



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAUNESP – Centro de Aqüicultura da Unesp



Desempenho de alevinos de quatro linhagens da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e análise da variabilidade genética pelos marcadores RAPD

HALUKO MASSAGO
Engenheira de Pesca

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
Abril de 2007



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAUNESP – Centro de Aqüicultura da Unesp



Desempenho de alevinos de quatro linhagens da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e análise da variabilidade genética pelos marcadores RAPD

Haluko Massago

Orientador: Prof. Dr. Newton Castagnolli

Dissertação apresentada ao Centro de Aqüicultura da Unesp, sediado no *Campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Aqüicultura.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Março de 2007

Massago, Haluko
M414d Desempenho de alevinos de quatro linhagens da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e análise da variabilidade genética pelos marcadores RAPD / Haluko Massago. – – Jaboticabal, 2007
ix, 40 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2007
Orientador: Newton Castagnolli
Banca examinadora: Ricardo Pereira Ribeiro, João Batista Kochenborger Fernandes
Bibliografia

1. Tilápia nilótica. 2. Desempenho. 3. Marcadores RAPD. I. Título. II. Jaboticabal - Centro de Aqüicultura.

CDU 639.31: 636082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

DEDICATÓRIA

À minha família.

Ao meu orientador “Dr. Newton Castagnolli”, que me aceitou como orientanda, sempre me guiou e auxiliou para a realização do presente trabalho. Afinal, foi um Pai na conclusão do presente trabalho.

Às pessoas que amo, e também àquelas que me apoiaram e/ou influenciaram de algum modo durante a realização do presente trabalho.

AGRADECIMENTOS:

Ao Deus, pela vida, e por me proporcionar encontros com pessoas maravilhosas...

À FAMÍLIA, pelo amor, incentivo, auxílio moral e financeiro...

À professora Sandra, a quem devo a ajuda na elaboração do projeto inicial de mestrado, e indicação ao presente orientador.

*Especialmente ao ORIENTADOR, Dr. **Newton Castagnolli**, que além do auxílio na elaboração do projeto, possibilitou a realização do presente trabalho, ao estar presente ao meu lado nestes dois anos, me oferecendo assistências e resolvendo os problemas. Espero que essa “desorientanda” tenha atendido em partes a expectativa, após tanta ajuda e ensinamentos recebidos...*

À Veralice, que sempre me atendeu e ajudou no que foi preciso. Também à Prof^{ta}. Irene, Prof^{ta}. Laura, Daniel, funcionários e estagiários da Pós-graduação, por facilitar muito as atividades na Caunesp, me oferecendo total apoio;

À D. Ana, Elisandra, Fátima, Silvinha, e todos os funcionários da Caunesp, por me auxiliar sempre que necessário, com todo o carinho;

Aos Professores Doutores Dalton, Elclides, Elisabete, Goitein, João Batista, Lúcia, Maria, Newton, Marta, Teresa Cristina... Enfim, a todos os professores pelos ensinamentos que recebi, dentro e fora da sala de aula.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação 25 de Julho, Universidade Estadual de Maringá, Geneforte e Centro de aquíicultura da Unes (Caunesp), por ceder os alevinos de tilápia;

À Mogiana Alimentos pela doação da ração;

À Caunesp, por disponibilizar as estruturas e os equipamentos;

À prof^a. Tereza Cristina, por ceder parte do laboratório de tilápia;

Ao Márcio A. Santos, técnico do Laboratório de Tilápia, que me ajudou durante todo o período experimental, e aos os estagiários Munir, Yaneth, etc., e amigos, pelos auxílios;

Ao Róberson, pelas fotos das tilápias e pela amizade;

Aos professores Dr Dalton e Dr João Batista por disponibilizarem os laboratórios;

Ao pessoal dos laboratórios, funcionários, estagiários e amigos pelo auxílio e incentivo;

Ao prof. Euclides C. Malheiros pelo auxílio na análise estatística.

Especialmente ao Dr. Ricardo Pereira Ribeiro da UEM, por possibilitar a análise de DNA, cedendo o laboratório e materiais necessários à realização das análises de DNA das tilápias, além de atenção oferecida, e auxílio nas correções.

