiva in vitro de porções de DNA genômico menores que 4 kb (Ferreira & Grattapaglia, 1998), que possuam em suas extremidades seqüências complementares a um mesmo *primer* e dispostas de forma invertida. Cada seqüência complementar fornece a extremidade 3' livre para a ação da enzima DNA polimerase (Glienke-Blanco, 1999), e a repetição dos ciclos PCR (Polymerase Chain Reaction) resulta num padrão individual de bandas (*fingerprinting*) por eletroforese destes fragmentos.

Figura 1- Padrão de bandas geradas por RAPD. As linhas verticais da extremidade representam uma mistura de fragmentos de DNA de comprimento conhecido e as interiores mostram marcadores de indivíduos gerados com o mesmo *primer*



A obtenção de marcadores do tipo RADP têm várias vantagens sobre outras técnicas moleculares mais bem estabelecidas, porque proporciona um método rápido de obtenção de grande número de polimorfismos (Asensio et al., 2001), possibilita a análise simultânea de muitas amostras e com cobertura de grandes áreas do genoma (Gomes et al., 1998), não utiliza equipamentos muito sofisticados ou radioisótopos (Glienke-Blanco, 1999), não necessita de conhecimento prévio sobre o DNA sob análise (Gomes et al., 1998; Liu et al., 1999), necessita de quantidades diminutas de tecido, proporcionando uma possibilidade de coleta de amostra não invasiva e sem a necessidade de sacrifício do animal (Elo et al., 1997) e ainda são tão úteis quanto os RFLPs (Botstein et al., 1980), mas muito mais fáceis e baratos de se obter (Gomes et al., 1998).

Além disso, como a ocorrência de seqüências complementares ao *primer* utilizado pode se dar tanto em regiões codificantes como em DNA repetitivo, o RAPD proporciona, em tese, cobertura genômica mais ampla e bem distribuída que os microssatélites.

Devido à natureza de seu princípio de funcionamento, estes marcadores são classificados como dominantes. Embora possa haver polimorfismo de comprimento em uma região genômica entre dois sítios de anelamento do *primer* utilizado, gerando dois ou mais alelos populacionais amplificados para uma mesma região genômica, não é possível verificar no padrão de bandas quais dos fragmentos correspondem a uma mesma região do DNA. Também pode acontecer de uma mutação individual não permitir a amplificação de uma região do DNA em alguns espécimens, por modificação no sítio de anelamento ou por inserções que causem falha no processo de amplificação via PCR devido ao comprimento do fragmento. Por se tratar de marcador do tipo dominante, cada banda RAPD passa a ser considerada como um “alelo” dominante de um *locus* de dois alelos. Considera-se ocorrência de “alelo” recessivo quando a banda está ausente do *fingerprinting* de um espécimen.

As principais aplicações do RAPD são o mapeamento genético, a classificação de linhagens de uma espécie, a caracterização molecular de populações e espécies, a identificação de raças patogênicas, a identificação de marcadores ligados a genes de

interesse, e estudos de genética de populações e epidemiologia (Glienke-Blanco, 1999). Estes marcadores vêm sendo utilizados para a detecção de variação genética em várias espécies de peixes, para estudos filogenéticos em espécies e subespécies de peixes, para identificação de peixes ginogenéticos e para mapeamento genético em peixes (Liu et al., 1999 citam várias referências para cada aplicação).

Caccone et al. (1997) consideram que o uso de padrões RAPD no estudo de diferenciação genética é parcialmente prejudicada por dois problemas relacionados: a variação intrapopulacional é quase tão alta quanto a interpopulacional e; acima de certo patamar, as distâncias não aumentam quando diferentes taxa são comparados. Liu et al. (1999), no entanto, aplicaram análise de marcadores RAPD para espécies de bagre e verificaram que a maioria das bandas era espécie-específica, embora tenham detectado diferenciação interpopulacional e interindividual.

Bessega et al. (2000) compararam o uso de marcadores RAPD e isozimas no cálculo de distâncias genéticas para populações de duas espécies de algaroba norte-americanas, constatando que o dendrograma construído a partir de dados de isozimas refletiu melhor o status taxonômico que os índices baseados em RAPD. Uma possível explicação é a de que foram aferidas como homólogas bandas com mesma velocidade de migração, correspondentes a fragmentos não homólogos de DNA (verificável por Southern blot ou SSCP – Single Strand Conformational Polymorfism - de produtos RAPD). A outra explicação deriva da natureza dos marcadores. Isozimas têm maior probabilidade de responder a pressões adaptativas que os RAPD, que são predominantemente neutros. Eles mostraram maiores valores de variabilidade genética entre populações coespecíficas que as isozimas e podem ser mais úteis na avaliação de variabilidade genética intraespecífica (Bessega et al., 2000).

Mapas genéticos de marcadores RAPD podem ser obtidos mais eficientemente e com mais alta densidade que com RFLPs ou com métodos baseados em seqüências-alvos previamente determinadas para amplificação via PCR (Williams et al., 1990). O mapeamento com marcadores RAPD provou ser extremamente útil para ancorar outros

marcadores baseados em PCR, que empreguem tanto polimorfismos de microssatélites quanto polimorfismos SSCP (Beier, 1998).

O mapeamento genético com RAPDs tem várias vantagens sobre outros métodos, e segundo Williams et al. (1990), um conjunto universal de *primers* pode ser utilizado para análise genômica numa ampla variedade de espécies; não requer nenhum trabalho preliminar, como o isolamento de sondas clonadas de DNA, preparação de filtros de hibridação ou seqüenciamento de nucleotídios; a determinação do genótipo pode ser automatizada; cada marcador RAPD é equivalente a um STS (sequenced tagged sites) o que pode simplificar a transferência de informações entre programas de pesquisa.

Lynch & Milligan (1994) sistematizaram as premissas adotadas quando se utilizam dados de marcadores dominantes do tipo RAPD, estabelecendo que dois alelos distintos não migram para a mesma posição no gel e que cada marcador representa um *locus* mendeliano cujo alelo dominante (visível) está em equilíbrio de Hardy-Weinberg com um recessivo (nulo).

A primeira premissa de Lynch & Milligan (1994) é válida para todos os marcadores baseados em polimorfismos de comprimento, independentemente de serem dominantes ou codominantes. A segunda, inclui tanto a limitação imposta pela natureza dominante do marcador (dois alelos sendo apenas o dominante amplificável), quanto um outro pré-requisito essencial para que a banda possa ser utilizada para se fazer inferências genéticas. Para que um marcador molecular seja adicionalmente considerado um marcador genético, é necessário que ele se comporte de acordo com as leis básicas de herança de Mendel (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O procedimento de amplificação PCR-RAPD é particularmente sensível a mudanças nas condições de reação, que podem afetar a reprodutibilidade dos produtos de amplificação (Gomes et al., 1998). Existem muitas variáveis na reação que contribuem para isso, entre as quais o termociclador, a DNA polimerase, a concentração de DNA e *primers*, e a composição do tampão são as mais freqüentemente citadas (Quesada & Cenis, 1995). O efeito destes fatores foi estudado por MacPherson et al. (1993 apud Quesada & Cenis,

1995), que demonstraram que as corridas feitas no mesmo gel resultam em padrões idênticos e que aquelas feitas em diferentes corridas apresentam diferenças na intensidade das bandas, podendo chegar a ponto de torná-las indetectáveis. Asensio et al. (2001) consideram que a maior desvantagem do método é a possibilidade de não haver consistência entre resultados de repetições de análises de uma mesma amostra. Isto é particularmente problemático quando se tenta integrar dados de mapeamento com os mesmos *primers* obtidos em diferentes condições de reações (Beier, 1998).

Martins (1997) relatou que o número, a reprodutividade e a intensidade das bandas produzidas por RAPD com um *primer* específico dependem das concentrações do *primer* e do DNA. Outros fatores importantes são as concentrações de cloreto de magnésio e da polimerase e as temperaturas de desnaturação do DNA e anelamento dos *primers* (Welsh & McClelland, 1990).

Tedford et al. (1994 apud Glienke-Blanco, 1999) recomendam as seguintes precauções para reduzir a ocorrência de bandas artificiais: a) utilizar-se de soluções estoque com concentração uniforme de DNA para cada isolado, para cada oligonucleotídeo e para o magnésio; b) utilizar o mesmo termociclador em todas as reações; c) analisar somente as bandas visíveis que ocorrerem em pelo menos duas repetições; d) uma única pessoa conduzir todas as reações.

Outras fontes de erro no método incluem os equívocos de interpretação dos dados (detecção e aferição de comprimento nos géis). Eles acontecem por migração de bandas distintas, porém de tamanho similar, para a mesma posição no gel, e também pela não contagem de banda existente, porém não corretamente amplificada (Megnegnau et al., 1993 apud Glienke-Blanco, 1999). Como também ocorre com outros marcadores, alguns polimorfismos são claros e fáceis de verificação, enquanto outros parecem ambíguos e não são úteis como marcadores genéticos (Williams et al., 1990).

Além das condições de reação, também a escolha dos *primers* e o comprimento das bandas amplificadas interferem na reprodutibilidade dos padrões de bandas e/ou na sua intensidade de coloração no gel.

Para espécies de bagre, Liu et al. (1999) verificaram que bandas com mais de 1,6 kb eram menos reproduzíveis e pareciam “surgir” nas progênes, mas novo exame dos parentais mostrou que elas existiam, não tendo sido previamente identificadas devido à pequena quantidade de produtos de amplificação em PCR. Por conta disso, os autores recomendam cuidado ao lidar com bandas de alto peso molecular (>2 kb). A faixa de 400 a 1500 pb mostrou ser a mais adequada para o mapeamento, com bandas reproduzíveis e herdadas de modo mendeliano.

Liu et al. (1999) utilizaram 100 *primers* para obter marcadores RAPD de *Ictalurus punctatus* (bagre de canal) e *I. furcatus* (bragre azul) e verificaram que 42 forneciam perfis claros e reproduzíveis (com bandas na faixa de 200 a 1500 bp), com média de de 6,1 bandas por *primer*, que foram transmitidos em híbridos F1 e recíprocos F2 como marcadores dominantes. Trinta e três *primers* geraram marcadores de média qualidade e 25 *primers* resultaram em perfis monomórficos ou não reproduzíveis.

Quesada e Cenis (1995) consideraram adequados 16 dos 80 *primers* testados em DNA de leveduras, por fornecer bandas reproduzíveis, geralmente entre 300 e 2500 bp. A reprodutibilidade foi testada com 5 repetições de reação PCR no mesmo gel e mais cinco em outro gel, feitas em dias diferentes e utilizando o mesmo protocolo. Para as reações no mesmo dia, as mesmas bandas foram geradas. Para as repetições em dias diferentes, as bandas mais intensamente coradas apresentaram boa repetibilidade, tendo ocorrido uma banda de 1240 bp que não foi detectada em três de seis corridas.

Caccone et al. (1997) produziram DNA *fingerprinting* de “sea bass” com marcadores RAPD e verificaram que as bandas que amplificaram consistentemente eram as que apresentavam comprimentos entre 290 e 2800 bp. Koh et al. (1999) computaram apenas as bandas entre 200 e 1500 bp em perfis de espécies e variedades de *Symphisodon*.

Gomes et al. (1998) utilizaram marcadores RAPD para estudar populações de peixes voadores *Hirundichthys affinis* e verificaram que os produtos de amplificação com todos os *primers* e pares de *primers* foram consistentemente reproduzíveis pelo período de um ano, que as leituras de comprimentos de bandas foram altamente consistentes entre três leitores

independentes e que as amplificações com pares de *primers* mostraram pelos menos alguma independência de informações. Os perfis RAPD evidenciaram alto índice de polimorfismo e revelaram marcadores diagnósticos de populações e de sub-regiões geográficas, com resultados inteiramente consistentes com os obtidos por RFLP para os mesmos peixes (Gomes et al. 1996).

Vários estudos demonstraram o modo de herança mendeliana dos marcadores RAPD (Williams et al., 1990; Welsh et al., 1991; Echt et al., 1992; Roy et al., 1992; Kazan et al., 1993; Levitan & Grosberg, 1993; Rothuizen & Van Wolferen, 1994; Foo et al., 1995; Vernon et al., 1995; Elo et al., 1997; Stott et al. 1997; Liu et al., 1999). No entanto, outros estudos têm demonstrado que fragmentos RAPD não são sempre amplificados em cópias suficientes para serem detectadas como bandas claras em géis, gerando resultados equivocados onde bandas não parentais parecem ocorrer em proles (Karlson et al., 1991 apud Appleyard & Mather, 2000; Hunt & Page, 1992; Reidy et al., 1992 e de Reiter et al., 1992).

Talvez a maior limitação da técnica seja a possibilidade de formação de *heteroduplexes* entre produtos amplificados por PCR (Riedy et al., 1992 apud Elo et al., 1997; Hunt & Page, 1992; Scott et al., 1992; Ayliffe et al., 1994), que geram o aparecimento de bandas não parentais em proles. Em condições de baixa estringência, pode haver pareamento de filamentos não homólogos, formando *heteroduplexes* em lugar dos *homoduplexes* esperados (Leoni et al., 2003). Estes fragmentos migram mais lentamente no gel do que seria esperado para um *homoduplex* de mesmo comprimento (Turner et al., 2002) e são equivocadamente computados como bandas adicionais, de comprimento maior que os dos filamentos não homólogos que o originaram.

Parentais de *Salmo salar* e *S. trutta* e suas proles (naturais e de híbridos recíprocos) tiveram fenótipos analisados por RAPD *fingerprintings* (Elo et al., 1997). Nas proles, nenhuma banda não parental foi identificada e os marcadores mostraram modo de herança estritamente mendeliano e dominante em todos os cruzamentos. Bandas específicas segregaram nos F1 mostrando a existência de parentais tanto homozigotos como

heterozigotos para os marcadores (Elo et al., 1997). Das 3.413 bandas do estudo, nenhuma foi não parental, de modo que a frequência máxima de ocorrência de *heteroduplexes* nestas espécies é menor que $1/3413$ ou 0.03% com os *primers* utilizados. Estes resultados contrastam com estudo de RAPD *fingerprinting* de mamíferos, no qual Ayliffe et al. (1994) detectaram marcadores RAPD codominantes em mamíferos e *heteroduplexes*.

Arnau et al. (1994) investigaram a hipótese de que bandas RAPD geradas para o DNA do fungo fitopatogênico *Cladosporium fulvum* representassem DNA repetitivo ou representassem dois diferentes fragmentos de mesmo comprimento, o que as desabilitaria para fins de mapeamento e alinhamento. Os autores purificaram fragmentos de cada banda do gel e as utilizaram como gabarito em nova amplificação com os mesmos *primers* e nas mesmas condições, seguindo de hibridação Southern Blot. Das 49 bandas utilizadas, apenas uma não gerou bandas adicionais após a segunda amplificação. A falta de hibridação indicou a bandas compostas por mais de um tipo de fragmento em alguns casos, o que pode induzir uma incorreta interpretação de marcadores RAPD. Os autores recomendam então que só os marcadores RAPD previamente caracterizados sejam utilizados para o estabelecimento de técnicas de mapeamento. O passo de reamplificação pode representar uma estratégia de economia de tempo na pesquisa de marcadores RAPD para fins de mapeamento e análise de ligação.

O RAPD é capaz de extrair informação considerável sobre a variabilidade de nucleotídeos ao longo do genoma. Analisados prudentemente, estes dados podem facilitar uma avaliação rápida da variabilidade genética e potencial evolucionário em espécies ameaçadas e certos taxa onde o tamanho amostral seja um fator limitante (Borowsky, 2001).

A característica dominante pode fazer com que a diversidade genética seja subestimada, quando os heterozigotos não são detectados, ou então superestimada, quando a frequência das bandas detectadas for menor que 50%. No entanto, o RAPD gera estimativas úteis de variação genética, quando a interpretação dos dados leva em consideração suas características (Kimberling et al., 1996).

Não existe consenso sobre o tratamento estatístico de dados RAPD. A maioria dos autores usa algum coeficiente de similaridade baseado na proporção de bandas em comum (Quesada & Cenis, 1995). O caráter dominante da herança dos marcadores impede o uso de estimativas de frequência de alelos e o uso direto de parâmetros estatísticos bem estabelecidos para a genética populacional, que se baseiam em proporções de alelos e/ou de heterozigotos, como heterozigose, distância genética e estatística F (Elo et al., 1997).

Embora teoricamente a intensidade da banda de um exemplar homozigoto dominante seja duas vezes maior que a de um heterozigoto (porque o dobro de cópias do fragmento deve resultar da sua amplificação), é muito difícil diferenciá-la no gel (Williams et al., 1990; Liu et al., 1999; Gomes et al., 1998). Isto ocorre devido às fontes de variação na intensidade das bandas que não estejam relacionadas à quantidade inicial de seqüências a serem amplificadas no DNA sob análise. Por este motivo, cada banda é computada como presente ou ausente, gerando uma matriz de base de dados com colunas correspondentes a indivíduos e linhas correspondentes aos comprimentos de bandas da OTU. Para cada comprimento de banda ocorrente na população, o indivíduo que a apresentar é classificado como portador do alelo dominante e recebe o valor "1", independentemente de ser heterozigoto (+/-) ou homozigoto dominante (+/+). Da mesma forma, se não apresentar a banda, o indivíduo recebe na linha correspondente a ela o valor "0" e é considerado homozigoto recessivo (-/-) para aquele *locus*. Kimberling et al. (1996) organizaram matrizes nesses moldes, a partir de dados de RADP utilizando 14 *primers* que geraram 38 *loci* polimórficos. Esta matriz forneceu base única de dados para a análise de distâncias genéticas e para análise de componentes principais para determinação de afinidades genéticas entre populações de rãs no sudoeste dos EUA.

Embora os indivíduos heterozigotos não possam ser detectados diretamente com o RAPD, é possível estimar, embora com menor poder estatístico que no sistema de marcadores codominantes, a diversidade genética (Kimberling et al., 1996) e vários outros indicadores genéticos, como o índice de heterogeneidade fenotípica, índice de similaridade, a distância genética, o índice de diversidade de Gini-Simpson, índice relativo de Weir e de

índice de Cockerham. Também é possível verificar a existência de ligação entre marcadores RAPD e características ecológicas ou QTLs através de testes de hipótese e análise de componentes principais.

A verificação de ocorrência de ligação entre os fenótipos desejados e cada um dos marcadores moleculares dos indivíduos, é feita por ferramentas estatísticas semelhantes às utilizadas nas análises de ligação de marcadores entre si, quando a característica é qualitativa. Para características quantitativas, a análise é feita por correlação e/ou regressão, que podem ser seguidas da aplicação de modelos mistos, também denominados modelos animais.

Os delineamentos experimentais devem ser cuidadosamente planejados, para a obtenção do maior número possível de informação, com o menor custo e no menor tempo possível. Dupont-Nivet et al. (2002) utilizaram simulação computacional para comparar três tipos de delineamentos de cruzamentos para a estimativa de herdabilidade de uma característica hipotética. Os tipos de delineamentos testados foram: a) fatorial completo $n \times n$ (considerando todas as proles possíveis oriundas do cruzamento de cada um dos machos com cada uma das fêmeas em número igual por sexo); b) fatorial com apenas duas fêmeas (considerando cada um dos machos em cruzamento com as mesmas duas fêmeas; c) delineamento proposto por Berg & Henryon (1998), onde cada macho produz proles com duas fêmeas do seguinte modo: macho 1 com fêmeas 1 e 2; macho 2 com fêmeas 2 e 3; e assim por diante.

Verificaram que, para os delineamentos tipo “a”, a melhor precisão é obtida com um menor número de indivíduos, independentemente do nível de herdabilidade da simulação. No entanto, quando o número amostral é igual ou menor que 1000, o número de machos é fator limitante neste tipo de delineamento, sendo preferível a utilização do tipo “b”. Por outro lado, o fatorial completo mostrou-se o delineamento que permite a melhor estimativa dos efeitos maternos e de dominância.

Os dados obtidos nos programas de melhoramento são organizados em matriz onde cada observação ocupa uma linha e as colunas são compostas pelo valor fenotípico aferido

para a QTL em questão; das demais colunas constam valores zero ou um, que correspondem respectivamente à presença ou ausência dos alelos cujos efeitos genéticos se deseja testar a significância (Fishback et al., 2000). Estes efeitos genéticos podem compreender o maternal, paternal, do sexo, da população que deu origem de cada parental, ambiental, de número de ordem da geração sob melhoramento, ocorrência de bandas específicas de marcadores moleculares ou outros, bem como todas as possíveis interações entre os efeitos considerados. Uma análise de regressão múltipla é conduzida para determinar os coeficientes e a sua significância, na predição do valor fenotípico pelo método dos mínimos quadrados. Um modelo reduzido é então ajustado, utilizando apenas com as variáveis que tenham produzido efeitos significativos no fenótipo analisado.

Bolivar & Newkirk (2002) e Gall & Bakar (2002) recomendam a construção de um segundo modelo, a partir da utilização do modelo reduzido obtido, onde todos os efeitos fixos e suas interações são combinados. O novo modelo leva em conta este efeito fixo e efeitos aleatórios. Os autores utilizaram como efeitos aleatórios o “valor do reprodutor”, o efeito genético direto maternal e interação dos parentais, para a predição de peso corporal aos 98 dias em híbridos de tilápias. Esta análise complementar permite a estimativa da herdabilidade como a variância aditiva de cada variável animal. O método é conhecido como o dos modelos mistos, ou modelo animal.

O estudo de Gall & Bakar (2002) demonstrou tanto a aplicação quanto a eficácia do melhoramento genético usando métodos mistos para avaliar animais para seleção. A superioridade deste método sobre a seleção fenotípica provém do aumento de acurácia na estimativa dos valores de reprodutor obtidos pelo uso de relações conhecidas de parentesco entre todos os animais (Cameron, 1997 apud Gall & Bakar, 2002; Mrode, 2000 apud Gall & Bakar, 2002). O experimento de seleção mostrou claramente um rápido melhoramento no peso corporal a cada idade específica. A superioridade do modelo aumenta com o decréscimo da herdabilidade (Blair & Pollack, 1984 apud Gall & Bakar, 2002; Sorensen & Kennedy, 1984), como se espera da teoria genética quantitativa, uma vez que a correlação

entre o valor fenotípico e o mérito genético diminui com a diminuição da herdabilidade (Falconer & Mackay, 1996).

A única desvantagem do método sobre a seleção massal é a de necessitar de conhecimento de *pedigree* das linhagens cultivadas, que pode ser obtido com o uso de técnicas de marcação genética (Gall & Bakar, 2002).

3.3- As linhagens de tilápias nilóticas cultivadas no país

A primeira importação oficial de tilápias nilóticas para o Brasil aconteceu em 1971, proveniente de Bouaké, na Costa do Marfim (Nugent, 1988). A segunda é originária da Alexandria, no Egito (Delta do Nilo), inicialmente introduzida no Japão, de lá para a Tailândia e, em 1996, para o Brasil (Zimmermann, 1999).

Agnése et al., (1997) verificaram três agrupamentos gerados por RFLP de DNA mitocondrial entre as populações africanas, com níveis de polimorfismo diferenciados entre os grupos, constituídos por representantes da drenagem do oeste do continente, dos canyons da Etiópia e das drenagens do rio Nilo (Figura 2). O grupo que colonizou os rios da Costa do Marfim, onde a espécie não é nativa, originou-se de estoques gerados pelo cruzamento intraespecífico de linhagens do rio Nilo e do rio Volta (drenagem para o Oceano Índico).

Os indivíduos da primeira importação são, portanto, resultantes do cruzamento de populações pertencentes aos grupos drenagem do oeste do continente africano e o das drenagens do rio Nilo, seguida de introdução em ambientes de cultivo comercial e escapes para o ambiente natural. A segunda importação originou-se do grupo dos canyons da Etiópia, e foi cultivada por aproximadamente 30 anos antes de ser introduzida no Brasil. Fenômenos de deriva genética, hibridação com outras espécies e/ou a seleção natural, determinados por condições ambientais diferenciadas, provavelmente causaram diferenciação genética entre as populações das duas importações oficiais, mesmo antes de sua chegada ao país.

Não se conhece o número de exemplares da primeira importação oficial para Pentecostes, no Ceará (03°47'34"S e 039°16'30"W), nem o dos que foram tranferidos de lá para os demais estados do país. A segunda importação constou de 20.800 animais para o estado do Paraná (Moreira, 1999).

Figura 2- Área de ocorrência natural de *Oreochromis niloticus*. 1- grupo das drenagens do rio Nilo; 2- grupo dos canyons da Etiópia e 3- grupo da drenagem do oeste do continente



Após o estabelecimento das linhagens em seus locais de cultivo, vários fatores ambientais e de manejo devem ter contribuído para a deriva genética diferencial destas linhagens. Contudo, é preciso ressaltar o efeito climático entre eles. No Nordeste brasileiro, a espécie reproduz-se ao longo de todo o ano. Estas condições térmicas se aproximam das do habitat natural original da espécie, minimizando a possibilidade de um reprodutor em particular não contribuir para a geração seguinte. Já em latitudes mais elevadas, a amplitude de variação térmica nictemeral e sazonal é mais pronunciada, inclusive inibindo a reprodução e crescimento da espécie durante alguns meses por ano. Cada matriz reproduz-se menos vezes por ano e as proles têm maior possibilidade de sofrer mortalidade massiva em situações de alta variação térmica nictemeral, principalmente no final do outono e início da primavera. Os animais mais jovens são particularmente sensíveis às mudanças térmicas porque ocupam os estratos superiores e bordas dos viveiros nas fases iniciais de vida. Nesta situação, aumenta a probabilidade de um reprodutor em particular deixar de contribuir para a formação da geração seguinte.

Não há registros sistemáticos e confiáveis sobre processos eventuais de introdução de animais em pisciculturas comerciais no país, mas há evidências de endogamia nos estoques. Moreira (1999) estudou polimorfismos de marcadores microssatélites para determinar a variabilidade genética de sete estoques cativos de *O. niloticus* utilizados em criações do sul do país, sendo cinco provenientes da primeira importação oficial e dois da segunda. As heterozigoses dos estoques da primeira importação variaram de 0,0 a 0,107, enquanto que as da segunda importação, apresentaram valores de 0,58 a 0,606. Também detectaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg entre as frequências de alelos de loci microssatélites das linhagens da primeira importação oficial.

3.4- Subsídio à construção de um programa de seleção assistida por marcadores moleculares para as tilápias nilóticas do Brasil

Um programa efetivo de seleção genética assistida por marcadores moleculares para *O. niloticus* no Brasil deve ser conduzido em duas etapas principais. Inicialmente será necessário constituir e manter um banco genético adequado para este fim. Numa segunda etapa, os vários programas de melhoramento para características específicas deverão ser conduzidos a partir deste plantel.

Diante das evidências de estreitamento da base genética de nossas linhagens, já relatadas nos itens anteriores, deverá haver um estudo da variabilidade genética das linhagens disponíveis, o que possibilitará a verificação da adequação de uso cada um deles para a formação de um estoque híbrido intraespecífico. Se duas das linhagens mostrarem diferenças genéticas não significativas entre si, apenas uma delas deverá ser utilizada. Se as linhagens nacionais mostrarem-se indistintas e/ou de pequena variabilidade, isso indicará a necessidade de nova(s) importação(ões) de outras linhagens para a formação deste banco genético.

Para tanto, deverão ser obtidas linhagens que apresentem diferenças de histórico de fundação e manutenção, preferencialmente de diferentes importações e cultivadas sob diferentes condições ambientais e/ou de manejo. Este procedimento visa maximizar distância genética entre elas, visando o aumento da heterose potencial para várias características.

Deverão ser realizadas biópsias em indivíduos destas linhagens, para sua caracterização por marcadores moleculares de dois tipos. Os marcadores moleculares dominantes deverão ser utilizados para aferir a variabilidade genética entre e dentro das linhagens. Esta escolha se deve à maior cobertura genômica dos marcadores RAPD e AFLP em relação aos marcadores codominantes, que caracterizam apenas regiões não codificantes do DNA.

Uma vez selecionadas as linhagens a serem utilizadas na composição do banco genético, sua manutenção deverá ser feita considerando aspectos genéticos e de manejo ambiental e alimentar, potencialmente influentes na variabilidade genética e na modulação ambiental sobre fenótipos plásticos.

Os aspectos de manejo genético incluem a segregação física de linhagens, a identificação individual dos reprodutores, o monitoramento da endogamia dentro de cada uma das linhagens e o número mínimo de reprodutores efetivamente utilizados na renovação do plantel de cada uma delas. Cada linhagem deverá ser mantida em separado, porque fenótipos zootecnicamente importantes podem apresentar efeitos significativos de linhagem. Nestes casos, a seleção de reprodutores para o subprograma de melhoramento desta(s) características(s) deverá levar em conta também a sua linhagem de origem, e não apenas o seu fenótipo.

A identificação individual dos reprodutores é importante por dois motivos. O primeiro é registrar a linhagem de origem do indivíduo, para identificar possíveis escapes, equívocos de manejo ou acidentes naturais resultantes em mistura de linhagens, de modo a poder segregá-las novamente. O segundo é permitir a aferição do sucesso reprodutivo do indivíduo (Jackson et al. 2003) e o cálculo da herdabilidade das características em estudo (Dupont-Nivet et al. 2002). Esta identificação deverá ser feita de duas formas, fisicamente com PIT *taggs* (Passive Integrated Transponders) e por marcadores genéticos codominantes, como os microssatélites (Volckaert & Hellemans, 1999). As marcas físicas são utilizadas para a identificação do reprodutor a campo, e as marcas genéticas são necessárias para inferência de paternidade das proles geradas. O cruzamento das informações das duas marcas permite identificar que reprodutores selecionar em testes de progênie e qual o *tagg* do peixe a ser selecionado à campo.

Os marcadores genéticos possibilitam delineamentos de seleção para melhor identificação de parâmetros genéticos, em combinação com ferramentas de seleção familiar, combinada ou do tipo BLUP (best linear unbiased predictor), livre do vício de efeitos ambientais através do cultivo comunal (Vandeputte, 2003).

O monitoramento de endogamia poderá ser feito utilizando-se os marcadores dominantes, do tipo RAPD ou AFLP, para proporcionar uma cobertura genômica o mais ampla possível. A aferição “a posteriori” de paternidade das sua proles por marcadores do tipo codominante. O número mínimo de indivíduos de cada uma das linhagens mantidas

deverá inicialmente seguir as recomendações de Gall & Bakar (1999) para trutas, de 25 machos e 100 fêmeas utilizadas para a formação de nova geração de estoque de cada uma das linhagens. O monitoramento da variabilidade genética geração a geração possibilitará o ajuste deste número mínimo para a espécie.

Os aspectos de manejo ambiental e alimentar devem levar em conta os requerimentos específicos de *O. niloticus*. Sendo um peixe tropical, deve-se providenciar para que a temperatura da água não ultrapasse os limites de conforto específico em nenhum dos sentidos. Isso pode ser obtido pela escolha de estação de manutenção do banco genético em região de clima quente ou pelo uso de estufas em outras regiões. Sendo animais planctófagos, de hábito lântico e comportamento gregário, estas tilápias devem ser cultivadas comunalmente, em viveiros externos e ricos em plâncton, dentro de gaiolas de tela, preferencialmente posicionadas em um mesmo viveiro. Esta última recomendação tem quatro motivos principais: diminui as diferenças ambientais entre as gaiolas (linhagens), evita a entrada de predadores e competidores de diâmetro maior que o da malha, dificulta o escape de reprodutores e a entrada de coespecíficos admitidos pelo sistema de abastecimento d'água, e possibilita a coleta freqüente de ovos e embriões de forma fácil, rápida e pouco traumática (Little et al., 2000). Além disso, permite a implantação de um sistema de manejo reprodutivo em que as fêmeas incubantes sejam transferidas para gaiolas adjacentes para condicionamento pós-desova, aumentando sua produtividade (Little et al., 2000).

A manutenção das gaiolas deverá ser feita de maneira a perturbar minimamente os reprodutores. A rotina de colocação de outra gaiola externamente à de cultivo, e remoção cuidadosa desta gaiola para limpeza, inspeção e eventuais consertos evita o entupimento da malha com epibiontes, a conseqüente deterioração da qualidade de água decorrente deste entupimento e a maioria dos acidentes de escape por rompimentos progressivamente ampliados da malha da rede.

O manejo alimentar deve incluir alimento seco como complemento alimentar ao plâncton natural, para evitar deficiências nutricionais. Bhujel et al. (2001) verificou que a

fecundidade de fêmeas de *O. niloticus* responde positivamente à oferta de alimento artificial com fonte de proteína animal. Dois fatores são importantes no manejo alimentar de reprodutores de tilápias em gaiolas: a uniformidade do manejo entre as gaiolas (linhagens) e o tipo de processamento de alimento. As comparações de taxas de fecundidade, crescimento e mortalidade entre linhagens são prejudicadas por desuniformidade de manejo, quer ambiental, quer nutricional, de forma que os procedimentos devem ser padronizados para todas as gaiolas e viveiros. A ração utilizada deverá ser extrusada para possibilitar a visualização de alimento não ingerido e facilitar o ajuste da taxa e frequência de disponibilização de ração dos reprodutores.

As linhagens deverão ser adaptadas por pelo menos uma geração às condições de cultivo dos ambientes onde os testes ocorrerão, de modo que os testes de progênie sejam conduzidos com proles oriundas de reprodutores gerados, incubados e manejados até a maturidade em condições de manejo ambiental e alimentar tão semelhantes quanto possível.

Todo este conjunto de procedimentos de manejo das linhagens de reprodutores visa, por um lado, evitar deriva e seleção genética não intencionais, potencialmente resultantes de condições inadequadas de cultivo; e, por outro, minimizar a interferência da plasticidade fenotípica sobre a aferição de fenótipos de interesse nos reprodutores.

3.4.1- A seleção de características para melhoramento e análise de ligação

Para a condução de programas de melhoramento genético a partir do banco genético formado, a primeira etapa é a seleção da(s) característica(s) a ser(em) melhorada(s). Deve se tratar de fenótipo desejável do ponto de vista zootécnico, cujo melhoramento resulte em lucros aos produtores que justifiquem o investimento no programa de melhoramento, mas também é necessário que ele seja passível de melhoramento genético por seleção.

Para tanto, é essencial que ele apresente variabilidade fenotípica dentro do banco genético disponível, que não seja ligado à fenótipos indesejáveis (como baixas taxas de

crescimento, sobrevivência ou fecundidade), e que apresente herdabilidade significativamente diferente de zero.

Idealmente, o fenótipo deve ser de aferição fácil, rápida e pouco traumática. Em algumas situações, os fenótipos não podem sequer ser aferidos sem o sacrifício do animal, como é o exemplo do rendimento de filé e carcaça. Nestes casos, é necessário encontrar fenótipo(s) relacionado(s) ao desejado, cuja aferição possa ser realizada de forma ideal. No nosso exemplo, a forma do corpo pode ser utilizada como fenótipo de seleção indireta (Cibert et al., 1999; Hockaday et al., 2000).

O fenótipo candidato à seleção deverá ser aferido em amostras de ambos os sexos de cada uma das linhagens que compuser o banco genético, para a verificação de existência de variabilidade significativa dentro e entre cada um deles. Estes resultados definirão se a seleção deverá levar em conta os aspectos de linhagem e/ou sexo (caso se detecte efeitos significativos destas variáveis) ou se a seleção será feita levando em conta apenas o valor individual do reprodutor e seus marcadores ligados à característica.

Um teste de correlação entre os valores aferidos de fenótipos e os marcadores moleculares disponíveis identificarão os marcadores candidatos à análise de ligação nos testes de progênie.

A análise de segregação de marcadores e fenótipos é a ferramenta clássica para investigar a hipótese de ligação entre marcadores de DNA e QTL's, e os modelos mistos de relacionamento unigeracional entre marcadores e fenótipos podem dar apenas indicações neste sentido. Além disso, pode haver migração de bandas distintas para uma mesma posição no gel, resultando na atribuição a um único marcador de um coeficiente que deveria estar sendo calculado independentemente para cada um dos fragmentos de mesmo comprimento. Para testar esta hipótese, se deve utilizar a técnica SCAR-RAPD – Sequence Characterized Amplified Region RAPD (Bardacki & Skibinski, 1999), para obter marcadores codominantes a partir destes fragmentos e conduzir uma análise de segregação multigeracional.

3.4.2- A condução dos programas de seleção para características específicas

Para cada subprograma de melhoramento de uma característica específica, o fenótipo dos reprodutores deve ser aferido e a seleção deve ser feita de acordo com metodologia e critérios iguais entre linhagens, para evitar a confusão entre efeitos de linhagem e de método de aferição de fenótipo.

Para os testes de progênie, também é necessário adotar procedimentos de uniformização semelhantes aos dos reprodutores e com o mesmo objetivo, que é o de controlar os efeitos não genéticos sobre as características sob seleção. As diferenças entre o manejo de reprodutores e o de suas proles estão relacionadas ao papel de cada um dos grupos no programa de seleção. Enquanto os reprodutores têm seu valor fenotípico e marcadores genéticos aferidos para informar sobre seu valor como reprodutor em cruzamentos futuros, as proles são utilizadas apenas para aferir este valor genético de seus parentais, através da herdabilidade das características sob seleção, que é calculada com as informações sobre seu fenótipo e identificação de seus parentais.

Isso determina, em última instância, as condições em que devem ser cultivadas as proles. Um subprograma direcionado para sobrevivência diante de características ambientais específicas ou de desafio por agentes patogênicos bióticos, por exemplo, necessita de condições de cultivo propositalmente limítrofes. Os que se direcionam para características zootécnicas de animais cultivados em condições padrão de piscicultura devem prever ambiente manejado para que nenhum dos requerimentos ambientais deixe de ser atendido a cada momento do crescimento dos animais.

Levando em conta os aspectos levantados de variáveis potencialmente interferentes em programas de melhoramento genético, é possível listar um conjunto de procedimentos de delineamento destes programas, para minimizar a interferência da plasticidade fenotípica sobre a aferição de ganhos genéticos.