Ao Jayme Povh, Nelson Barros, Patricia, Zeni, e todo o pessoal de Peixegen, e dos outros laboratórios, pelo auxílio. Principalmente ao “Jayme” e “Nelson” por me ensinar e ajudar nas análises laboratoriais e estatísticas, discussões de trabalhos, pelas fotos, apoios e amizades, além de ter me atendido sempre, mesmo tendo muito outros afazeres.

À Tiêko, bibliotecária da FCAV, pelas correções das referências bibliográficas;

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões: orientador, Dras Cristina e Marta, na qualificação, e Dres. Ricardo e João, na defesa. Aos Dres. Newton, Ricardo, Euclides, e também ao Roberto Hoppe, Jayme, etc. pelo auxílio nas correções finais.

À dona Ana, pela atenção, amor, carinho e conselhos nestes dois anos que passamos juntos, e por ter me proporcionado mais um lar, mais uma família;

Ao Róberson, Altevir, Luiz Ayroza, Jorge Casaca, Suzy, Rodrigo, Charles, Marina, Nilton, Cleujosi e tantos outros que estiveram presentes em muitos momentos, durante e após as disciplinas, pelo companheirismo e amizade.

...Enfim, agradeço a todos que encontrei nesta caminhada, mesmo que não tenha mencionado, e de alguns nem recorde os nomes, rostos ou atos... Todos os encontros me proporcionaram uma mudança na minha vida... Portanto...

MUITO OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: Considerações Gerais	01
Introdução	01
Tilápia	02
Introdução das tilápias nilóticas no Brasil	02
Desempenho	04
Marcadores genéticos	05
REFERÊNCIAS	08
CAPÍTULO II: Desempenho de alevinos de quatro linhagens da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	14
RESUMO	14
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
Animais utilizados	16
Procedimentos	17
RESULTADOS E DISCUSSÕES	18
Parâmetros da água de cultivo.....	18
Sobrevivência.....	19
Biometria.....	19
CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS	24
APÊNDICE	26
CAPÍTULO III: Análise da variabilidade genética pelos marcadores RAPD	27
RESUMO	27
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
Material Biológico.....	29

Procedimentos	29
Extração de DNA	29
Amplificação	30
Análise estatística	31
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE.....	39

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Considerações Gerais

Tabela 1. Características dos diversos marcadores moleculares em uso nos estudos de populações de peixes.....	06
--	----

CAPÍTULO II: Desempenho de alevinos de quatro linhagens da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Tabela 1. Sobrevivência (%) das quatro linhagens de tilápia nilótica durante o período experimental.....	19
Tabela 2. Valores de F e Coeficiente de Variação (CV) obtidos na análise de variância para o Peso e Comprimento Padrão das tilápias do Nilo durante o período experimental.....	20
Tabela 3. Média de peso P(g) e comprimento padrão CP (cm) das quatro linhagens de tilápia nilótica e dias de cultivo, com respectivos desvios-padrão.....	20
Tabela 4. Valores de F e Coeficiente de Variação (CV) obtidos na análise de variância para a Altura das tilápias do Nilo durante o período experimental.....	21
Tabela 5. Média Altura(cm) das quatro linhagens de tilápia nilótica e dias de cultivo, com respectivos desvios-padrão.....	21

CAPÍTULO III: Análise da variabilidade genética pelos marcadores RAPD

Tabela 1. Tamanho dos fragmentos (pb) estimados nas quatro linhagens de <i>O. niloticus</i> . O valor (1) significa a presença da banda no gel, (0) a sua ausência e (9) a amostra perdida.....	39
Tabela 2. Seqüência de nucleotídeos dos primers, número de locos total e polimórfico, e tamanho dos fragmentos amplificados nas linhagens de <i>O. niloticus</i>	32
Tabela 3. Número de reprodutores, índice de Shannon e % de locos polimórficos nas quatro linhagens de <i>O. niloticus</i> , obtidas pelo programa Popgen.....	33

- Tabela 4.** Divergência genética nas quatro linhagens de *O. niloticus*, apresentando a dissimilaridade genética intra e entre linhagens na e abaixo da diagonal, e probabilidade do erro da correlação entre a matriz representada acima da diagonal, obtida pelo coeficiente de Jaccard, utilizando matrizes de dissimilaridade pelo programa Mantel-Estruct..... 34
- Tabela 5.** Similaridade genética nas quatro linhagens de *O. niloticus* “Bouaké” (B), “GIFT” (G), “Supreme” (S) e “Chitralada” (C) 40