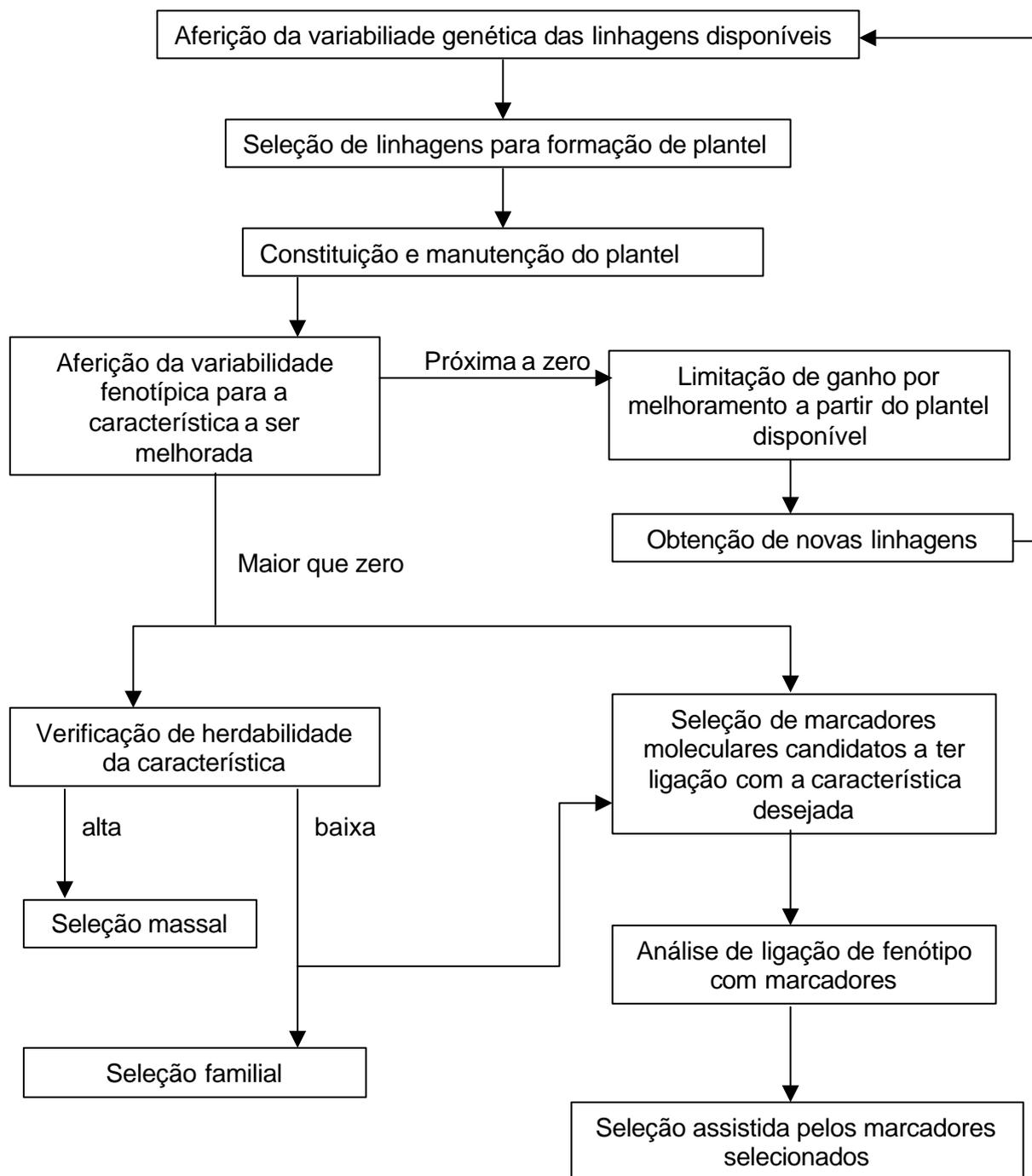
Os testes de progênie devem ser conduzidos em lotes de idade e condições de manejo tão semelhantes quanto possível, para minimizar o efeito da plasticidade fenotípica

sobre o fenótipo. Isto garante que todos os animais de um mesmo lote sejam expostos a uma mesma variação nictemeral e sazonal de variáveis de qualidade de água, de taxa de renovação, de velocidade de corrente, de qualidade e quantidade de patógenos oportunistas, de tipo de manejo ambiental e alimentar, e de quaisquer outros fatores ambientais interferentes no fenótipo. Um monitoramento ambiental das unidades de cultivo comunal de cada lote gera uma base de dados cujas variáveis devem ser incluídas em modelo comum de aferição de efeitos genéticos e da sua modulação ambiental sobre o fenótipo. Desta análise, é possível separar efeitos de fato genéticos, que devem ser utilizados na seleção de reprodutores, daqueles resultantes de efeitos ambientais e de suas interações com o genótipo. O modelo de predição dos fenótipos deve incluir estas variáveis, para quantificar em separado os seus efeitos e os efeitos genéticos sobre a variável resposta (Gall & Bakar, 2002).

Atualmente é possível diminuir a desuniformidade de condições ambientais dentro de um lote com a utilização de marcadores moleculares dominantes para diferenciar “a posteriori” os indivíduos de várias proles cultivadas comunalmente (Garcia de Leon et al., 1998). Este procedimento proporciona uma atribuição inequívoca de parentais aos indivíduos cultivados desde os primeiros estágios de vida, sem a necessidade de marcação física.

Um outro fator importante no melhoramento por seleção genética é a possibilidade de ligação entre características fenotípicas zootécnicas distintas. Se houver correlação suficientemente forte entre dois fenótipos, a seleção para um deles resultará em seleção também para o outro (Kause et al., 2003). Além da taxa de crescimento em peso, outros fenótipos devem ser considerados na condução de um programa de melhoramento, para que este não resulte apenas em peixes com maior rendimento de carcaça e filé, mas em animais que efetivamente apresentem vantagens sobre os demais, em termos de lucratividade da atividade e aceitação do consumidor. São exemplos destes fenótipos as taxas de sobrevivência e de fecundidade e o teor de gordura da musculatura dorso-lateral dos animais selecionados.

3.4.3- O fluxograma do processo



4 – Perspectivas para o melhoramento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) a partir da combinação de linhagens. I - variabilidade genética

Artigo a ser submetido ao Journal of the World Aquaculture Society

Resumo

O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial de linhagens cultivadas de tilápias (*Oreochromis niloticus*), visando a obtenção de híbridos intraespecíficos, para uso em programas de melhoramento genético desta espécie. A variabilidade genética entre e dentro de quatro linhagens comerciais foi verificada utilizando-se o índice de similaridade e as distâncias genéticas, verificados a partir de dados de bandas obtidas por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Três *primers* foram utilizados, gerando 42 bandas, sendo 40 delas polimórficas. As estimativas de heterozigoses não viciadas variaram de 0,29 a 0,32 entre as linhagens, apresentando diferença não significativa ($P > 0,90$). As dissimilaridades dentro das linhagens variaram de 0,77 a 0,82 e entre as linhagens, de 0,74 a 0,79. Os valores de dissimilaridades corrigidas entre linhagens foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$). Foi verificado que a dissimilaridade mostrou-se mais adequada à aferição de variabilidade genética dentro de linhagens cultivadas de peixes exóticos que a heterozigose para este tipo de marcador molecular. Os fenogramas obtidos a partir das distâncias e das dissimilaridades entre linhagens, apresentaram resultados coerentes entre si e evidenciaram a adequação da utilização de todas as linhagens em estudo para hibridação visando a obtenção de efeitos heteróticos e o aumento de variabilidade genética intraespecífica. Foram obtidas indicações de marcadores possivelmente ligados à tolerância às condições de cultivo em regiões temperadas.

Introdução

A resposta à seleção genética é limitada pelo nível de variação genética (Falconer & Mackay, 1996). Uma importante diferença entre peixes e animais terrestres para o melhoramento genético é a de que os peixes têm maiores níveis de variação genética, e, portanto mais alcance para seleção do que a maioria dos mamíferos ou aves (Foresti, 2000). No entanto, a implantação de programas de melhoramento a partir de uma única linhagem cativa pode ser prejudicada pela sua própria restrição de variabilidade genética. Uma estratégia para contornar este problema é a formação de estoques híbridos intraespecíficos que recuperem a perda de alelos pelas linhagens fundadoras em seus processos de deriva e seleção diferenciais.

Os polimorfismos de DNA, como os microssatélites, AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphism) e RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA) têm sido amplamente utilizados para aferição de diversidade genética em organismos aquáticos (Shikano & Taniguchi 2002). Eles estão presentes em todos os tipos de tecidos e apresentam maior variação genética e maior sensibilidade e especificidade que outros marcadores moleculares, como as isozimas (Asensio et al. 2001).

Como qualquer outro tipo de marcador molecular, o RAPD apresenta limitações e vantagens, que resultam em aplicabilidade recomendada em casos específicos. A técnica gera uma quantidade considerável de dados em relação ao custo das análises. Por outro lado, Kimberling et al. (1996) afirmam que a característica dos marcadores dominantes pode fazer com que a diversidade genética seja subestimada, quando os heterozigotos não são detectados, ou então superestimada, quando a frequência das bandas detectadas for menor que 50%. No entanto, consideram que o RAPD gera estimativas úteis de variação genética quando a interpretação dos dados leva em consideração suas características.

Quesada & Cenis (1995) apontam três níveis de interpretação para os polimorfismos obtidos com marcadores RAPD: a) como ferramenta taxonômica; b) para estudar o relacionamento genético entre linhagens; c) para a identificação de linhagens. Esta

versatilidade na identificação de variabilidade, tanto entre linhagens, quanto entre taxa mais diferenciados, vem da amplitude da cobertura genômica deste tipo de marcador. Os loci não codificantes são geralmente mais úteis para a caracterização intraespecífica, enquanto que polimorfismos em loci marcadores codificantes freqüentemente correspondem a padrões genéticos taxa-específicos.

Gomes et al. (1998) utilizaram marcadores RAPD para estudar populações de peixes *Hirundichthys affinis*. Os perfis de bandas obtidos também evidenciaram alto índice de polimorfismo intraespecífico, revelando inclusive marcadores diagnósticos de populações e de sub-regiões geográficas. Estes resultados foram inteiramente consistentes com os obtidos por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) para os mesmos peixes (Gomes et al., 1996).

O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial genético de linhagens cultivadas no Brasil para fins de formação de plantel híbrido intraespecífico a ser utilizado em programa de melhoramento genético. Especificamente, utilizamos marcadores moleculares do tipo RAPD para aferir a variabilidade intraespecífica dentro e entre quatro linhagens comerciais provenientes de diferentes estoques cultivados no país.

Materiais e Métodos

Foram utilizados representantes de quatro linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): 1) SP, da Estação de Piscicultura de Barra Bonita (22°29'41"S; 048°33'29"W); 2) PE, da Base de Piscicultura do Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco (08°03'14"S; 034°52'52"W); 3) SC, da Fundação 25 de Junho, em Joinville (26°18'16"S; 048°50'44"W); e 4) PR, da ALEVINOPAR – Associação dos Alevinocultores do Paraná – (24°42'49"S; 53°44'35"W). As três primeiras linhagens citadas são provenientes da primeira importação oficial de tilápias para o Brasil e a última linhagem da segunda importação oficial.

As linhagens foram mantidas separadas em tanques rígidos tipo *raceway*, de 50 m³, na Fazenda Jurema, em Macatuba (SP) (22°30'08"S; 048°42'41"W). De cada linhagem,

quinze exemplares maduros de cada sexo foram coletados ao acaso e anestesiados com benzocaína para biópsia da região posterior da nadadeira caudal. Amostras de aproximadamente 50 mg foram conservadas em álcool 95% por 3 dias, transferidas para álcool comercial e mantidas sob refrigeração.

A extração do DNA genômico total foi feita com o Wizard Genomic DNA Purification kit, comercializado pela Promega. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose (1%) e quantificado por espectrofotometria. Para a escolha dos primers a serem utilizados, amostras de DNA de dois indivíduos (fêmeas da linhagem PE) foram amplificadas independentemente com seis primers adquiridos da empresa Amersham Pharmacia Biotech. Os primers utilizados foram denominados, por número de ordem da amplificação, de 1 a 6 e suas seqüências de bases foram respectivamente: GGTGCGGGAA, GTTTCGCTCC, GTAGACCCGT, AAGAGCCCGT, AACGCGCAAC e CCGTCAGCA, da extremidade 5' para a 3'. As reações de amplificação foram realizadas num ciclador térmico de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando-se 25µl de uma solução contendo 25 ng de DNA genômico, 25 pmol do primer, AmpliTaq™ DNA polymerase e Stoffel fragment, 0,4 mM de cada dNTPs, 2,5 mg BSA e 2,5 mL de tampão (3 mM MgCl₂, 30 mM KCl e 10 mM Tris, pH=8.3). Cada amplificação consistiu da denaturação inicial por 1 minuto a 95°C seguida de 45 ciclos de fases: 95°C por 1 min, 36°C por 1 min e 72°C por 2 min. Os produtos foram separados em gel de agarose a 2%. Para a aferição do comprimento das bandas separadas, foi utilizada solução de fragmentos marcadores com comprimento de 100 a 12.000 pares de bases (pb) no mesmo gel. Os géis foram digitalizados e as bandas tiveram seu comprimento estimado com o programa Kodak Digital Science 1D. O processo foi repetido para o DNA genômico de todos os animais biopsiados, utilizando-se os três primers que apresentaram maior número de bandas polimórficas na amostra inicial.

De acordo com as recomendações de Williams et al. (1990), nenhuma tentativa de identificação de heterozigotos pela intensidade de cor da banda foi feita, de modo que indivíduos portadores da banda em um dos alelos (+/-) foram computados conjuntamente com os homozigotos para o fragmento (+/+). Uma matriz foi construída com dados de cada

indivíduo em uma linha e com colunas referentes à linhagem e a cada uma das bandas individuais observadas.

Duas análises comparativas foram conduzidas a fim de melhor elucidar os resultados. A primeira utilizou o método de Nei (1978) para o cálculo da heterozigose pela frequência de homozigotos recessivos (-/-) e correção para o viés de pequenas amostras. As identidades genéticas e distâncias genéticas entre cada par de linhagens foram calculadas a partir destas heterozigoses não viciadas por locus e a partir destas distâncias foi gerado um fenograma pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Averages). As diferenças entre os valores de heterozigose não viciadas por locus entre linhagens foram testadas pela análise não paramétrica de Kruskal-Wallis.

A segunda análise utilizou o método de Lynch (1990), e constou do cálculo da similaridade média dentro das linhagens, a partir do coeficiente de similaridade entre cada par de indivíduos.

O coeficiente de similaridade utilizado incorpora o menor vício na similaridade de organismos relacionados que os coeficientes de emparelhamento simples e o de Jaccard, duas opções de coeficientes de similaridade, (Lamboy, 1994).

Para cada linhagem, a similaridade média (S_x) foi calculada como a média das similaridades entre os indivíduos dessa linhagem. Da mesma forma, as similaridades médias entre duas linhagens (S_{xy}) foram calculadas pela média das similaridades entre os pares formados por um indivíduo de cada uma delas. As dissimilaridades genéticas dentro de cada linhagem e entre cada par de linhagens foram calculadas segundo Caccone et al. (1997).

Uma comparação foi feita entre os valores de dissimilaridade genética aferidos dentro de cada linhagem e entre indivíduos de diferentes linhagens pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

As dissimilaridades médias entre linhagens foram corrigidas pelo método de Nei (1987 apud Koh et al. 1999) para a construção de outro fenograma pelo método UPGMA, para ser comparado ao construído com os valores de distâncias genéticas.

Resultados

A Tabela 1 mostra o número de bandas amplificadas para cada primer testado para amostras de DNA dos dois indivíduos escolhidos aleatoriamente. Pode-se observar que os primers 2, 4 e 5 apresentaram maior polimorfismo, sendo portanto os escolhidos para as análises posteriores.

Tabela 1. Número de bandas amplificadas por primer para dois exemplares de *Oreochromis niloticus* aleatoriamente escolhidos.

Primer	número de bandas amplificadas		máximo
	Peixe A	Peixe B	
1	4	9	9
2	12	9	12
3	9	8	9
4	11	11	11
5	12	9	12
6	7	9	9
Média +/- desvio padrão da média			10,3+/-1,5

A amplificação das amostras de DNA genômico total dos indivíduos com os primers escolhidos resultou em 42 bandas amplificadas de comprimento inferior a 1.5 kb (quilobase). As bandas geradas por primer, seus respectivos comprimentos e valores de heterozigose não viciada são apresentadas na Tabela 2. Nenhuma diferença significativa ($P > 0.95$) foi detectada entre os valores de heterozigose por linhagem.

Por erros assistemáticos, um dos 120 animais não sofreu biópsia. As amplificações com os primers 2, 4 e 5, não geraram produtos de amplificação respectivamente para um, treze e doze indivíduos. Duas amostras não geraram produtos de amplificação simultaneamente para os primers 1 e 2. Devido a isso, não foi possível calcular o coeficiente de similaridade entre 26 pares de animais, que representaram 0,36% do total pares de dados possíveis. O número mínimo de indivíduos utilizados para o cálculo da heterozigose não viciada por linhagem foi de 23 (para as bandas do primer 5 da linhagem SP), representando 76,7% da amostra da linhagem.

Tabela 2- Heterozigoses não viciadas calculadas a partir da proporção de indivíduos homocigotos (-/-) para quatro linhagens de *Oreochromis niloticus*.

	Banda		Heterozigose não viciada				Linhagens grupadas
	Comprimento (bp)	Primer	Linhagens				
			SP	SC	PE	PR	
1	220	5	0.3815	0.3167	0 ^p	0.4087	0.4782
2	270	5	0 ^p	0.3167	0.3077	0 ^p	0.2391
3	300	5	0.3815	0.4972	0.4440	0.4804	0.4904
4	350	5	0.5057	0.3611	0.4315	0.3983	0.4245
5	400	5	0.5088	0.3167	0.3941	0.4574	0.4399
6	433	5	0.4970	0.5078	0.4440	0.4087	0.4725
7	483	5	0.5057	0.4037	0.5086	0.4574	0.4912
8	534	5	0.2830	0.1449	0.3139	0.1856	0.2311
9	556	5	0.3815	0.4107	0.3888	0.4939	0.4190
10	613	5	0.4717	0.5078	0.4933	0.4939	0.5019
11	650	5	0.5057	0.4854	0.4941	0.4087	0.5014
12	736	5	0.4101	0.4705	0.3941	0.5037	0.4950
13	882	5	0.5109	0.5078	0.3888	0.5090	0.4928
14	1000	5	0.4592	0.3868	0.3652	0.4804	0.4190
15	1115	5	0.1287	0.3053	0.1983	0.0388	0.1728
16	1350	5	0.3506	0.2122	0 ^a	0.3983	0.2392
17	1450	5	0.0869	0.1790	0 ^a	0 ^a	0.0658
18	217	2	0.3988	0 ^p	0.4715	0.4897	0.4689
19	300	2	0.3988	0.5028	0.4398	0.4897	0.4910
20	378	2	0 ^p	0.3035	0.3035	0 ^p	0.2291
21	483	2	0.4484	0.3035	0.4914	0.4788	0.4473
22	518	2	0.3121	0 ^p	0.4403	0 ^p	0.4626
23	650	2	0.3121	0 ^p	0.3035	0 ^p	0.2291
24	753	2	0.0714	0.1921	0.0666	0.1399	0.1173
25	800	2	0 ^a	0.1307	0.1921	0.0714	0.1011
26	850	2	0.4788	0.4403	0.3047	0.4484	0.4842
27	936	2	0.4421	0.4715	0.4858	0.3121	0.5022
28	1000	2	0.4897	0.4914	0.5079	0.3988	0.4981
29	1163	2	0.3121	0.4398	0.3896	0 ^p	0.3529
30	1371	2	0.2050	0.4403	0.4858	0 ^a	0.3164
31	1464	2	0.0714	0.0666	0.1618	0.0360	0.0846
32	300	4	0 ^p	0 ^p	0 ^p	0 ^p	0 ^p
33	325	4	0.4442	0.0689	0.1185	0.3156	0.2451
34	385	4	0.0769	0 ^a	0.0799	0.2530	0.1014
35	450	4	0 ^p	0 ^p	0 ^p	0 ^p	0 ^p
36	500	4	0.1856	0.0689	0.1562	0.0388	0.1103
37	550	4	0 ^p	0 ^p	0 ^p	0.3215	0.1762
38	650	4	0.4861	0.5075	0.4621	0.5021	0.4937
39	690	4	0.4087	0.5046	0.4898	0.4574	0.4937
40	730	4	0.4442	0.4814	0.4140	0.4087	0.5023
41	850	4	0.4861	0.4941	0.4140	0.5021	0.4774
42	~950	4	0.4087	0.4751	0.4898	0.5090	0.4963
Média			0,3155	0,3027	0,3151	0,2928	0,3442
Desvio padrão			0,1841	0,1911	0,1776	0,2057	0,1693
% bandas polimórficas			85,71	83,33	85,71	78,57	95,24

OBS: as letras "p" e "a" representam respectivamente bandas presentes e ausentes. SP =

São Paulo; SC = Santa Catarina; PE = Pernambuco, PR = Paraná.