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II: Desempenho de alevinos de quatro linhagens da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

- Figura 1.** Caixa retangular com 120L de água (fase 1) e caixas cilíndricas com 180L de água (fase 2), para o cultivo de tilápia do Nilo. 16
- Figura 2.** *Oreochromis niloticus* das linhagens “Bouaké”, “Chitralada”, “GIFT” e “Supreme”. 16
- Figura 3.** Temperatura da água de cultivo das tilápias, durante o período experimental. 18
- Figura 4.** Oxigênio dissolvido e pH da água de cultivo das tilápias, durante o período experimental. 18
- Figura 5.** Sobrevivência das quatro linhagens de tilápia do Nilo durante a primeira fase (dias 0 a 84) do período experimental. 26
- Figura 6.** Peso(g) e comprimento padrão(cm) das quatro linhagens da tilápia do Nilo durante o período experimental. As linhas mais espessas indicam o peso. 26
- Figura 7.** Altura(cm) das quatro linhagens da tilápia do Nilo durante o período experimental. 26

CAPÍTULO III: Análise da variabilidade genética pelos marcadores RAPD

- Figura 1.** Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1972): Método UPGMA, para as quatro linhagens de *O. niloticus*. 35
- Figura 2.** Dendrograma obtido com o agrupamento UPGMA, pelo coeficiente de Jaccard utilizando o programa NTSYS, para as linhagens Bouaké (B), GIFT (G), Supreme (S) e Chitralada (C).. 36

CAPÍTULO I: Considerações Gerais

Introdução

Embora existam mais de 20 mil espécies de peixes, dos quais cerca de 10 mil de água doce, apenas algumas espécies são domesticadas. Entre elas estão os ciprinídeos, com destaque para as carpas de origem chinesa e indiana, os salmonídeos, com ênfase para a truta arco-íris e o salmão do Atlântico, os ciclídeos com as tilápias, e algumas espécies de peixes ornamentais como os lebistes e o peixe vermelho japonês (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1998). Atualmente, a carpa é o peixe mais produzido no mundo seguido pela tilápia que recentemente suplantou o salmão. Há também alguns Characiformes utilizados ou potencialmente utilizáveis em piscicultura continental no Brasil, como o lambari do rabo amarelo *Astyanax* sp, a piraputanga *Brycon microlepis*, a piapara *Leporinus obtusidens*, o pacu-caranha, *Piaractus mesopotamicus*, o tambaqui, *Colossoma macropomum*, o híbrido tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*), o curimatá, *Prochilodus lineatus* e o dourado, *Salminus maxillosus* (CYRINO *et al.*, 2004).

A produção aquícola em cativeiro vem crescendo a cada ano devido ao aumento da demanda e redução nas capturas. A produção mundial na aquíicultura aumentou para 54.785.841 toneladas em 2003 com um acréscimo de 6,2% em relação a 2002. Nesse mesmo período houve uma redução superior a 3% nas capturas (WORLD, 2006). A China continua sendo o maior produtor com 38.640.922 toneladas, enquanto o Brasil, mesmo com todo o potencial disponível, ocupa a modesta 17ª posição com 277.600 toneladas produzidas em 2003 (FAO, 2005).

O aumento na produção aquícola mundial foi da ordem de 11% nos últimos dez anos, utilizando-se somente de processos de hibridação e seleção no melhoramento genético para aumentar a produtividade de umas poucas espécies (CYRINO *et al.*, 2004). No entanto, a produtividade em aquíicultura ainda é muito baixa, se comparada com a maioria dos programas de produção zootécnica, significando que existem boas perspectivas de desenvolvimento nesta área, embora muito pouco se saiba sobre a herança das principais características de importância econômica dos peixes produzidos em confinamento (CYRINO *et al.*, 2004).

Tilápia

Tilápia é o nome comum aplicado a três gêneros de peixes africanos da família Cichlidae: *Oreochromis*, *Sarotherodon*, e *Tilapia* (POPMA e MASSER, 1999; WATANABE *et al.*, 2002). Dentre as mais de 70 espécies de tilápias, as mais importantes para a aquicultura pertencem ao gênero *Oreochromis*, incluindo a tilápia do Nilo, *O. niloticus*, a tilápia de Moçambique, *O. mossambicus*, a tilápia azul, *O. aureus*, e a *O. uroleps hornorum* (KUBITZA, 2000; WATANABE *et al.*, 2002).