A Tabela 3 apresenta os valores das dissimilaridades genéticas não corrigidas pelo método de Nei (1987 apud Koh et al. 1999) dentro e entre as linhagens, com os resultados da análise de Kruskal-Wallis e comparações de dois a dois tratamentos para grandes amostras ($P < 0.05$).

Tabela 3- Dissimilaridades genéticas não corrigidas entre indivíduos dentro de cada linhagens e entre indivíduos de linhagens diferentes de *Oreochromis niloticus*.

Linhagens		Dissimilaridades não corrigidas					
SP	PR	0.26153	a*				
PR	SC	0.239567		b			
PE	PR	0.231942		b	c		
	PR	0.230786			c	d	
SP	PE	0.222565			c	d	e
SP	SC	0.212477				d	e f
PE	SC	0.210024					e f
	SP	0.205719					f
	PE	0.195188					f
	SC	0.176219					g

* Letras diferentes indicam dissimilaridades estatisticamente diferentes pelo teste de de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). SP = São Paulo; SC = Santa Catarina; PE = Pernambuco, PR = Paraná.

As Figuras 1 e 2 mostram os fenogramas de distâncias genéticas e de dissimilaridades genéticas corrigidas corrigidas pelo método de Nei (1987 apud Koh et al. 1999) entre as linhagens.

Figura 1 – Fenograma de distâncias genéticas entre as linhagens de *Oreochromis niloticus*.

SP = São Paulo; SC = Santa Catarina; PE = Pernambuco, PR = Paraná.

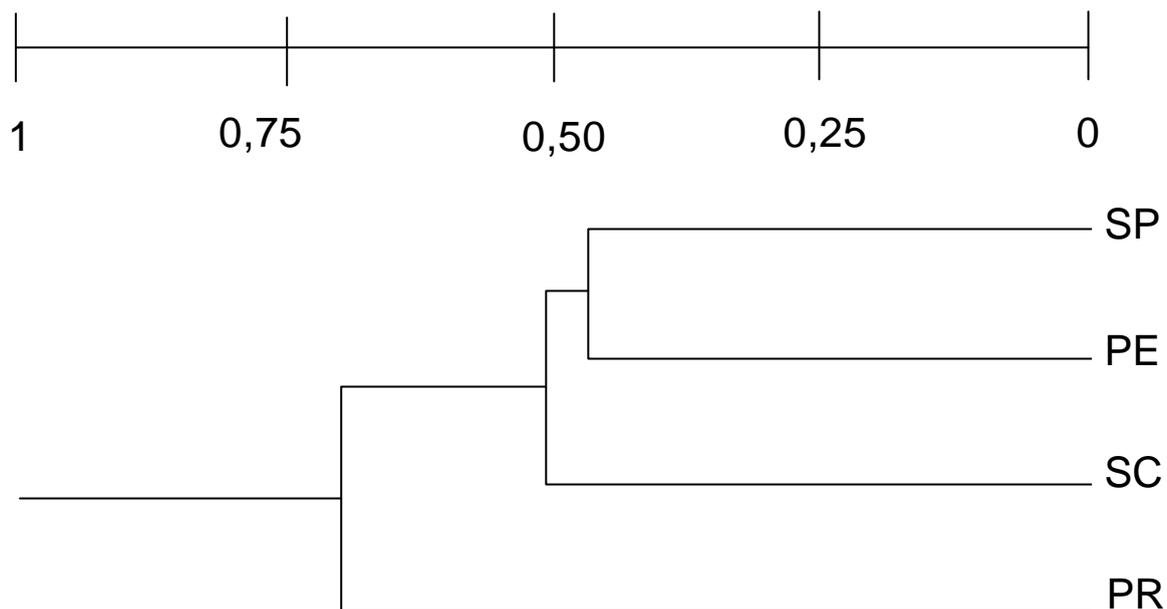
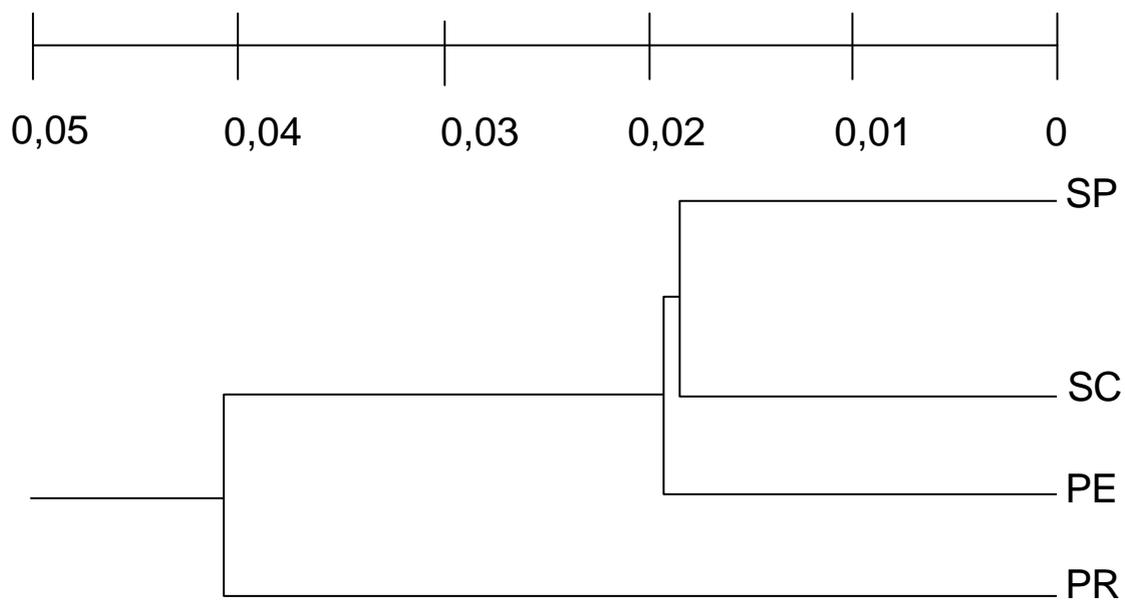


Figura 2 – Fenograma de dissimilaridades genéticas entre as linhagens de tilápia

(*Oreochromis niloticus*). SP = São Paulo; SC = Santa Catarina; PE = Pernambuco, PR =

Paraná.



Discussão

Foi possível observar um elevado nível de polimorfismo, superior a 10 bandas por primer na Tabela 1. Estes resultados corroboram as observações de Caccone et al. (1997), que verificaram que o uso de padrões RAPD no estudo de diferenciação genética resulta em variação intrapopulacional quase tão alta quanto a interpopulacional.

Na Tabela 2, é possível verificar que os valores do desvio padrão da média das heterozigoses não viciadas se aproximam de dois terços do valor da média. Apenas duas bandas monomórficas para os animais em estudo têm possibilidade de ser espécie-específicas (4,8%), caso se confirme seu monomorfismo nas outras linhagens da espécie.

Além dos aspectos ligados à adequação do marcador para os níveis de distanciamento genético entre os grupos em estudo, também é necessário considerar as fontes de erro sistemático ligadas à técnica, que compreendem a possibilidade de formação de heteroduplexes e de obtenção de bandas eventualmente não detectadas, devido à pequena quantidade de produtos de amplificação.

A formação de heteroduplexes entre produtos amplificados por PCR gera o “aparecimento” de bandas não parentais em proles (Elo et al., 1997). Em condições de baixa estringência, pode haver pareamento de filamentos não homólogos, formando heteroduplexes em lugar dos homoduplexes esperados (Leoni et al., 2003). Estes fragmentos migram mais lentamente no gel do que seria esperado para um homoduplex de mesmo comprimento (Turner et al., 2002) e são equivocadamente computados como bandas adicionais, de comprimento maior que os dos filamentos não homólogos que o originaram. Neste estudo, o anelamento ocorreu 4° C acima da temperatura ideal para o anelamento dos primers (calculada com base em seu conteúdo de bases), de forma que a possibilidade de ocorrência de heteroduplexes foi minimizada metodologicamente.

Seis bandas maiores que 1.5 kb foram excluídas da análise, de acordo com as recomendações de Liu et al. (1999), que recomendam a utilização de bandas na faixa de 400 a 1.500 pb (pares de bases), que mostraram ser mais reproduzíveis e herdadas de modo mendeliano.

As heterozigoses médias não viciadas das linhagens em estudo estiveram entre 0.29 e 0.32, não apresentando diferenças significativas ($P > 0.95$) entre si.

Estes resultados contrastam com os de Moreira et al. (2000), que utilizaram quatro loci microssatélites para estudar linhagens de mesma origem que as linhagens SC e PR, também utilizadas no presente estudo, e verificaram heterozigoses observadas significativamente maiores das linhagens da segunda importação do que naquelas derivadas da primeira importação. Por outro lado, a Tabela 3 mostra que os valores de dissimilaridade genética dentro das linhagens apresentaram diferenças significativas entre si ($P < 0.05$), e coerentes com os resultados obtidos por Moreira et al. (2000). Tais resultados aparentemente antagônicos devem ser interpretados à luz das premissas adotadas de acordo com cada um dos métodos utilizados.

Lynch & Milligan (1994) sistematizaram as premissas adotadas quando se utilizam dados de marcadores dominantes para a estimativa de heterozigose, estabelecendo que dois alelos distintos não migram para a mesma posição no gel; e que cada marcador representa um locus mendeliano, cujo alelo dominante (visível) está em equilíbrio de Hardy-Weinberg com um recessivo (nulo).

A primeira premissa é adotada para todos os marcadores baseados em polimorfismos de comprimento, independentemente de serem de natureza dominante ou codominante. Nenhum procedimento de análise de dados poderia vir a corrigir erros resultantes da ocorrência de comigração. A segunda premissa elimina do grupo de possíveis fontes geradoras de polimorfismos, as inserções e as deleções em regiões genômicas localizadas entre dois sítios de anelamento de *primers*. Estas alterações de comprimento do segmento entre dois sítios de anelamento poderiam resultar na ocorrência de duas ou mais bandas RAPD positivas por locus. A segunda premissa também inclui o pressuposto de que não ocorra nenhum dos fatores responsáveis por desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg na população. Já na análise baseada em índice de similaridade, apenas a primeira premissa é assumida. Desta forma, é possível que as divergências entre os resultados das duas análises tenham sido causadas pela ocorrência de pelo menos um dos

fatores de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esta parece uma hipótese razoável para explicar os resultados aparentemente antagônicos encontrados, dadas as características específicas e o histórico das linhagens em estudo.

A primeira importação oficial de tilápias nilóticas para o Brasil aconteceu em 1971, proveniente de Bouaké, na Costa do Marfim (Nugent, 1988). A segunda é originária da Alexandria, no Egito, inicialmente introduzida no Japão, de lá para a Tailândia e, em 1996, para o Brasil (Zimmermann, 1999).

Agnése et al., (1997) verificaram três agrupamentos gerados por RFLP de DNA mitocondrial entre as populações africanas, com níveis de polimorfismo diferenciados entre os grupos, constituídos por representantes da drenagem do oeste do continente, dos canyons da Etiópia e das drenagens do rio Nilo. O grupo que colonizou os rios da Costa do Marfim, onde a espécie não é nativa, originou-se de estoques gerados pelo cruzamento intraespecífico de linhagens do rio Nilo e do rio Volta.

Os indivíduos da primeira importação são, portanto, resultantes do cruzamento de populações pertencentes aos grupos da drenagem do oeste do continente africano e o das drenagens do rio Nilo, seguida de introdução em ambientes de cultivo comercial e escapes para o ambiente natural. A segunda importação originou-se do grupo dos canyons da Etiópia, e foi cultivada por aproximadamente 30 anos antes de ser introduzida no Brasil. Fenômenos de deriva genética, hibridação com outras espécies e/ou a seleção natural, determinados por condições ambientais diferenciadas, provavelmente causaram diferenciação genética entre as populações das duas importações oficiais, mesmo antes de sua chegada ao país.

Não se conhece o número de exemplares da primeira importação oficial para Pernambuco, nem o dos que foram transferidos de lá para Pernambuco (linhagem PE). Da região Nordeste, ocorreram introduções para a CESP (linhagem SP), e para os Estados do Paraná e Santa Catarina (linhagem SC). A segunda importação constou de 20,800 animais, dos quais, aproximadamente 10,000 sobreviventes foram divididos em dois grupos de

quarentena. Um destes grupos formou o estoque de Toledo (Moreira, 1999), que originou a linhagem PR.

Após o estabelecimento das linhagens em seus locais de cultivo, vários fatores ambientais e de manejo devem ter contribuído para a deriva genética diferencial dentro destas linhagens. Contudo, é preciso ressaltar o efeito climático entre eles. A linhagem PE é mantida em região tropical e litorânea, onde a média de temperatura anual do ar é 28° C e a variação diária de temperatura é minimizada pelo efeito do mar. A amplitude de variação anual do fotoperíodo não ultrapassa os 50 minutos, refletindo-se em pequenas diferenças sazonais de temperatura. A linhagem reproduz-se ao longo de todo o ano, com frequência média de três a quatro vezes por ano por fêmea. Estas condições térmicas se aproximam das do habitat natural original da espécie, minimizando a possibilidade de um reprodutor em particular não contribuir para a coorte seguinte.

As linhagens SP e SC são cultivadas em latitudes mais elevadas. Nestes locais, a região é subtropical e a amplitude de variação térmica nictimeral e sazonal é mais pronunciada, inclusive inibindo a reprodução e crescimento da espécie durante alguns meses por ano. Cada matriz reproduz-se menos vezes por ano e as proles têm maior possibilidade de sofrer mortalidades massivas em situações de alto gradiente térmico nictimeral, principalmente no final do outono e início da primavera. Os animais mais jovens são particularmente sensíveis às mudanças térmicas porque ocupam os estratos superiores e bordas dos viveiros nas fases de vida mais precoces. Nesta situação, aumenta a probabilidade de um reprodutor em particular não contribuir com gametas para a formação da coorte seguinte.

Não há registros sistemáticos e confiáveis sobre processos eventuais de introdução de animais em pisciculturas comerciais no país. Por este motivo, é muito difícil discutir os efeitos da migração sobre a variabilidade genética dentro de cada uma das linhagens testadas. Moreira et al. (2000) detectaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg entre as frequências de alelos de loci microssatélites das linhagens da primeira importação oficial.

A natureza dominante do marcador RAPD não nos permitiu verificar esta hipótese no presente estudo, mas o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg detectado por Moreira et al. (2000) possivelmente também ocorre nas linhagens da primeira importação deste estudo, cuja história indica eventos potencialmente causadores de deriva e/ou seleção genética. Levando em conta o histórico das linhagens e os resultados descritos por Moreira et al. (2000), pode-se supor que as linhagens PE, SP e SC tenham sofrido desvios significativos da quantidade de heterozigotos em relação aos valores esperados pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Como o cálculo de dissimilaridades não exige o comprimento desta premissa, as dissimilaridades calculadas neste estudo constituem melhores indicadores para inferir diferenças de variabilidade genética dentro de linhagens cativas do que o cálculo de heterozigose não viciada.

Por outro lado, os fenogramas UPGMA obtidos para distâncias e dissimilaridades genéticas entre linhagens (Figs. 1 e 2) apresentam resultados compatíveis pelas duas técnicas de análise de dados. Os diagramas apresentam vários pontos em comum, apesar das duas técnicas de análise diferirem nas premissas, no método de obtenção e na amplitude dos valores geradores dos fenogramas. O primeiro nó (contando da esquerda para a direita da figura) de ambos os diagramas diferencia a linhagem PR das demais. Isso é uma indicação de que linhagens de diferentes importações estão mais distanciadas geneticamente do que as linhagens da primeira importação entre si.

Os fenogramas diferem entre si quanto ao posicionamento da divergência entre as populações da primeira importação. Pelo método das distâncias genéticas, foram obtidos valor de distância menor entre as linhagens SP e PE do que entre cada uma delas e a linhagem SC. Pelo método das dissimilaridades, as linhagens SP e SC estão mais próximas entre si do que da linhagem PE. Em ambos os fenogramas, o menor distanciamento entre nós ocorre entre o segundo e o terceiro, onde os diagramas divergem entre si.

O resultado das comparações múltiplas duas a duas de Kruskal-Wallis elucidada esta aparente contradição entre estes resultados (Tabela 3). Os valores de dissimilaridade entre cada par de linhagens da primeira importação não diferiram estatisticamente entre si (grupo

“e” da Tabela). Desta forma, o agrupamento de apenas duas delas, tendo a terceira como “grupo externo”, pode ser atribuída apenas à metodologia de construção do fenograma UPGMA, e não à existência de valores significativamente diferenciados de dissimilaridades aferidas entre populações da primeira importação.

Estes resultados indicam que cada linhagem da primeira importação sofreu diferenciação genética em uma “direção” durante os quarenta anos de cultivo no país. Caso fosse detectada dissimilaridade menor entre duas linhagens do que dentro de cada uma delas, isso colocaria a interpretação dos resultados diante das possibilidades de que não teria havido diferenciação genética entre elas após a fundação de ambos os estoques, ou de que os processos de diferenciação das duas linhagens teriam resultado em populações distintas da original, mas semelhantes entre si. Esta situação poderia levar à possibilidade de descarte de uma das linhagens semelhantes do processo de formação de linhagem híbrida para fins de melhoramento. Como este não foi o caso, nenhuma das linhagens estudadas da primeira importação deverá ser descartada da formação do plantel híbrido.

Da mesma forma, as dissimilaridades envolvendo a linhagem PR e cada uma das demais são significativamente superiores (grupos “a” e “b” da Tabela) àquelas aferidas dentro de quaisquer das linhagens (grupos “c”, “d”, “f” e “g”). Por estes motivos, propõe-se que a linhagem PR também deva ser utilizada.

Os valores zero de heterozigose não viciada (Tabela 2) em linhagens específicas devem ser olhados com cautela, à luz do número de indivíduos sob análise. Se, por um lado, eles podem significar alelos realmente fixados ou completamente ausentes nas linhagens, por outro, podem também vir a refletir alelos ocorrentes em frequências próximas a zero ou um. Em qualquer dos casos, no entanto, o monomorfismo detectado indica a possibilidade de ocorrência de efeitos de gargalo, deriva genética e/ou vantagens adaptativas a condições específicas de exposição das linhagens.