As tilápias se espalharam pelo mundo e, atualmente estão catalogados mais de 100 países produtores, sendo que *O. niloticus* corresponde a cerca de 80% de toda a produção mundial da espécie, devido a sua adaptabilidade a variados sistemas de produção e condições ambientais, facilidade de reprodução e alta prolificidade, tolerância à baixa qualidade de água, boa aceitação de rações e rápido crescimento. A tilápia, além dessas características zootécnicas, apresenta ainda a carne de ótimo sabor, o que tem sido responsável pela grande aceitação comercial (HILSDORF, 1995; POPMA e MASSER, 1999; KUBITZA, 2000; WATANABE *et al.*, 2002). Com efeito, tilápia é uma espécie com crescimento ótimo entre 26 a 28 °C (CASTAGNOLLI, 1992) e o oxigênio acima de 50% da saturação - aproximadamente 3,5 a 4,0 mg/L entre 26 e 28°C, em pH entre 6,0 a 8,5 (BOYD, 1990).

Apesar de todas essas vantagens, a alta prolificidade da tilápia é um sério problema, com a tendência de superpovoamento do ambiente onde é cultivada. Portanto, vários métodos têm sido empregados para a obtenção de machos monossexo (BEARDMORE *et al.*, 2001; KUBITZA, 2000), entre eles a hibridação interespecífica (SUDEPE, 1982; CASTAGNOLLI e CYRINO, 1986), a reversão sexual na fase inicial de cultivo, pela administração de ração contendo o andrógeno sintético 17 alfa-metiltestosterona, que é a técnica mais usada atualmente (MAINARDES-PINTO *et al.*, 2000; TACHIBANA *et al.*, 2004). Mais recentemente, empresas têm anunciado a produção da tilápia geneticamente masculina (GMT) obtido pelo cruzamento de indivíduos “supermacho” com fêmeas normais. Outros trabalhos, ainda em fase de pesquisa, têm se preocupado com a produção de triploídes e tetraploídes (BEARDMORE *et al.*, 2001; CYRINO *et al.*, 2004).

Introdução das tilápias nilóticas no Brasil

A primeira introdução oficial da nilótica no país foi em 1971, com exemplares provenientes de Bouaké, Costa do Marfim - África. Esta linhagem foi introduzida no

Ceará, através do DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas) em Pentecostes (CASTAGNOLLI, 1992; ZIMMERMANN, 1999). Com o tempo, estas tilápias começaram a apresentar baixo desempenho e anomalias genéticas.

Em 1996 ocorreu a segunda importação de 20.800 alevinos procedentes da Tailândia, para Londrina, Paraná, com o manejo de incubação artificial. Esta linhagem foi domesticada desde a década de 40, inicialmente no Japão e depois na Tailândia. (ZIMMERMANN, 1999). Essa introdução melhorou o desempenho e resolveu os problemas de baixa eficiência da técnica de reversão sexual tradicional.

Em 2002 foi introduzida uma nova linhagem de tilápia nilótica, a “GST” (GenoMar Supreme Tilápia) (ZIMMERMANN, 2003; CYRINO *et al.*, 2004). No ano de 2005 foi introduzida em Maringá, a linhagem “GIFT” (Genetically Improved Farmed Tilapia) da Malásia. A linhagem GST foi introduzida no Brasil pela Piscicultura Aquabel, vinda de uma empresa Norueguesa, denominada GENOMAR, a qual, desde 1999 vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético nesta linhagem e difundindo-a a diversos países. A linhagem GIFT foi desenvolvida, inicialmente pelo ICLARM (International Center for Living Aquatic Resources Management, atual WorldFish Center) e posteriormente pelo WorldFish Center, a partir do cruzamento de oito linhagens, sendo quatro linhagens africanas selvagens e quatro linhagens domesticadas na Ásia. As linhagens africanas eram de Egito, Gana, Quênia e Senegal. As linhagens asiáticas foram “Israel”, largamente cultivadas nas Filipinas, e outras três linhagens introduzidas da “Singapura”, “Taiwan” (ambos provavelmente derivados da introdução de Israel), e “Tailândia” (provavelmente de origem egípcia). Foi realizado o melhoramento com o cruzamento e seleção por 10 gerações, entre 1988 a 1997 (Asian Development Bank, 2005), este programa de melhoramento continua sendo realizado até hoje. A Origem destas duas linhagens (GST e GIFT) é a mesma, entretanto, após 1999 o desenvolvimento das duas correu de forma independente uma da outra. A tilápia da Genomar passou a se chamar mundialmente GenoMar Supreme Tilapia (GST) (ZIMMERMANN, 2003). E a tilápia do WorldFish Center é conhecida como Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT) e foi trazida ao Brasil pela Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Zootecnia, com o apoio do Instituto de Tecnologia Agropecuária de Maringá e financiamento da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP-PR).

Desempenho

Um dos problemas enfrentados pelos tilapicultores é a redução na produtividade devido à endogamia, que ocorre com a introdução de número reduzido de matrizes nos estoques comerciais de tilápia e ou manejo inadequado (KOCHER *et al.*, 1998; CYRINO *et al.*, 2004; TACHIBANA *et al.*, 2004; WALMSLEY, 2004). No Brasil, a introdução de apenas alguns exemplares de *O. niloticus* em 1971 resultou nas anomalias em 5% a 10% do lote reproduzido e na redução da produtividade, que só foi sanada em parte com a introdução de novas linhagens de reprodutores de origem tailandesa em 1996, pois aumentou a variabilidade genética (ZIMMERMANN, 1999). Com esse aumento da variabilidade genética associada a novas tecnologias de produção e manejo, a produção de tilápias passou de 20.000 toneladas em 1996 para 75.000 toneladas em 2003 (CYRINO *et al.*, 2004).

Para melhorar cada vez mais a produtividade, são necessários os testes de desempenho entre as linhagens de peixes, para identificar as características desejáveis que pudessem ser empregadas em diversos programas de melhoramento genético como seleção, hibridação e endogamia, e técnicas modernas com uso de marcadores (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1998 e TACHIBANA *et al.*, 2004). Nas tilápias, as pesquisas relacionadas ao melhoramento genético possibilitam aumentar a eficiência produtiva, o rendimento de filé, tolerância às oscilações climáticas (WATANABE, *et al.*, 2002), e resistência à salinidade (SIFA, *et al.*, 1999). Nesta espécie, o foco do programa de seleção é restringido quase exclusivamente para a taxa de crescimento (PONZONI *et al.*, 2005).

Segundo MACARANAS *et al.* (1997) a interação genótipo-ambiente em *Oreochromis niloticus* é baixa, tanto que uma linhagem selecionada ótima para um ambiente apresenta bom desempenho em outros ambientes. No trabalho com quatro linhagens, em que testaram a reprodução, sobrevivência e crescimento, estes autores obtiveram o melhor desempenho da linhagem “Chitralada”, quando comparada a *O. mossambicus* e *O. niloticus* “Israel”, e tilápia vermelha.

Vários trabalhos realizados demonstraram que as linhagens melhoradas podem apresentar ganhos de peso mais satisfatórios. Autores como TUAN *et al.* (1998), BOSCOLO *et al.* (2001), WAGNER *et al.* (2004) e LEONHARDT *et al.* (2006) obtiveram o melhor ganho em peso da tilápia do Nilo tailandesa (“Chitralada”) em relação a linhagens locais nas fases inicial e de crescimento. MACARANAS *et al.* (1997) e MOREIRA *et al.* (2005) também obtiveram o melhor desempenho de *O.*

niloticus “Chitralada” em relação a outras linhagens. ROMANA-EGUIA e DOYLE (1992) encontraram diferenças de crescimento quando trabalhou com duas linhagens das Filipinas e uma da Tailândia na fase inicial. Porém alguns autores como NEUMANN (2004) e OSURE e PHELPS (2006) não verificaram diferenças entre linhagens em relação a ganho em peso entre linhagens de *O. niloticus*, mas verificaram a diferença na característica reprodutiva. A população melhorada GST obteve ganho em peso entre 5 e 15% por geração (ZIMMERMANN, 2003). BENTSEN *et al.* (1998) e PONZONI *et al.* (2005) realizaram a seleção de “GIFT” da 6ª geração e obtiveram a melhora no ganho em peso, na ordem de 10%. DAN e LITTLE (2000) e DEY *et al.* (2000), comparando “GIFT” com outras linhagens em cinco países da Ásia, obtiveram peso 18 a 58% maior de “GIFT” em relação às “não-GIFT”. RIDHA (2006) observou o melhor ganho em peso das linhagens melhoradas de *O. niloticus* “FAST” ($394,4 \pm 6,12g$) e “GIFT” ($366,2 \pm 9,87g$), comparado com a linhagem local não-selecionada “NS” ($253,1 \pm 6,10g$).