Quando se comparam as bandas monomórficas da linhagem PR com as demais, de uma forma grupada, verificam-se indicações de ocorrência de variabilidade qualitativa entre os grupos de diferentes importações. Na linhagem PR não foram detectadas as bandas 17 e

30, enquanto que as bandas 2, 20 a 23 e 29 mostraram-se monomórficas. No entanto, em pelo menos duas das linhagens provenientes da primeira importação, essas bandas são polimórficas. Por outro lado, a banda 37 mostrou-se polimórfica apenas para os indivíduos amostrados da linhagem PR.

Quando se analisam as linhagens da primeira importação, verifica-se que os indivíduos amostrados de cada uma delas apresentam três bandas monomórficas linhagem-específicas. Também neste caso é preciso considerar pelo menos duas possíveis fontes de variação de frequências populacionais de alelos: a deriva genética e a vantagem adaptativa de genes ligados a bandas amplificadas neste trabalho. Apesar da deriva genética poder ter provocado sozinha o monomorfismo das bandas 18, 22 e 23 da linhagem SC e das bandas 2, 20 e 25 da linhagem SP, existe também a possibilidade de que estes segmentos de DNA estejam ligados a alelos que confirmam vantagens adaptativas aos indivíduos portadores. Neste caso, a aparente fixação desses alelos poderia ter ocorrido por seleção genética às condições de cultivo em faixa subtropical.

Fishback et al. (2000) verificaram em população cativa de trutas arco-íris a ocorrência de dois grupos genéticos segregados por diferenças na época de reprodução, que puderam ser discriminados com base em seus marcadores moleculares. É possível que os marcadores aparentemente fixados nas linhagens SP e SC estejam ligados a genes controladores da maturação sexual, que confirmam a seus portadores a característica de desovar mais freqüentemente em condições de alto verão, onde a viabilidade das proles seja mais elevada.

Outras hipóteses relacionadas à seleção genética poderiam ser elaboradas neste caso. Uma delas seria a da ligação destes marcadores a regiões codificantes de proteínas responsáveis pela tolerância à baixas temperaturas. Elas poderiam corresponder a fatores fisiológicos relacionados à resistência a doenças oportunistas, características de situações de baixas temperaturas, à enzimas ou hormônios atuantes em maior faixa de amplitude térmica; ou à formação de vitelo de composição ou quantidade mais apropriada para a homeostase de embriões em situação de hipotermia. Alternativamente, a seleção poderia

resultar da exposição a outros fatores adversos, não relacionados à temperatura, aos quais os indivíduos da linhagem PE não seriam tão freqüentemente expostos quanto os das demais. Um exemplo de ligação de marcadores RAPD à tolerância diferenciada a condições ambientais diferenciadas é o trabalho de Caccone et al. (1997), onde os autores detectaram nove marcadores RAPD para o sea bass (*Dicentrarchus labrax*), de freqüência estatisticamente diferente entre as amostras marinhas e de lagoas adjacentes ao mar Mediterrâneo.

Estas hipóteses merecem ser investigadas para fins de melhoramento genético de linhagens para cultivo em localidades de clima temperado. Como os marcadores RAPD não são necessariamente neutros, são particularmente úteis no melhoramento genético assistido por marcadores moleculares (MAS). Para tanto, as bandas que hipoteticamente estariam ligadas à capacidade de adaptação às características ambientais particulares, deveriam ser purificadas do gel e reamplificadas para a verificação de ocorrência de polimorfismos SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism). Um polimorfismo nesta situação indicaria a ocorrência de comigração de pelos menos dois fragmentos. Cada um deles deveria ter suas extremidades clonadas, para gerar pares de primers mais alongados que o primer RAPD original. Estes pares de primers gerariam marcadores codominantes para amplificação específica de loci que tenham gerado a banda RAPD original.

Bardacki & Skibinski (1999) denominaram esta técnica de SCAR-RAPD (Sequence Characterized Amplified Region), com a qual determinaram um par de primers que amplifica de forma codominante um locus polimórfico diagnóstico de espécies de tilápia. *Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, *O. spirulus* e *Tilapia mariae* apresentaram polimorfismos espécie-específicos e as linhagens de *O. niloticus* não apresentaram diferenciação entre si para este locus. Kovács et al. (2001) utilizaram a mesma técnica de obtenção de primers, para diagnóstico prematuro de sexo em *Clarias gariepinus*.

Os pares de primers obtidos por esta técnica deveriam ser utilizados em experimentos delineados para verificar a hipótese de detecção de ligação entre cada um dos

alelos amplificados e características fenotípicas relacionadas à resistência ao cultivo em regiões temperadas.

Em suma, em estudos de aferição de variabilidade genética intraespecífica de *O. niloticus* de linhagens cativas comerciais, são recomendados o uso de marcadores RAPD e a aferição de dissimilaridades genéticas para subsidiar a decisão sobre a inclusão de cada uma delas na formação de plantel híbrido em programas de melhoramento genético, em quaisquer países onde ela seja espécie exótica. A linhagem híbrida, obtida dos cruzamentos entre linhagens eleitas, deverá ser mantida em condições ambientais tão próximas quanto possível da faixa ótima específica, para minimizar efeitos de seleção ou deriva genética após a sua formação.

Para o caso das linhagens brasileiras estudadas, é recomendada a utilização de todas as quatro linhagens, cujo processo de hibridação intraespecífica deverá gerar linhagem única com maior variabilidade que qualquer uma das originárias. A verificação da ligação entre algumas das bandas obtidas e características de adaptação ao cultivo na região temperada, pela técnica SCAR-RAPD, também é recomendada.

**5 – Perspectivas para o Melhoramento de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) a Partir da
Combinação de Linhagens. II – Forma do corpo**

Artigo a ser submetido ao Journal of the World Aquaculture Society

Resumo

O objetivo deste trabalho foi investigar a viabilidade técnica da utilização de dois índices de forma do corpo como fenótipos correlacionados ao rendimento de filé, para programa de melhoramento genético a partir de quatro linhagens de tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) com comprovada dissimilaridade genética linhagem-específica. Foram estabelecidos índices morfométricos com medidas lineares externas e verificado o efeito sobre seus modelos de predição do comprimento padrão, de linhagem, de sexo, da interação entre linhagem e sexo e de marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Os índices de largura máxima (MWI) e de altura máxima (MHI) foram calculados respectivamente como os percentuais das duas medidas em relação ao comprimento padrão. Os resultados obtidos indicam que os índices utilizados são adequados para uso conjunto na seleção indireta de características de rendimento carcaça e filé de *O. niloticus*, com base na posição relativa em que altura e largura máxima foram aferidas; na relativa independência entre os dois índices; na independência dos índices em relação ao comprimento do animal; na facilidade de obtenção das medidas externas utilizadas na construção dos índices; nos valores de variabilidade fenotípica aferida; e ainda por indicações do modelo utilizado de que estes fenótipos contínuos sofrem determinação genética. Foram verificados efeitos significantes de linhagem e de interação de linhagem com sexo sobre o modelo de predição dos índices. Foram identificados marcadores RAPD potencialmente ligados à variação de forma do corpo das linhagens em estudo.

Introdução

Tilápias e seus produtos derivados são aceitos por mercados de todo o mundo (Goddard, 1996). São comercializados de várias formas, incluindo peixe vivo, eviscerado fresco ou congelado, filés frescos ou congelados, com ou sem espinhas e produtos defumados (Engle, 1997). Exceto no caso do peixe inteiro, o rendimento do produto em relação à matéria prima depende de proporções corporais em peso, como a de carcaça (produto descabeçado, eviscerado e sem pele) e de filé (musculatura dorso-lateral). Estas proporções são duplamente impactantes no custo do processamento do pescado, afetando tanto os custos de matéria-prima quanto aqueles referentes à transformação e/ou descarte dos resíduos, de acordo com a legislação ambiental local.

O rendimento de filé depende do método de filetagem, da opção pela inclusão da musculatura da porção ventral do animal e/ou costelas e da eficiência do filetador. Para a tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), Souza & Macedo-Viegas (2000) apresentaram três opções de métodos de remoção de filés sem pele, que resultam em rendimentos de 26 a 37%. Clement & Lovell (1994) consideraram como filé apenas a musculatura epaxial e obtiveram rendimento médio de 25,4% para a espécie. Rutten et al. (2004) incluíram a musculatura hipaxial e costelas, e verificaram média de 35,7%, com efeito significativo do filetador.

O rendimento de carcaça e filé apresenta características específicas e procedimentos técnicos que não podem ser aferidos diretamente sem o sacrifício dos animais. Esta é uma dificuldade para implantação de programas de melhoramento genético destas características fenotípicas. A seleção do reprodutor pelo valor fenotípico deve ser feita indiretamente, com a utilização de dados obtidos a partir de outros fenótipos correlacionados com o rendimento.

Cibert et al. (1999) verificaram a adequação da utilização de medidas corporais externas para prever o rendimento de filé de carpas. Verificaram que os ângulos com o vértice na cabeça, medidos do eixo longitudinal do peixe em direção à sua porção dorsal

são proporcionais ao percentual de filé dos animais, por estarem correlacionados à massa muscular dorsal. Por outro lado, verificaram que os animais mais pesados em relação ao comprimento, estão geralmente relacionados com maiores medidas na parte ventral, que não contribuem para o rendimento em filé. Para *O. niloticus*, Hockaday et al. (2000) demonstraram a possibilidade de prever o peso corporal a partir de equações baseadas em aferições de medidas externas, com 0.5% de erro.

Além de ser um fenótipo relacionado ao rendimento de filé, o formato do peixe também faz parte dos critérios de escolha dos consumidores de produtos pesqueiros. A morfologia geral de um peixe ou filé é a primeira impressão do consumidor diante do produto (Wille et al., 2002). Consumidores de salmão do Atlântico elegeram a forma do corpo e o teor de gordura como os dois mais importantes critérios de qualidade (Koteng, 1992 apud Einen et al., 1998). A forma do corpo e a cor da pele de truta arco-íris cultivadas influencia a aceitação dos consumidores, de forma que os atacadistas de peixes visitam pisciculturas para inspecionar a qualidade interna e externa dos peixes (Kause et al., 2003).

O sucesso de um programa de seleção genética é influenciado pelas propriedades das características eleitas dentro da população disponível. O ganho genético potencial por geração é proporcional à variabilidade da característica e à sua herdabilidade. De modo também importante, a característica precisa exibir variação genética aditiva e não possuir correlação genética desvantajosa com outros fenótipos importantes (Falconer & Mackay, 1996).

Elvingson & Johansson (1993) observaram variação genética entre dimensões relativas de trutas arco-íris. Kause et al. (2003) verificaram que a forma do corpo desta espécie apresentou alta herdabilidade (0.46). Ankorion et al. (1992) aferiram valores de herdabilidades de 0.33 a 0.47 em experimentos bidirecionais para proporção entre a altura e o comprimento do corpo nesta espécie.

Estes resultados são encorajadores, mas não garantem que a forma do corpo ou o conseqüente rendimento de carcaça e filé possam ser significativamente melhorados para quaisquer linhagens, destas e de outras espécies de peixes. Dentro de linhagens onde a

variabilidade de forma é muito reduzida, as estimativas de herdabilidade tendem a ser muito baixas. Volckaert & Hellemans (1999) não verificaram efeitos genéticos significativos para crescimento em uma população de limitado background genético de bagre, embora a literatura citada por eles indicasse a existência herdabilidade para esta característica em outras linhagens da espécie.

Este efeito endogâmico sobre a variabilidade fenotípica pode ser compensado pela heterose resultante do cruzamento de linhagens em um mesmo programa de melhoramento. O montante de heterose de um cruzamento depende do quadrado da distância genética entre as linhagens (Falconer & MacKay, 1996).

O objetivo deste trabalho foi investigar a viabilidade técnica da utilização de dois índices de forma do corpo, como fenótipos correlacionados ao rendimento de filé para programa de melhoramento genético, a partir de quatro linhagens cativas de tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) com comprovada dissimilaridade genética linhagem-específica (Walmsley et al., submetido). Especificamente, foram construídos índices morfométricos com medidas lineares externas e verificados os efeitos do comprimento padrão, da linhagem, do sexo, da interação entre linhagem e sexo e de marcadores moleculares RAPD sobre a sua predição.

Materiais e Métodos

A origem e nomenclatura utilizada das linhagens em estudo, bem como as metodologias de anestesia, biópsia, conservação de amostras, extração de DNA genômico total, amplificação de fragmentos, aferição de comprimento e nomenclatura dos marcadores de DNA obtidos constam de Walmsley et al. (submetido).

As aferições de medidas lineares foram feitas durante o procedimento de biópsia. Um ictiômetro adaptado com peça em esquadro, contendo escala graduada em milímetros, foi utilizado para a aferição de três medidas lineares: comprimento padrão, altura máxima e largura máxima. As medidas foram aproximadas para números inteiros de milímetros mais próximos.

O instrumento de medidas dos exemplares consta de uma bandeja de aproximadamente 50 x 30 cm, da qual duas laterais adjacentes são retiradas e uma escala plástica milimetrada presa ao fundo da bandeja no sentido longitudinal. A peça móvel, em forma de “L”, possui escala em uma das partes perpendiculares. O peixe anestesiado é posicionado na bandeja de forma a tocar o focinho na menor face vertical da bandeja e o dorso na maior, com a nadadeira dorsal rebaixada. O comprimento padrão é lido na escala fixa da bandeja. Para a aferição de largura, a peça móvel é posicionada com o lado não graduado horizontalmente sobre o peixe, na sua porção mais larga, com o lado graduado posicionado verticalmente. A largura máxima é a medida vertical entre a parte interna da peça (em contato com o peixe) e a base da bandeja. Para a aferição de altura, posiciona-se a extremidade não graduada verticalmente, de forma que a sua parte interna toque o ventre do animal na sua seção mais alta e que a parte graduada fique na horizontal, perpendicularmente à maior face vertical da bandeja. A altura máxima é a medida horizontal entre a parte interna da peça (em contato com o peixe) e a maior face vertical da bandeja.

Dois índices morfométricos adimensionais foram construídos. Os índices de largura máxima (MWI) e de altura máxima (MHI) foram calculados respectivamente como os percentuais das duas medidas em relação ao comprimento padrão.

As análises estatísticas foram conduzidas no SAS Version 8 e software (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA), utilizando o procedimento GLM. A hipótese de correlação linear entre os índices foi testada pelo modelo:

$$MHI_i = \beta_0 + \beta_1 MWI_i$$

Onde: β_0 e β_1 são respectivamente os coeficientes linear e angular da regressão;

MHI_i e MWI_i são os índices de altura máxima e de largura máxima do indivíduo i .

Uma matriz de 47 colunas foi construída com dados de cada peixe em uma linha, com colunas referentes a linhagem, sexo, comprimento padrão, MHI, MWI e cada uma das 42 bandas RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) selecionadas.

O modelo matemático utilizado para análise de cada um dos índices foi:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha SL_i + L_j + S_k + (S_k * L_j) + \beta_1 B_1 + \dots + \beta_n B_n + \varepsilon_{ijk}$$

Onde $Y_{i,jkl}$ é o valor observado do índice para o indivíduo i ($i=1,2,\dots,119$);

μ é a média dos valores dos índices observados (intercepto do modelo);

α é o coeficiente do comprimento padrão;

SL_i é o comprimento padrão do indivíduo i ;

L_j é o efeito da linhagem j ($j= PE, PR, SC, SP$);

S_k é o efeito do sexo k ($k = \text{feminino, masculino}$);

$S_k * L_j$ é o efeito da interação do sexo k com a linhagem j ;

β_1 a β_n são coeficientes para os valores zero ou um (presença ou ausência) das bandas B_1 a B_n do indivíduo i ;

ε_{ijk} é o efeito aleatório do erro associado ao indivíduo i .

As variáveis CLASS do modelo foram sexo e linhagem, cujos efeitos sobre os índices foram considerados fixo e aleatório, respectivamente. A opção CONTRAST foi utilizada para verificação de diferenças entre os níveis de efeitos de linhagem e os denominadores dos valores de F foram ajustados pelo desmembramento das esperanças de médias de quadrados tipo III, sendo os graus de liberdade destes denominadores determinados pela fórmula de Satterthwaite (Littell et al., 1991).

Resultados

O conjunto de dados constou de 119 observações de medidas morfométricas, resultantes de 15 peixes por sexo e linhagem, exceto para a linhagem SC, da qual se amostrou apenas 14 fêmeas, por causa de erro sistemático. O número de indivíduos para os quais não houve amplificação de fragmentos consta de Walmsley et al. (submetido).

A Tabela 1 apresenta médias e erros padrão da média por linhagem para as medidas aferidas. A altura máxima dos indivíduos localizou-se na porção anterior corpo, um pouco atrás da inserção da nadadeira dorsal, seção onde também se verificou a ocorrência da largura máxima dos animais.

Tabela 1 – Médias e erros padrões das médias para as medidas lineares aferidas por linhagem de *Oreochromis niloticus*.

Medida linear	Linhagem			
	SP (n = 30)	PE (n= 30)	PR (n = 30)	SC (n = 29)
comprimento	166,07± 5,83	153,37 ± 3,78	245,50 ± 5,70	233,31 ± 8,68
largura	38,60 ± 1,47	37,80 ± 1,03	51,00 ± 1,37	50,38 ± 1,67
altura	75,23 ± 2,99	71,23 ± 2,14	108,27 ± 3,12	105,03 ± 4,04

A análise do modelo de predição de MHI a partir de MWI utilizou as 119 observações individuais dos índices e revelou correlação positiva significativa ($P < 0,0001$) entre os dois índices, como termo independente não significativamente diferente de zero ($P = 0,1525$). O valor de R^2 para o modelo foi 0,14.

A análises dos modelos de predição de cada índice, a partir das variáveis linhagens, sexos, interação entre linhagens e sexos e marcadores moleculares utilizou 92 das 119 observações. Este número correspondeu ao de indivíduos cujas amostras de tecido geraram produtos de amplificação simultaneamente para os três primers utilizados. Das 42 bandas de menos de 1,5 kb obtidas, foram excluídas da análise morfométrica de todas as linhagens as duas bandas monomórficas. As bandas 23 e 37 também foram excluídas, porque todos os indivíduos onde elas não foram detectadas foram excluídos da análise.

Os modelos lineares construídos para MWI e MLI apresentaram respectivamente $R^2 = 0.79$ e 0.64 . A Tabela 2 mostra as médias de mínimos quadrados obtidas pelos modelos e os respectivos intervalos de confiança ($\alpha = 0.05$) para os índices MWI e MHI por linhagem. Os contrastes entre as médias de populações de MWI não foram significativos, enquanto que a linhagem PR diferiu das demais por apresentar MHI menor ($P < 0.05$).

Tabela 2 – Médias de mínimos quadrados e intervalos de confiança ($\alpha = 0.05$) para os índices MWI e MHI por linhagem de *Oreochromis niloticus*. SP = São Paulo; SC = Santa Catarina; PE = Pernambuco, PR = Paraná.

linhagem	MWI			MHI		
	Limite inferior do intervalo de confiança ($\alpha = 0.05$)	Média de mínimos quadrados *	Limite superior do intervalo de confiança ($\alpha = 0.05$)	Limite inferior do intervalo de confiança ($\alpha = 0.05$)	Média de mínimos quadrados	Limite superior do intervalo de confiança ($\alpha = 0.05$)
PE	22,17	28,87 a	35,57	41,82	50,08 a	58,35
SP	20,54	27,24 a	33,94	39,64	47,90 a	56,16
SC	15,18	21,88 a	28,58	37,77	46,03 a	54,29
PR	18,79	25,49 a	32,19	35,76	44,02 b	52,28

* letras minúsculas iguais após as médias indicam contrastes não significativos entre linhagens, com nível de significância $\alpha = 0.05$.