Outros trabalhos também relatam o desempenho diferenciado entre linhagens de tilápia do Nilo. ROMANA-EGUIA e DOYLE (1992) encontraram o melhor desempenho de linhagem “NIFI” de Tailândia comparada a duas linhagens de Filipinas, na fase inicial de cultivo. DANTING *et al.* (1995) ao trabalharem com sete linhagens de *O. niloticus* (três linhagens da África – Egito, Gana, Senegal e quatro criadas na Ásia conhecidas como Israel, Singapura, Taiwan e Tailândia) criadas separadamente ou juntas, obteve melhor desempenho da linhagem egípcia e, o menor desempenho nas linhagens de Gana e Singapura.

Marcadores genéticos

Atualmente, os programas de manipulação genética clássica como seleção, hibridação e endogamia, são usados conjuntamente com marcadores moleculares, com a finalidade de melhorar a produtividade das espécies de interesse (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1996). Os marcadores citogenéticos ou marcadores cromossômicos podem ser usados para identificar diferentes espécies (com diferentes números de cromossomos, por exemplo), a ocorrência de híbridos, bem como caracterizar o aparecimento de indivíduos triploides e tetraploides (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1996; CYRINO *et al.*, 2004).

Os marcadores moleculares são definidos por todos e quaisquer fenótipos moleculares oriundos de genes expressos, como no caso de isoenzimas, ou de um

segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas ou não do genoma e são ferramentas indispensáveis onde a identificação de espécies com base em características morfológicas e citogenéticas é impossível, bem como na separação de populações próximas geograficamente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Atualmente, são usadas várias técnicas de marcadores moleculares tais como isoenzimas, RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), AFLP (polimorfismo de fragmentos amplificados), como apresentada na Tabela 1 (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1996; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; DAVIS e HETZEL, 2000; MARQUES, 2002; LIU e CORDES, 2004; TORRES *et al.*, 2004).

Tabela 1. Características dos diversos marcadores moleculares em uso nos estudos de populações de peixes.

Características	Isoenzimas	RFLP	RAPD	Microsatélite	AFLP
Material utilizado	Proteína	DNA nuclear e DNA de organelas	DNA nuclear e DNA de organelas	DNA nuclear	DNA
Expressão genética	Co-dominante	Co-dominante	Dominante	Co-dominante	Dominante
Modo de observação do polimorfismo molecular	Genes expressos, formas alternativas de enzimas.	Fragmentos de restrição de DNA detectado por hibridização com sonda de DNA	Segmentos de DNA amplificados arbitrariamente	Aplicação específica de região contendo seqüência repetitiva	Segmento amplificado via PCR após digestão de DNA com enzima
Aplicações	Biologia evolutiva, filogenia e variabilidade de populações.	Estimativa da variabilidade genética e filogenia de espécies	Estimativa de variabilidade e similaridade entre populações, obtenção de padrões espécie-específicos, e filogenia de espécies e subespécies.	Identificação dos indivíduos, teste de paternidade e mapeamento genético.	Análise filogenética, mapeamento genético.

RFLP - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição; **VNTR** - Variable Number of Tandem Repeats; **RAPD** - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso; **AFLP** - polimorfismo de fragmentos amplificados.