A tabela 3 mostra os coeficientes do modelo de predição de MWI e seus respectivos percentuais em relação à média geral do índice (intercepto do modelo). Apenas as bandas com coeficientes significativos ($P < 0.05$) para o modelo foram incluídos na tabela.

Tabela 3 – Resultados da análise do modelo linear de predição de MWI para linhagens de *Oreochromis niloticus*. Apenas os marcadores com coeficientes significativos ($P < 0.05$) para o modelo para foram incluídos na tabela. SP = São Paulo; SC = Santa Catarina; PE = Pernambuco, PR = Paraná.

Efeito	F	Coefficiente do modelo	Contribuição do coeficiente (% do intercepto)
Intercepto		21,61	
Comprimento	0,0200 ns	0,00174	0,00804
Sexo	0,03130 ns		
Fêmeas		-2,18	-10,07
Machos		0	0
Linhagem	0,5686 ns		
PE		3,38	15,64
SP		1,75	8,09
PR		0	0
SC		-3,61	-16,71
Interação linhagem x sexo	6,7462 *		
Fêmeas SC		7,66	35,46
Fêmeas SP		1,73	8,00
Fêmeas PE		0,56	2,59
Fêmeas PR		0	0
Marcadores			
1	6,8015 *	2,30	10,63
4	5,9290 *	-1,32	-6,12
21	4,8349 *	-1,98	-9,18
27	6,8323 *	-1,98	-9,15

O asterisco indica coeficientes de efeito significante e “ns” os coeficientes não significantes ($P < 0.05$)

Os valores zero para os coeficientes do sexo masculino, das interações entre o sexo masculino e as linhagens e da interação entre sexo feminino e linhagem PR, refletem apenas o método de obtenção de médias de mínimos quadrados utilizado. O sistema de análise escolhe, das infinitas soluções possíveis para a operação matricial com os dados brutos, a que atribui valor nulo aleatoriamente a um dos níveis das variáveis classificatórias, com coeficiente de intercepto igual ao valor da média geral dos índices (Littell et al., 1991).

É possível verificar que os efeitos de linhagem e de sexo sobre o MWI, considerados isoladamente, não foram significativos, mas a interação entre eles influenciou o índice. Isso

se deu pela interação de sexo dentro da linhagem SC, onde as fêmeas apresentam média 35.46% maior que a dos machos (aumento de 7.66 pontos percentuais no valor do índice).

Quatro bandas RAPD apresentaram efeito significativo no modelo, sendo três delas com coeficiente negativo (bandas 4, 21 e 27) e apenas uma (banda 1) com coeficiente positivo, aumentando o MWI dos portadores dela em 2,3%. Isto representa um incremento de 10,6% da média geral de MWI's.

A Tabela 4 mostra os valores encontrados para os coeficientes do modelo de predição de MHI e seus respectivos percentuais, em relação à média geral do índice (intercepto do modelo). Apenas as bandas com coeficientes significativos ($P < 0.05$) para o modelo foram incluídos na tabela.

Tabela 4 - Resultados da análise do modelo linear de predição de MHI para linhagens de *Oreochromis niloticus*. Apenas os marcadores com coeficientes significativos ($P < 0.05$) para o modelo para foram incluídos na tabela. SP = São Paulo; SC = Santa Catarina; PE = Pernambuco, PR = Paraná.

Efeito	F	Coeficiente do modelo	Contribuição do coeficiente (% do intercepto)
Intercepto		35,92	
Comprimento	2,2711 ns	0,02468	0,0687
Sexo	0,0264 ns		
Fêmeas		-0,94	-2,63
Machos		0	0
Linhagem	2,9358 ns		
PE		6,06	16,88
SP		3,88	10,79
SC		2,01	5,59
PR		0	0
Interação linhagem x sexo	0,5882 ns		
Fêmeas SC		2,55	7,11
Fêmeas SP		2,07	5,75
Fêmeas PE		0	0
Fêmeas PR		-0,20	-0,57
Marcadores			
22	5,2749 *	-3,37	-9,38
27	5,8092 *	-2,43	-6,77
28	8,1944 *	3,98	11,08

O asterisco indica coeficientes com efeito significante e “ns” os coeficientes não significantes ($P < 0.05$)

Para este índice, não foi verificado um efeito significativo ($P < 0.05$) de linhagem, sexo ou interação de sexo com linhagem no modelo linear, apesar dos contrastes da tabela 2 mostrarem que a linhagem PR apresentou MHI significativamente inferior aos demais. Duas bandas apresentaram coeficientes significativos negativos (22 e 27) e uma banda (28) apresentou coeficiente significativo positivo.

Discussão

As posições relativas observadas da altura máxima e largura máxima de *O. niloticus* indicam que relações morfométricas construídas com ambas as medidas têm potencial de expressar efeitos da distribuição de massa muscular dorso-lateral, que constituem a porção do filé. A altura máxima foi encontrada na parte posterior ao ponto de inserção da nadadeira dorsal, ainda na porção anterior do corpo. Esta posição corresponde à da seção transversal que resulta na máxima posta aberta do animal, que é a fatia de maiores dimensões do peixe, constando de porção comestível (musculatura dorso-lateral), de ossos não retirados no postejamento (vértebras e costelas) e de porção descartada para venda (pele, escamas, peritônio e vísceras). A largura máxima foi encontrada sobre a seção de maior altura, aproximadamente equidistante entre dorso e ventre, em posição correspondente à porção dorsal da cavidade abdominal adjacente às costelas. Neste ponto, a espessura da musculatura lateral e o ângulo de abertura das costelas são fatores determinantes da largura.

Este padrão difere do de outras espécies, nas quais a maior largura ocorre na porção ventral da cavidade abdominal, bem abaixo da inserção das costelas. Nelas, esta forma pode ser uma das adaptações a carnivoría, com estômago e abdômem expansíveis, para acomodar presas de porte considerável em relação ao tamanho do predador, que são engolidas praticamente inteiras. Também espécies de desova total anual podem sofrer consideráveis expansões abdominais pré-desova, para acomodar as gônadas na cavidade

abdominal, cujo índice gonadossomático pode chegar a mais de 17% do peso corporal (Shimizu, 2003). Nessas espécies, a largura máxima é fortemente influenciada pelo grau de repleção estomacal e/ou pelo diâmetro da gônada. Isso faz com que o efeito da distribuição de musculatura dorso-lateral sobre a largura máxima confundam-se com flutuações nictimerais e/ou sazonais de diâmetro de estômago ou da gônada, desaconselhando o uso de relações desta medida como índices de seleção indireta para rendimento de carcaça ou filé. Também a altura máxima pode ser afetada por esta expansão de acomodação de estômago e gônadas (Cibert et al., 1999), dependendo do padrão de expansão do abdome ser lateral e/ou ventral.

A conformação do corpo encontrada em *O. niloticus* reflete aspectos de seu hábito alimentar e reprodutivo. O estômago pequeno formado por musculatura forte (Caceci et al., 1997; Morrison & Wrigth Jr., 1999) é provavelmente uma adaptação à ingestão contínua de plâncton. O hábito reprodutivo parcelado, com incubação bucal, não permite a maturação simultânea de ovócitos em volume maior do que o que pode efetivamente ser incubado na cavidade orofaríngea, de modo que o índice gonadossomático da espécie não ultrapassa 6% (Tacon et al., 1996).

Embora tenha sido detectado coeficiente angular significativo ($P < 0.05$) no modelo de predição de MHI a partir de MWI, o R^2 foi de apenas 0.14, indicando a existência de outras fontes de variação independentes de MWI, que respondem majoritariamente pela expressão do fenótipo de MHI. Além disso, as Tabelas 3 e 4 mostram outros fatores que indicam independência entre os índices, ou seja, a significância dos efeitos de linhagem e interação de linhagem com sexo são diferentes para MWI e MHI; e os dois índices apresentam efeitos significativos de diferentes bandas testadas, com exceção da 27, que influenciou negativamente os dois.

Se dois índices fossem correlacionados tão estreitamente, de modo que o valor de um deles fosse suficiente para prever o valor do outro, não haveria sentido prático em aferir ambos. Este não é o caso de MWI e MHI. Desta independência verificou-se que é conveniente conduzir programas de seleção para maior MWI e também para maior MHI

nesta espécie. Neste caso, estes fenótipos quantitativos seriam dois fatores relativamente independentes de seleção indireta para formato dos filés, respectivamente mais altos e mais largos para um mesmo comprimento longitudinal.

Reist (1985 e 1986) recomendam que as populações devem ser comparadas em termos de variáveis de forma, construídas de forma independente da variação de tamanho, para evitar a interferência deste na análise. Por outro lado, Swain & Foote (1999) enfatizam que a variação de comprimento é uma variável biologicamente importante, que deve ser considerada conjuntamente com a variação em forma.

Rutten et al. (2004) aferiram o efeito de altura, largura, comprimento e peso em valores absolutos, sobre o rendimento de filé de *O. niloticus* e nenhuma das medidas lineares apresentou efeito significativo. Os autores verificaram efeitos significantes de linhagem, operador e peso corporal para a predição de rendimento de filés. O coeficiente do peso, no entanto, indicou um aumento de apenas 0,1% de rendimento a cada aumento de 100g no peso corporal, indicando que a estratégia de obter animais mais pesados, para aumentar o rendimento, não era muito eficiente. Estes autores ainda consideraram que o melhoramento de filé, utilizando medidas externas é difícil, e questionam se este modelo poderia ser utilizado ou se seria necessário ou mesmo conveniente, tentar construir outros modelos. Embora os índices MWI e MHI não tenham sido testados ainda como variáveis preditoras do rendimento de filé, é possível que sejam variáveis significantes para este fenótipo.

Contudo, expressar altura e largura máximas simplesmente em percentuais do comprimento padrão (MHI e MWI respectivamente), não seria necessariamente suficiente para gerar índices de forma independentes do tamanho do animal. Caso a espécie exibisse crescimento alométrico para altura e/ou largura na faixa etária dos animais amostrados, MHI e MWI também variariam com o comprimento e seria necessário construir outros índices, com expoentes da variável comprimento baseados nas constantes de crescimento alométrico específico, para cada uma das medidas.

A hipótese de crescimento alométrico em altura ou em largura foi testada pela inclusão da variável comprimento, nos modelos de predição de cada um dos índices. Para nenhum deles o coeficiente do comprimento foi significativo ($P > 0,71$ e $P > 0,12$ para MWI e MHI respectivamente). Desta forma, pudemos inferir que a relação entre altura e comprimento padrão e a relação entre largura e comprimento padrão são ambas independentes do comprimento do animal e que MHI e MWI podem ser utilizadas como variáveis de formato para *O. niloticus* de comprimento padrão na faixa testada (114 a 322 mm de amplitude). Isto não garante, contudo, que não haja crescimento alométrico em altura ou largura em fase anterior de vida. Como regra geral, os teleósteos mudam de forma entre a fase de início da alimentação exógena e a fase de alevinos ou jovens, onde já apresentam o hábito alimentar específico (Kirschbaum & Schugardt, 2002). No entanto, isto não invalidaria a utilização dos índices utilizados para o melhoramento genético, porque este processo visa características fenotípicas expressas na fase de comercialização.

O processo de obtenção dos dados brutos para a construção dos índices é prático e exige investimentos mínimos, podendo ser utilizado em qualquer estação de pesquisa ou em piscicultura comercial, onde um programa de melhoramento esteja sendo eventualmente conduzido. As três medidas de um exemplar podem ser aferidas em menos de 30 segundos. Não foi possível avaliar a mortalidade devida apenas ao manuseio das mensurações e biópsia, porque os animais também foram submetidos à inserção de PIT tags (Passive Integrated Transponders) na musculatura dorsal. Apenas dois de 119 animais manuseados (1.7%) morreram nos dois dias seguintes.

Na Tabela 2 é possível verificar que houve variabilidade fenotípica considerável dentro das linhagens. Pelos valores encontrados para os dois índices, verifica-se que há variabilidade fenotípica intrapopulacional considerável a ser explorada e esta é uma condição necessária para a condução de programa de melhoramento de qualquer fenótipo. O intervalo de confiança construído em torno das médias de MWI foi de 6,7% do índice, o que corresponde a 31% de sua média geral (intercepto do modelo). Devido a esta variabilidade dentro das linhagens, não foram diagnosticados efeitos significantes de

linhagem sobre o índice, mesmo diante de uma diferença de sete pontos percentuais do índice entre médias de mínimos quadrados das linhagens PE e PR.

Para o índice de forma MHI, a linhagem PR, proveniente da segunda importação, apresentou média significativamente inferior às demais, e a variabilidade dentro de linhagens resultou em intervalo de confiança de 8,23 pontos percentuais do índice. Este valor corresponde a 23% do valor da média geral do índice, resultando em contrastes não significativos entre todas as linhagens da primeira importação oficial para o Brasil, apesar da diferença máxima de 4 pontos percentuais do índice entre suas médias (linhagens PE e SC).

Os modelos matemáticos foram construídos com variáveis que representam efeitos genéticos aditivos e foram capazes de prever MWI e MHI com R^2 de 0.79 e 0.64 respectivamente. O único efeito não genético incluído no modelo foi o do comprimento padrão de animais de diferentes idades, e seu coeficiente não foi significativo. Por outro lado, marcadores moleculares de DNA mostraram correlação significativa com cada um dos índices e foram detectados efeitos significativos de linhagem e de interação linhagem x sexo respectivamente para MHI e MWI.

Taniguchi et al. (1996) evidenciaram a contribuição da variabilidade genética interindividual e para a forma de *Plecoglossus altivelis*, em um experimento com quatro linhagens clonais mitoginogénicas cultivadas comunalmente e identificadas com marcadores de DNA microssatélites. Os autores verificaram diferenças significativas entre linhagens em pelo menos três das 16 características merísticas e morfométricas aferidas. As pequenas diferenças interclonais encontradas e os valores de herdabilidade destas características (valores entre 0,2 e 0,5 para largura e altura do corpo) indicam possibilidades de ganho por seleção massal dentro de linhagens.

A avaliação do quanto os fatores genéticos aditivos são responsáveis por uma característica quantitativa é feita pela sua herdabilidade (h^2). A heterose é utilizada para quantificar efeitos genéticos não aditivos, quando se dispõe de linhagens diferentes. Como o presente trabalho considerou apenas uma geração, nenhum destes parâmetros pôde ser

calculado, não havendo ainda comprovação formal de que nenhum dos dois índices utilizados seja geneticamente controlado. Caso estes sejam fenótipos integralmente controlados por fatores ambientais e nutricionais, não haveria sentido em utilizá-los em programa de melhoramento genético. No entanto, os resultados das análises dão indicações da possibilidade de existência de efeitos aditivos, bem como da possibilidade de ocorrência de heterose para os dois fenótipos.

Walmsley et al. (submetido) detectaram dissimilaridades genéticas entre as linhagens utilizadas no presente trabalho. A linhagem PR, proveniente da segunda importação oficial, foi a que apresentou a maior dissimilaridade em relação às demais (da primeira importação). Esta linhagem também apresentou contraste significativo de médias de mínimos quadrados de MHI em relação às demais. Embora não seja possível afirmar que existe relação de causa e efeito entre os dois fatos, existe a possibilidade das linhagens de diferentes importações apresentarem diferenças de frequência e/ou qualitativas entre os alelos de genes responsáveis pela distribuição de tecido muscular dorsal.

Para MHI é possível utilizar efeitos aditivos de linhagem para o melhoramento, existindo a possibilidade de que cruzamentos híbridos intraespecíficos possam gerar animais de maior MWI e MHI que seus parentais, como efeito heterótico resultante da dissimilaridade entre as linhagens. A intensidade da heterose em um cruzamento é dependente do quadrado das diferenças entre as frequências gênicas entre populações (Falconer & MacKay, 1996).

Existem evidências literárias de que a forma do corpo de peixes seja uma característica geneticamente determinada (Li et al., 1993; Schaarschmidt & Jurss, 2003; Velasco et al., 1995).

A Tabela 3 mostra os resultados da análise do modelo linear de predição de MWI. É possível verificar que os efeitos isolados de linhagem e sexo não foram significantes para o modelo. No entanto, o efeito da interação entre eles foi. De acordo com o método de cálculo, o modelo atribuiu o valor zero para o efeito isolado do sexo masculino e às diferenças sexuais de forma dentro da linhagem PR. A quantificação das diferenças entre sexos e de

diferenças sexuais linhagem-específicas é feita pelos coeficientes exibidos nas tabelas. O efeito do dimorfismo sexual dentro de cada linhagem é computado pela soma do coeficiente do sexo com o coeficiente da interação entre a linhagem e o sexo. Este resultado é a diferença entre as médias de mínimos quadrados de MWI entre machos e fêmeas, dentro de cada linhagem. Somando-se o coeficiente do sexo feminino (-2,18%), com cada um dos coeficientes de interação de fêmeas com linhagens, verifica-se que o único valor positivo corresponde à da linhagem SC (5,49%). O significado disso é o de que, apenas dentro da linhagem SC, as fêmeas apresentam maior MWI que os machos. Nas demais linhagens, os machos são, em média, mais largos do que as fêmeas.

Neves & Monteiro (2003) relataram diferenças sexuais na intensidade da modulação da forma pelo ambiente em *Poecilia vivipara* de lagoas do sudeste do Brasil. O dimorfismo sexual em tilápias também é relatado por Brzeski & Doyle (1988), que discriminaram sexo de tilápias vermelhas da Flórida baseados em relações morfométricas contendo largura do lábio superior, distância interorbital e distância entre as inserções anteriores das nadadeiras dorsal e pélvica. Por outro lado, Elvingson & Johansson (1993), por outro lado, verificaram não haver efeitos significativos de sexo ou linhagem sobre a largura do abdome de *Oncorhynchus mykiss*.

Considera-se a possibilidade de ter havido divergência entre as linhagens testadas em termos de genes responsáveis pelos níveis circulantes de hormônios sexuais e/ou nos receptores musculares, resultando em efeito diferenciado no padrão sexual de hipertrofia muscular lateral. Alternativamente, um dimorfismo no padrão esquelético também poderia causar esta diferença, como por exemplo, variação no ângulo entre as inserções de costelas. Dependendo da conseqüência morfofisiológica causadora desta diferença, este fenótipo expresso no sexo feminino poderá vir a influenciar pseudomachos de proles sexualmente revertidas de *O. niloticus*. Esta possibilidade merece ser investigada em delineamentos apropriados, com aferição de fenótipo de pseudomachos da linhagem. Estes testes mostrariam se a diferença de dimorfismo resulta em alargamento apenas em fêmeas

fenotípicas ou se também os pseudomachos, que são fêmeas genotípicas, teriam o corpo mais largo.

Existem evidências de que o formato do corpo dos peixes seja uma característica geneticamente controlada por meio do sistema neuroendócrino. Os níveis fisiológicos de hormônios dependem da expressão de genes responsáveis pela sua síntese, regulação e aptidão de receptores específicos nas células-alvo. Na ontogenia, os hormônios tireoidianos são responsáveis pela metamorfose de larvas de várias espécies (Reddy & Lam, 1992; De Jesus et al., 1990; Lam, 1980)._Mesmo depois de adquirir formato de jovem, também há evidência de que mudanças de forma geneticamente controladas, como crescimento alométrico de nadadeiras de peixes voadores (Dasilao et al., 2002; Tinti et al., 2003; Wille et al., 2002; Ostefeld et al., 1998).

É possível que linhagens com diferentes padrões de deposição muscular tenham diferenças genéticas quantitativas, relacionadas à atividade dos genes codificantes de hormônios. Uma evidência nesta direção é o trabalho de Tiwary et al. (1999), que detectaram diferença suficiente na proporção entre comprimento padrão e profundidade do corpo para separar grupos de catfish indiano (*Heteropneustes fossilis*) diplóides de triplóides, sem intersecção na distribuição de frequência desta característica. Alternativamente, estas diferenças genéticas também podem ser qualitativas, em genes responsáveis pelo controle dos níveis hormonais plasmáticos e/ou pela distribuição ou eficiência de receptores hormonais de células glandulares ou musculares. Estas possibilidades são animadoras, no sentido das perspectivas de ganho genético por geração em programas de melhoramento por seleção.

Nestes programas, é necessário levar em conta que o formato do corpo também é suscetível a fatores de interação genótipo-ambiente, que se dá pela plasticidade fenotípica (Morita & Suzuki, 1999), definida como a habilidade de um único genótipo em produzir mais de uma forma alternativa de morfologia, estado fisiológico e/ou comportamento em resposta a condições ambientais (West-Eberhard, 1989). O tipo de plasticidade mais relatado para caracteres morfológicos de peixes é a modulação fenotípica. Este processo geralmente

produz variação de fenótipos contínuos e é descrito como um padrão de reação, que atribui um valor de fenótipo produzido pelo genótipo como uma função das condições ambientais (Swain & Foote, 1999). Uma diferenciação morfológica interpopulacional pode refletir tanto um processo de seleção genética quanto simplesmente uma indução ambiental (Swain & Foote, 1999).

Algumas modificações patológicas de forma podem ser induzidas por condições do processo de larvicultura de peixes cultivados (Chatain, 1994; Sfakianakis et al., 2004; Johnson & Katavic, 1984; Madsen & Dalsgaard, 1999; Cahu et al., 2003). Mesmo após a fase de alevino ou jovem, as condições de cultivo podem promover crescimento alométrico nos animais. Sara et al. (1999) apontam fatores como a densidade de estocagem, o volume da estrutura de cultivo, a quantidade, tipo e qualidade do alimento como causadores de alterações no crescimento. Einen et al. (1998) verificaram que o tempo de jejum afetou a área de seção transversal, largura e altura em dois pontos do corpo para salmão do Atlântico.

Atualmente é possível diminuir a desuniformidade de condições ambientais dentro de um lote com a utilização de marcadores moleculares dominantes para diferenciar indivíduos de várias proles cultivadas comunalmente (Garcia de Leon et al., 1998). Este procedimento proporciona uma atribuição inequívoca de parentais aos indivíduos cultivados desde os primeiros estágios de vida, sem a necessidade de marcação física. Isto garante que todos os animais de um mesmo lote sejam expostos a uma mesma variação nictimeral e sazonal de variáveis de qualidade de água, de taxa de renovação, de velocidade de corrente, de qualidade e quantidade de patógenos oportunistas, de tipo de manejo ambiental e alimentar, e de quaisquer outros fatores ambientais interferentes no fenótipo. Um monitoramento ambiental das unidades de cultivo comunal de cada lote gera uma base de dados cujas variáveis devem ser incluídas em modelo comum de aferição de efeitos genéticos e da sua modulação ambiental sobre o fenótipo. Desta análise, é possível separar efeitos de fato genéticos, que devem ser utilizados na seleção de reprodutores, daqueles resultantes de efeitos ambientais e de suas interações com o genótipo.

Além de possibilitar a determinação de paternidade, os marcadores moleculares também podem ser úteis na MAS (Marker Assisted Selection). Os marcadores do tipo RAPD são bastante úteis para este fim, por serem bem distribuídos ao longo do DNA. A ocorrência de seqüências complementares ao primer utilizado pode se dar tanto em regiões codificantes como em DNA repetitivo, fazendo com que o RAPD proporcione cobertura genômica mais ampla e bem distribuída que os microssatélites.

Os resultados do presente trabalho, referentes aos marcadores que apresentaram efeitos significativos sobre cada um dos índices (Tabelas 3 e 4), devem ser encarados com cautela. A análise de segregação de marcadores e fenótipos é a ferramenta clássica para investigar a hipótese de ligação entre marcadores de DNA e QTL's, e os modelos mistos de relacionamento unigeracional entre marcadores e fenótipos podem dar apenas indicações neste sentido.

Foram identificadas ao todo cinco bandas candidatas à construção de marcadores para análise de segregação. A banda 27 foi a única que esteve significativamente correlacionada aos dois índices de forma utilizados e em ambos os casos, com coeficiente negativo. Isso significa que os animais portadores dela são, em média, simultaneamente mais estreitos e de menor altura que os demais. É possível que este marcador esteja ligado a alelos de genes que promovam menor desenvolvimento da musculatura, tanto dorsal quanto lateral. Se a análise de segregação confirmar isso, este marcador poderia ser utilizado na MAS como critério de exclusão de reprodutores. As bandas 4 e 21 estiveram negativamente correlacionadas com o MWI, mas não influenciaram significativamente o MHI. Contrariamente, a banda 22 influenciou negativamente apenas o MHI. Estes também são marcadores candidatos ao uso na MAS, para exclusão de indivíduos portadores.

As bandas 1 e 28 foram as únicas que apresentaram coeficientes significativos positivos, respectivamente para MWI e MHI, sendo marcadores candidatos ao uso na MAS, para inclusão de indivíduos portadores.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que os índices utilizados são adequados para seleção indireta para rendimento carcaça e filé de *O. niloticus*, por

diferentes motivos principais, relacionados à posição relativa em que altura e largura máxima foram aferidas; à relativa independência entre os dois índices; à independência dos índices em relação ao comprimento do animal; à facilidade de obtenção das medidas externas utilizadas na construção dos índices; à variabilidade fenotípica aferida; e ainda às indicações do modelo de que estes fenótipos contínuos sofrem determinação genética. A existência de marcadores RAPD potencialmente ligados à variação de forma, identificados nas análises comparativas, aumentam as perspectivas da sua utilização em futuros programas de melhoramento, utilizando estas linhagens de tilápia.

6- Discussão geral

No capítulo 2 deste trabalho, apresenta-se uma visão geral dos fenômenos responsáveis pela diferenciação e variação da diversidade genética de estoques aquícolas de tilápias, das dificuldades que estes fenômenos trazem para a condução de programas de melhoramento genético, da contribuição que a genética molecular pode apresentar para contornar estas dificuldades, do princípio de funcionamento da seleção genética assistida por marcadores moleculares de DNA e das aplicações, limitações e potencialidades dos marcadores tipo dominantes do tipo RAPD para estes fins. A combinação destes aspectos com as especificidades biológicas e de manejo de *O. niloticus*, nos permitiu estabelecer os principais passos para o estabelecimento e manutenção de banco genético desta espécie com variabilidade otimizada e para a condução de programas de MAS a partir dele.

No capítulo 3, o passo inicial deste processo foi conduzido. Linhagens de diferentes importações e localidades de cultivo foram utilizadas para aferir a variabilidade genética, expressas em termos de dissimilaridades genéticas dentro e entre as linhagens. Foi possível verificar que as linhagens brasileiras da primeira importação apresentam-se já diferenciadas entre si, apresentando inclusive marcadores diagnósticos linhagem-específicos. Essas três linhagens apresentaram dissimilaridades dentro de linhagem significativamente menores que a linhagem da segunda importação. As quatro linhagens estudadas apresentam-se

diferenciadas entre si, permitindo a inferência de que nenhuma delas deverá ser excluída da formação de estoque híbrido intraespecífico a ser utilizado como banco genético. Esta conclusão não exclui a possibilidade de ampliar ainda mais a variabilidade genética deste banco pela inclusão de mais linhagens, uma vez que se verifique que elas apresentam diferenças significativas em relação às demais. A aparente contradição dos resultados de dissimilaridades genéticas com os de distância genética calculados a partir da mesma base de dados parece indicar que há desvios da proporção de indivíduos heterozigotos em relação à esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Como o marcador utilizado é do tipo dominante, não foi possível verificar esta hipótese, mas existe evidência de que esse fenômeno tenha ocorrido (Moreira, 2000 e Sukanuma, 2004 em preparação).

Especificamente para subprogramas de melhoramento genético para resistência às condições climáticas em região temperada, o capítulo 3 traz recomendações de processamento das seqüências nucleotídicas geradoras das bandas 2, 18, 20, 22 e 23 para sua transformação em marcadores genéticos do tipo dominantes e posterior utilização em análise de ligação de cada um dos marcadores obtidos com taxa de sobrevivência de proles à baixas temperaturas constantes e/ou altos gradientes térmicos nictimerais.

Para programas de melhoramento genético para rendimento de filé e carcaça, o capítulo 4 apresenta dois fenótipos para seleção indireta deste fenótipo, o índice de altura máxima (MHI) como o de largura máxima (MWI). Os resultados obtidos a partir deste trabalho permitem verificar que ambos são fenótipos quantitativos adequados à seleção assistida por marcadores moleculares para o rendimento de filé e carcaça de tilápias dentro do banco genético formado pelas linhagens estudadas. Esta adequação vem da posição relativa em que as medidas lineares que lhes compõem são aferidas na espécie; da relativa independência entre os dois índices; da independência deles em relação ao comprimento do animal; da facilidade de sua obtenção e às indicações de que estes fenótipos contínuos sofrem determinação genética. Recomenda-se a utilização dos fragmentos de DNA geradores das bandas 1, 4, 21, 22, 27 e 28 em análise de ligação com a forma do corpo de tilápias.

7 – Conclusões

Os procedimentos gerais para a condução de programas de melhoramento genético a partir de linhagens cultivadas de *O. niloticus* do Brasil foram apresentados.

As quatro linhagens estudadas de tilápias devem ser incluídas em processo de formação de banco genético para condução de programas de melhoramento assistido por marcadores moleculares, para a ampliação de variabilidade genética.

Foram encontrados marcadores moleculares potencialmente ligados à resistência à condições de cultivo em regiões temperadas.

Foram apresentados índices adequados para aferição de herdabilidade, visando subsidiar a seleção indireta para rendimento de filé e carcaça na espécie.

Foram encontrados marcadores moleculares potencialmente ligados aos índices de largura e altura máxima na espécie.

8 – Referências

- Agnése, J.F.; Adépo-Gourène, B.; Abbans, E.K. & Fermon, Y. 1997. Genetic differentiation among natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Heredity*, 79:88-96.
- Agresti, J.J.; Seki, S.; Cnaani, A.; Poompuang, S.; Hallerman, E.M.; Umiel, N.; Hulata, G.; Gall, G.A.E. & May, B. 2000. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture*, 185:43–56.
- Almeida, F.S.; Fungaro, M.H.P. & Sodr , L.M.K. 2001. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from Tibagi River, Brazil. *J. Zoo. Lond.* 253:113-120.
- Ankorion, Y.; Moav, R. & Wohlfarth, G.W. 1992. Bidirectional mass selection for body shape in common carp. *Genetics Selection Evolution*, 24:43 –52.
- Appleyard, S.A. 1998. Application of genetic markers to fijian tilapia stocks improvement. PhD Thesis. Queensland University of Technology, Brisbane, Queensland, Australia.
- Appleyard, S.A. & Mather, P.B. 2000. Investigation into the mode of inheritance of allozyme and random amplified polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture Research*, 31: 435-445.
- Arnau, J.; Housego, P. & Olivier, R.P. 1994. The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Current Genetics*, 25: 438-444.
- Asensio, L.; González, I.; Fernández, A.; Rodríguez, M.A.; Hernández, P.E.; García, T. & Martín, R. 2001. PCR-SSCP: A Simple Method for the Authentication of Grouper (*Epinephelus guaza*), Wreck Fish (*Polyprion americanus*), and Nile Perch (*Lates niloticus*) Fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1720-1723.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall.

- Ayliffe, M.A.; Lawrence, G.J.; Ellis, J.G. & Pryor, A.J. 1994. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucleic Acid Research*, 22:1632-1636.
- Bardacki, F. & Skibinski, D.O.F. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73:117-123.
- Bardacki, F. & Skibinski, D.O.F. 1999. A polymorphic SCAR-RAPD marker between species of tilapia (Pisces: Cichlidae). *Animal Genetics*, 30: 66-68.
- Beaumont, A.R; Hoare, K. 2003. *Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture*. Blackwell Publishers, IOWA.
- Beier, D.R. 1998. Zebrafish: Genomics on the Fast Track. *Genome Research*, 8:9-17.
- Berg P. & Henryon, M. 1998. A comparison of mating designs for inference on genetic parameters in fish. In: *World Congress on Genetic Applied to Livestock Production*, 6, Armidale, Australia, 1998. Proceedings... vol. 27 p. 115.
- Bessegga, C.; Saidman, O. & Vilardi, J.C. 2000. Isozyme and RAPD studies in *Prosopis glandulosa* and *P. velutina* (Leguminosae, Mimosoidaeae). *Genetics and Molecular Biology*, 23(3):639-648.
- Bhujel, R.C.; Yakupitiyage, A.; Turner, W.A. & Little, D.C. 2001. Selection of a commercial feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish breeding in a hapa-in-pond system. *Aquaculture*, 194(3-4):303-314.
- Bolivar, R.B. & Newkirk, G.F. 2002. Response to within family selection for body weight in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a single-trait animal model. *Aquaculture*, 204:371–381.
- Borowsky, R.L. 2001. Estimating nucleotide diversity from random amplified polymorphic DNA and Amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18(1):143-148.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M. & Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32(3):314-331

- Brzeski, V. J. & Doyle, R. W. 1988. A morphometric criterion for sex discrimination in tilapia. In Pullin, R. S. V., Bhukaswan, T., Tonguthai, K. & Maclean, J. L. (editors). International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 2. Manila, Philippines. ICLARM Conference Proceedings... 15:439–444.
- Caccone, A.; Allegrucci, G.; Fortunato, C. & Sbordoni, V. 1997. Genetic differentiation within the European sea bass (*D. Labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays. *Journal of Heredity*, 88:316-324.
- Caceci, T.; El-Habback, H.A.; Smith, S.A. & Smith, B.J. 1997. The stomach of *Oreochromis niloticus* has three regions. *Journal of Fish Biology*, 50:939–952.
- Cahu C.; Infante, J.Z. & Takeuchi, T.. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227(1-4):245-258.
- Carleton, K.L.; Streelman, J.T.; Lee, B.Y.; Garnhart, N.; Kidd M. & Kocher, T.D. 2002. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Animal Genetics*, 33:140-144.
- Chao, N.H., Chao, W.C., Liu, K.C., Liao, I.C. 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *Journal of Fish Biology* 30(2):107-118.
- Chapman L.J., Galis F. & Shinn, J. 2000. Phenotypic plasticity and the possible role of genetic assimilation: Hypoxia-induced trade-offs in the morphological traits of an African cichlid. *Ecology Letters*, 3(5):387-393.
- Chatain, B. 1994. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture*, 119:371-379.
- Chew, J.S.K.; Oliveira, C.; Wright, J.M. & Dodson, M.J. 2002. Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosoma*, 111: 45-52.
- Cibert C., Fermon, Y., Vallod, D. & Meunier, F. J. 1999. Morphological screening of carp *Cyprinus carpio*: relationship between morphology and fillet yield. *Aquatic Living Resources* 12(1):1-10.

- Clement, S. & Lovell, R. T. 1994. Comparison of processing yield and nutrient composition of cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 119:299-310.
- Dasilao J.C.; Rossiter A. & Yamaoka, K. 2002. Adaptive ontogenetic shape change in flyingfish *Parexocoetus mento mento*. *Fisheries Science*, 68(1):71-76.
- Davis, G.P. & DeNise, S.K. 1998. A review of the impact of genetic markers on selection and how to evaluate their economic impact. *Journal of Animal Science*, 76 (9): 2331-2339.
- De Jesus, E.G.; Hirano, T. & Inui, Y. 1991. Changes in cortisol and thyroid hormones concentration during early development and metamorphosis in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *General and Comparative Endocrinology* 82:369-376.
- Dergam, J.A.; Paiva, S.R.; Schaeffer, C.E.; Godinho, A.L. & Vieira, F. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4): 379-387.
- Dinesh, K.R.; Lim, T.M.; Chan, W.K. & Phang, V.P.E. 1996. Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. *Aquaculture International*, 4:19-30.
- Dupont-Nivet, M.; Vandeputte, M. & Chevassus B. 2002. Optimization of factorial mating designs for inference on heritability in fish species. *Aquaculture*, 204:361-370.
- Echt, C.S., Erdalh, L.A. & McCoy, T.J. 1992. Genetic Segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome*, 35:84-87.
- Einen O.; Waagan, B. & Thomassen, M. S. 1998. Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*) - I. Effects on weight loss, body shape, slaughter- and fillet-yield, proximate and fatty acid composition. *Aquaculture*, 166(1-2):85-104.
- Ekmath, A.E., Doyle, R.W., 1990. Effective population size and rate of inbreeding in aquaculture of Indian major carps. *Aquaculture*, 85(1-4):293-305.

- Elo, K.; Ivanoff, S.; Vuorinen, J.A. & Piironen, J. 1997. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic Salmon. *Aquaculture*, 152: 55-65.
- Elvingson, P. & Johansson, K. 1993. Genetic and environmental components of variation in body traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to age. *Aquaculture*, 118:191-204.
- Engle, C.R. 1997. Marketing tilapias. In: Costa-Pierce, B.A., Rakocy, J.E. (Editors.), *Tilapia Aquaculture in the Americas*, vol. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 244–258.
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Essex Longman Group Ltd.
- Ferguson, M.M. & Danzmann, R.G. 1999. Inter-strain differences in the association between mitochondrial DNA haplotype and growth in cultured Ontario rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 178:245-252.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso dos marcadores moleculares em análise genética*. 3a edição. Brasília: EMBRAPA - CENAGEN. p. 220.
- Fishback, A.G.; Danzmann, R.G. & Ferguson, M.M. 2000. Microsatellite allelic heterogeneity among hatchery rainbow trout maturing in different seasons. *Journal of Fish Biology* 57: 1367–1380.
- Foo, C.L.; Dinesh, K.R.; Lim, T.M.; Chan, W.K. & Phang, V.P.E. 1995. Inheritance of RAPD markers in the guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Zoological Science*, 12:535-541.
- Foresti, F. 2000. Biotechnology and fish culture. *Hydrobiologia*, 420:45-47.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Galletti Júnior, P.M. & Almeida-Toledo, L.F. 1993. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome*, 36:1124-1128.
- Frank, J.P.C.; Wright, J.M. & McAndrew, B.J. 1992. Genetic variability in a family of satellite DNAs from tilapias (Pisces, Cichlidae). *Genome*, 35:719-725.

- Fuerst, P.A.; Mwanja, W. W. & Kaufman, L. 2000. The genetic history of the introduced Nile tilapia of Lake Vitória (Uganda - E. Africa): the population structure of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) revealed by DNA microsatellite markers. In Fitzsimmons K. and Carvalho, J. (Editors), International Symposium on Tilapia Aquaculture, 5, Rio de Janeiro, Brazil. Proceedings... p.30-40.
- Gall, G.A.E & Bakar, Y. 1999. Stocking density and tank size in the design of breed improvement programs for body size of tilapia. *Aquaculture*, 173:197–205.
- Gall, G.A.E & Bakar, Y. 2002. Application of mixed-model techniques to fish breed improvement: analysis of breeding value selection to increase 98-day body weight in tilapia. *Aquaculture*, 212:93-113.
- Garcia de Leon, F.J., Canonne, N.; Quillet, E.; Bonhomme, F. & Chatain, B. 1998. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 159:303-316.
- Gjedrem, T. 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research*, 31:25–33.
- Gjøfen, H. M. and Bentsen, H. B. 1997. Past, present, and future of genetic improvement in salmon aquaculture. - *ICES Journal of Marine Science*, 54:1009-1014.
- Glienke-Blanco, C. 1999. *Guignardia citricarpa* Kieli: análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. Tese (doutoramento) - Escola superior Agrícola Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- Goddard, J.S. 1996. *Feed Management in Intensive Aquaculture*. Chapman & Hall, New York.
- Gomes, C.; Oxenford, H.A. & Dales R.B.G. 1996. The use of DNA markers in the determination of stock structure of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis*, and its implications for fisheries management in the central western Atlantic. In: World Fisheries Congress, 2, Developing and Sustaining World Fisheries Resources: the State of Science and Management. Beumer, J.P. (Editor), Proceedings... Vol. 1. p. 49-50.

- Gomes, C.; Dales, R. B. G. & Oxenford, H.A. 1998. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. *Molecular Ecology*, 7:1029-1039.
- Gonçalves, E. 1993. Estratégias territoriais e reprodutivas de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. Dissertação(Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brazil.
- Haley, S.D.; Miklas, P.N.; Stavely, J.R.; Byrum, J.; Kelly, J.D. 1993. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 86:505-512.
- Hallerman, E.M. & Kapuscinski, A.R. 1995. Incorporating risk assessment and risk management into public policies on genetically modified finfish and shellfish. *Aquaculture*, 137(1-4):9-17.
- Harvey, B. & Kelley, R.N. 1984. Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. *Aquaculture* 36(1-2):85-95.
- Hassanien, H.A.; Elnady, M.; Obeida, A. & Itriby, H. 2004. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Aquaculture Research*, 35:587-593.
- Herbinger, C.M.; O'Reilly, P.T.; Doyle, R.W.; Wright, J.M. & O'Flynn, F. 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture*, 173:105–116.
- Hockaday S.; Beddow, T.A.; Stone, M.; Hancock, P. & Ross, L.G. 2000. Using truss networks to estimate the biomass of *Oreochromis niloticus*, and to investigate shape characteristics. *Journal of Fish Biology*, 57(4):981-1000.
- Hunt, G.J & Page, R.E. 1992. Patterns of inheritance of RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theoretical and Applied Genetics*. 85:15-20.

- Iguchi, K.; Watanabe, K. & Nishida, M. 1999. Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations. *Aquaculture*, 178:235-243.
- Jackson, T.R.; Martin-Robichaud, D.J. & Reith, M.E. 2003. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture*, 220(1-4):245-259.
- Johnson, D.W. & Katavic, I. 1984. Mortality, growth and swim bladder stress syndrome of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae under varied environmental conditions. *Aquaculture*, 38:67–78.
- Jonsson, B. & Jonsson, N. 2001. Polymorphism and speciation in Arctic charr. *Journal of Fish Biology*, 58:605–638.
- Kause, A.; Ritola, O.; Paananen, T.; Eskelinen U. & Mantysaari, E. 2003. Big and beautiful? Quantitative genetic parameters for appearance of large rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 62(3):610-622.
- Kazan, K.; Manners, J.M. & Cameron, D.F. 1993. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in an interspecific cross in the genus *Stylosanthes*. *Genome* 36:50-56.
- Kimberling, D.N.; Ferreira, A.R.; Shuster, S.M & Kein, P. 1996. RAPD marker estimation of genetic structure among isolated northern leopard frog populations in the south-western USA. *Molecular Ecology*, 5:521-529.
- Kirschbaum, F. & Schugardt, C. 2002. Reproductive strategies and developmental aspects in mormyrid and gymnotiform fishes. *Journal of Physiology*, 96:557–566.
- Knapik, E.W.; Goodman, A.; Ekker, M.; Chevrette, M.; Delgado, J.; Neuhauss, S.; Shimoda, N.; Driever, W.; Fishman, M.C. & Jacob, H.J. 1998. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics*, 18:338-343.
- Kocher, T.D.; Lee, W.J.; Sobolewska, H.; Penman, D.; McAndrew, B. 1998. A genetic linkage map of a cihlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148: 1225-1232.

- Koh, T.L.; Khoo, G.; Fan, L.Q. & Phang, V.P.E. 1999. Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of *Discus* (*Symphysodon* spp.) as revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Aquaculture*, 173: 485-497.
- Kovács, B.; Egedi, S.; Bártfai, R. & Orbán, L. 2001. Male-specific DNA markers from african catfish. *Genetica*, 110:267-276.
- Lam, T. J. 1980. Thyroxine enhances larval development and survival in *Sarotherodon* (*Tilapia*) *mossambicus* (Ruppell). *Aquaculture*, 21:287-291.
- Lamboy, W.F. 1994. Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. *PCR Methods and Applications*. 4:31–37.
- Lee, W.J. & Kocher, T.D. 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*, 49:169–171.
- Leoni, F.; Gallimore, C.I.; Green, J. & McLauchlin, J. 2003. A rapid method for identifying diversity within PCR amplicons using a heteroduplex mobility assay and synthetic polynucleotides: application to characterisation of dsRNA elements associated with *Cryptosporidium*. *Journal of Microbiological Methods*, 54:95-103.
- Levitan, D.R. & Grosberg, R.K. 1993. The analysis of paternity and maternity in the marine hydrozoan *Hydractinia symbiolongicarpus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology*, 2:315-326.
- Li, S.F.; Cai, W.Q. & Zhou, B.Y. 1993. Variation in morphology and biochemical genetic markers among populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquaculture*, 111(1-4):117-127.
- Littell, R.C.; Freund, R.J. & Spector, P.C. 1991. SAS^(c) system for linear models. SAS Institute Inc., Cary, USA. Third edition.
- Little, D.C.; Coward, K.; Bhujel, R.C.; Pham, T.A. & Bromage N.R. 2000. Effect of broodfish exchange strategy on the spawning performance and sex steroid hormone levels of *Oreochromis niloticus* broodfish in hapas. *Aquaculture*, 186(1-2):77-88.

- Liu, Z.; Li, P.; Argue, B.J. & Dunham, R.A. 1999. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, 174:59-68.
- Lynch, M. & Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetics structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3:91-99.
- Lynch, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 7:478-484.
- Madsen, L. & Dalsgaard, I. 1999. Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 171:41-48.
- Majumdar, K.C. & McAndrew, B.J. 1983. Sex ratios from interspecific crosses within tilapias. In The International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 1, Tel Aviv, Israel, 1983. Proceedings... p. 261-269.
- Majumdar, K.C.; Ravinder, K.; Nassaruddin, K. 1997. DNA fingerprinting in indian major carps and tilapia by Bkm 2(8) e M13 probes. *Aquaculture Research*, 28: 129-138.
- Martins C.V.B. 1997. Biologia e fusão e protoplastos de leveduras flocculantes e H₂S-. Dissertação(Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Piracicaba, Brasil. 95 p.
- Martins, C.; Wasko, A.P.; Oliveira, C.; Porto-Foresti, F.; Parise-Maltempi, P.P.; Wright, J.M. & Foresti, F. 2002. Dynamics of 5S rRNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenetics and Genome Research*, 98:78-85.
- Martins, C.; Oliveira, C.; Wasko, A.P. & Wright, J.M. 2004. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes-a review. *Aquaculture*, 231:37-49.
- McAndrew, B.J. & Majumdar, K.C. 1984. Evolutionary relationships within three Tilapiine genera (Pisces: Cichlidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 80: 421-435.

- McConnell, S.K.J.; Beynon, C.; Leamon, J. & Skibinski, D.O.F. 2000. Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* e *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. *Animal Genetics*, 31:214-218.
- Moore, S.S.; Whan, V.; Davis, G.P.; Byrne, K.; Hetzel, D.J.S. & Preston, N. 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 173:19–32.
- Moreira, H.L.M. 1999. Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microsatélite. Tese (doutoramento) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RG, Brazil.
- Moreira, H.L.M.; Delagostin, O.A. & Erdtmann, B. 2000. Levels of inbreeding and relatedness in breeder stocks of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) detected by microsatellite analysis. In Fitzsimmons, K. and Carvalho, J. (Editors). International Symposium on Tilapia Aquaculture, 5, Rio de Janeiro, Brazil. Proceedings... p. 59-67.
- Morita, K. & Suzuki, T. 1999. Shifts of food habit and jaw position of white-spotted charr after damming. *Journal of Fish Biology*, 55:1156–1162.
- Morrison, C. M. & Wright Jr., J. R. 1999. A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *Journal of Fish Biology*, 54:597–606.
- Naish, K.A.; Warren, M.; Bardacki, F; Skibinski, D.O.F & Carvalho, G.R. 1995. Use of DNA fingerprinting, RAPD and RAPD/RFLP markers for estimating variation between aquacultural strains of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 135: 48. Abstract.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Neves, F.M. & Monteiro, L.R. 2003. Body shape and size divergence among populations of *Poecilia vivipara* in coastal lagoons of south-eastern Brazil. *Journal of Fish Biology* 63(4):928-941.
- Nugent, C. The status of wild and cultured tilapia genetic resources in various countries. In: Pullin, R.S.V. (Editor). *Tilapia genetic resources for aquaculture*. Workshop on Tilapia

- Genetic Resources for Aquaculture. 1987, Bangkok, Thailand. 1988. Proceedings p... 20-23.
- O'Flynn, F.; Bailey, J.K.; Friars, G.W. 1999. Response to two generations of index selection in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 173:143-147.
- Oliveira, C. 1999. Clonagem e caracterização molecular de DNA's repetitivos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e sua localização em cromossomos metafásicos pela aplicação da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade estadual Paulista, Botucatu.
- Oliveira, C. Wright, J.M. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, 6:205-211.
- Oliveira, C.; Chew, J.S.K.; Porto-Foresti, F.; Dobson, M. & Wright, J.M. 1999. A LINE2 repetitive DNA sequence from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: sequence analysis and chromosomal distribution. *Chromosoma*, 108(7):457-468.
- Oliveira A.V.; Prioli, A.J.; Prioli, S.M.A.P.; Pavanelli, C.S.; Julio H.F. & Panarari, R.S. 2002. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Parana river floodplain of Brazil. *Genetica*, 115 (3): 259-267.
- Ostenfeld, T. H.; McLean, E. & Devlin, R. H. 1998. Transgenesis changes body and head shape in Pacific salmon. *Journal of Fish Biology*, 52:850–854.
- Palti, Y.; Shirak, A; Cnaani, A.; Feldmesser, E.; Avtalion, R.R.; Hulata, G. & Ron, M. 2001. A microsatellite locus has more than one copy in the genome of two tilapia species (*Oreochromis aureus* and *O. niloticus*). *Animal Genetics*, 32: 40-41.
- Pante, M., Gjerde, J.B. & McMillan, I. 2001a. Effect of inbreeding on body weight at harvest in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 192:201–211.
- Pante, M. J, B. Gjerde and I. McMillan. 2001b. Inbreeding levels in selected populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 192:213–224.

- Pearse, D.E.; Eckerman, C.M.; Janzen, F.J. & Avise, J.C. 2001. A genetic analogue of "mark-recapture" methods for estimating population size: an approach based on molecular parentage assessments. *Molecular Ecology*, 10: 2711-2718.
- Phillips, R.D. & Reed, K.M. 1996. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140:197-216.
- Postlethwait, J. H.; Johnson, S.L.; Midson, C.N.; Talbot, W.S.; Gates, M; Ballinger, E.W.; Africa, D; Andrews, R.; Carl, T.; Eisen, J.S.; Horne, S.; Kimmel, C.B.; Hutchinson, M.; Johnson, M. & Rodriguez, A. 1994. A genetic linkage map for the zebrafish. *Science*, 264:699-703.
- Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J.; Júlio Jr., H.F.; Pavanelli, C.S.; Oliveira, A.V. de; Carrer, H.; Carraro, D.M. & Prioli, L.M. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, Based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetic and Molecular Biology*, 25(4):421-430.
- Quesada, M.P. & Cenis, J.L. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 46(2): 204-208.
- Reddy, P.K. & Lam, T.J. 1992. Effect of thyroid hormones on morphogenesis and growth of larvae and fry of telescopic-eye black goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture* 107(4):383-394.
- Reed, D.H. & Frankham, R. 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55:1095–1103.
- Reidy, M.F.; Hamilton, W.J. & Aquadro, C.F. 1992. Excess non parental bands in offspring from known primates pedigree assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acid Research* 20:918.
- Reist, J.D. 1985. An empirical evaluation of several univariate methods that adjust for size variation in morphometric data. *Canadian Journal of Zoology*, 63:1429–1439.
- Reist, J.D. 1986. An empirical evaluation of coefficients used in residual and allometric adjustment of size covariation. *Canadian Journal of Zoology*, 64:1363–1368.

- Reiter, R.S.; Williams, J.G.K.; Feldman, K.A.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. & Scolnick, P.A. 1992. Global and local genome mapping in *Arapdopsis thaliana* by using recombinante inbred lines and random amplified polymorphic DNA. Proceedings of the National Academy of Science USA, 89:1477-1481.
- Rothuizen, J. & Van Wolferen, M. 1994. Randomly amplified DNA polymorphism in dogs are reproducible and display mendelian transmission. *Animal Genetics* 25:13-18.
- Roy, A.; Frascaria N.; Mackay, J. & Bousquet, J. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPD) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 85:73-180.
- Rutten, M.J.M.; Bovenhuis, H. & Komen, H. 2004. Modeling fillet traits based on body measurements in three Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture* (in press).
- Sadler, J.; Pankhurstm, P.M. & King, H.R. 2001. High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 198:369–386.
- Sara, M.; Favaloro, E. & Mazzola, A. 1999. Comparative morphometrics of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo* Cetti, 1777), reared in different conditions. *Aquacultural Engineering* 19(3):195-209.
- Schaarschmidt, T.H. & Jurss, K. 2003. Locomotory capacity of Baltic Sea and freshwater populations of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)* 135:411–424.
- Scott, M.P.; Haymes, K.N. & Williams, S.M. 1992. Parentage analysis using RAPD PCR. *Nucleic Acid Research*, 20:5493
- Sfakianakis, D.G.; Koumoundouros, G.; Divanach, P. & Kentouri, M. 2004. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture* (in press).

- Shikano, T & Taniguchi, N. 2002. 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*, 204:271–281.
- Shimizu, A. 2003. Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of its annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 131:310–324.
- Sorensen, D.A.; Kennedy, B.W. 1984. Estimation of response to selection using least-squares and mixed model methodology. *Journal of Animal Science*, 58(5):1097-1106.
- Souza, M.L.R. & Macedo-Viegas, E.M. 2000. Effects of filleting methods on processing yield of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In Fitzsimmons K. and Carvalho, J. (Editors), *International Symposium on Tilapia Aquaculture*, 5, Rio de Janeiro, Brazil. *Proceedings...* p. 451– 457.
- Stott, W.; Ihssen, P.E. & White, B.N. 1997. Inheritance of RAPD molecular markers in the lake trout *Salvelinus namaycush*. *Molecular Ecology*, 6:609-613.
- Su, G.S.; Liljedahl, L.E. & Gall, G.A.E., 1996. Genetic and environmental variation of body weight in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 144:71–80.
- Swain, D.P. & Foote, C.J. 1999. Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research*, 43(1-3):113-128.
- Tacon, P., Ndiaye, P., Cauty, C.; Le Menn, F. & Jalabert, B. 1996. Relationships between the expression of maternal behaviour and ovarian development in the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 146:261-275.
- Taniguchi, N.; Yamazaki, M.; Takagi, M.; Tsujimura, A. 1996. Genetic and environmental variances of body size and morphological traits in communally reared clonal lines from gynogenetic diploid ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Aquaculture*, 140:333-341.
- Tanksley, S.D.; Young, N.D.; Paterson, A.H. & Bonierbale M.W. 1989. RFLP mapping in plant-breeding - new tools for an old science. *Biotechnology* 7(3):257-264.

- Thodesen, J.; Gjerde, B.; Grisdale-Helland, B. & Storebakken, T. 2001. Genetic variation in feed intake, growth and feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 194:273–281.
- Thorgaard, G.H.; Bailey, G.S.; Williams, D.; Buhler, D.R.; Kaattari, S.L.; Ristow, S.S.; Hansen, J.D.; Winton, J.R.; Bartholomew, J.L.; Nagler, J.J.; Walsh, P.J.; Vijayan, M.M.; Devlin, R.H.; Hardy, R.W.; Overturf, K.E.; Young, W.P.; Robison, B.D.; Rexroad, C. & Palti, Y. 2002. Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)*, 133:609–646.
- Tinti, F.; Ungaro, N.; Pasolini, P.; De Panfilis, M.; Garoia, F.; Guarniero, I.; Sabelli, B.; Marano G. & Piccinetti, C. 2003. Development of molecular and morphological markers to improve species-specific monitoring and systematics of Northeast Atlantic and Mediterranean skates (*Rajiformes*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 288:149–165.
- Tiwary, B.K.; Kirubakaran, R. & Ray, A.K. 1999. Altered body shape as a morphometric indicator of triploidy in Indian catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture Research*, 30(11-12):907-910.
- Trewavas, E. 1983. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum (Natural History), London.
- Turner, S.J.; Saul, D.J.; Rodrigo, A.G.; Lewis, G.D. 2002. A heteroduplex method for detection of targeted sub-populations of bacterial communities. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 208: 9-13.
- Vandeputte, M. 2003. Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. *Aquatic Living Resources*, 16(5):399-407.
- Velasco, R.R., Janagap, C.C.; de Vera, M.P.; Afan, L.B.; Reyes, R.A. & Eknath, A.E. 1995. Genetic improvement of farmed tilapias: estimation of heritability of body and carcass traits of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 137:280-281.

- Vernon, J.G.; Jones, G.S. & Noble, L.R. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal cross-fertilization in *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Basommatophora). *Journal of Molluscan Studies*, 61:455-465.
- Volckaert, F.A.M. & Hellemans, B. 1999. Survival, growth and selection in a communally reared multifactorial cross of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 171:49–64.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. & Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407–4414.
- Wasko, A.P. & Galetti Jr., P.M. 2002. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, 474: 131–137.
- Wasko, A.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Senhorini, J.A. & Foresti, F. 2004. Genetic monitoring of the Amazonian sh matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *Journal of Applied Ichthyology*, 20:48–52.
- Welsh, J. McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18(24):7213-7218.
- Welsh, J.; Honeycutt, R.J.; McClelland, M. & Sobral, B.W.S. 1991. Parentage determination in maize hybrids using arbitrated primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theoretical and Applied Genetics*, 82:473-476.
- West-Eberhard, M.J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20:249-278.
- Wille, K.; McLean, E.; Goddard, J. S. & Byatt, J.C. 2002. Dietary lipid level and growth hormone alter growth and body conformation of blue tilapia, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 209(1-4):219-232.

- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livar, K.J.; Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22):6531-6535.
- Wright, J.M. 1989. Nucleotide sequence, genomic organization and evolution of a major repetitive DNA family in tilapia (*Oreochromis mossambicus/hornorum*). *Nucleic Acid Research*, 17:5071-5079.
- Yue, G.H. & Orban. L. 2002. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis species*. *Molecular Ecology Notes*, 2:99 –100.
- Zimmermann, S. 1999. Incubação artificial: técnica que permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. *Panorama da Aqüicultura Julho/agosto*: 15-21.