Dentre estes marcadores, o RAPD apresenta como vantagem em relação aos demais a simplicidade e rapidez, necessita de uma quantidade mínima de DNA e o custo é relativamente baixo. Essa técnica utiliza *primers* mais curtos (10 bases) de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação de DNA. Usa a tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR) que envolve a síntese enzimática “*in vitro*” de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Um ciclo PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Desnaturação a 92–95 °C, anelamento a 35–60 °C, extensão a 72 °C. (LOPES *et al.*, 2002; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de marcadores RAPD é usada em *Oreochromis niloticus*, na análise da estrutura e diversidade genética (BARDAKCI e SKIBINSKI, 1994; SOUZA *et al.*, 2003; HASSANIEN *et al.*, 2004; WALMSLEY, 2004; POVH *et al.*, 2005), construção de mapas genéticos (KOCHER *et al.*, 1998), discriminação sexual (BARDAKCI, 2000) e diversidade genética entre parentais e progênies (ASTOLPH, 2003, CEPOLLARO e COLOMBO, 2003). Esta técnica é bastante usada também na análise de populações de peixes nativos das bacias do Brasil, como em espécies de piracanjuba *Brycon orbignianus* (BARRERO, 2005), *Brycon lundii* (WASKO e GALETTI JR., 2002), matrinxã *B. cephalus* (WASKO *et al.*, 2004), populações da família Pimelodidae (ALMEIDA e SODRÉ, 2002), populações de *Astyanax altiparanae* (PRIOLI *et al.*, 2002).

Além da RAPD, várias outras técnicas de marcadores moleculares são usadas em *Oreochromis*, como a de microssatélites para análise de espécies (AGNÈSE, 1999) e caracterização de estoques e polimorfismos (YUE e ORBAN, 2002; SUGANUMA, 2004), microssatélite e DNA mitocondrial (ROMANA-EGUIA *et al.*, 2004); AFLP para construção de mapa genético (KOCHER *et al.*, 1998), alozimas e RAPD para investigar a herdabilidade (APPLEYARD e MATHER, 2000).

REFERÊNCIAS

- AGNÈSE, J. F.; ADÉPO-GOURÈNE, B.; GOURÈNE, A.; OWUNI, J.; POUYAUD, L.; AMAN, R. Genetic characterization of a pure relict population of *Oreochromis esculentus*, an endangered tilapia. **Journal of Fish Biology**, London, v. 54, n. p. 1119-1123, 1999.
- APPLEYARD, S. A.; MATHER, P. B. Investigation into the mode of inheritance of allozyme and random amplified Polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 435-445, 2000.
- ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K. Comparative study by RAPD analysis of six species of the Pimelodidae family (Osteichthyes, Siluriformes) from the Tibagi River, state of Paraná, Brazil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 513-517, 2002.
- ASIAN DEVELOPMENT BANK. **An impact evaluation of the development of Genetically Improved Farmed Tilapia**: and their dissemination in selected countries. Mandaluyong, Asian Development Bank, 2005. 13,14p.
- ASTOLPH, J. L. L. **Avaliação da diversidade genética entre a geração parental e sua progênie selecionada de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem chitralada com o uso do marcador de RAPD**. 2003. 37 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2003.
- BARDAKCI, F. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in Sex Discrimination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Turkish Journal of Biology**, Kavaklıdere, v. 24, n. 1, p. 169–175, 2000.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 117-123, 1994.
- BARRERO, N. M. L. **Diversidade Genética de Populações de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), com a técnica de RAPD**. 2005. 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. J. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1-4, p. 283-301, 2001.
- BENTSEN, H. B.; EKMATH, A. E.; VERA, M. S. P.; DANTING, J.; BOLIVAR, H. L.; REYES, R. A.; DIONISIO, E. E.; LONGALONG, F. M.; CIRCA, A. V.; TAYAMEN, M. M.; GJERDE, B. Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 145–173, 1998.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Auburn: Auburn University, 1990. p. 135-159.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. São Paulo: Funep, 1992. p. 81-82.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J. E. P. **Piscicultura nos trópicos**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1986. p. 2, 103-104.

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

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 195, 204, 207, 217, 238-241.

DAN, N. C.; LITTLE, D. C. The culture performance of monosex and mixed-sex new-season and overwintered fry in three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in northern Vietnam. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 184, n. 3-4, p. 221-231, 2000.

DANTING, M. J.; EKNATH, A. E.; BENTSEN, H. B. Evaluation of growth performance testing methods for strain comparisons of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 137, n. 1-4, p. 332, 1995.

DAVIS, G. P.; HETZEL, D. J. S. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 3-10, 2000.

DEY, M. M.; EKNATH, A.E.; SIFA, L.; HUSSAIN, M.G.; THIEN, T. M.; HAO, N. V.; AYPAN, S.; PONGTHANA, N. Performance and nature of genetically improved farmed tilapia: a bioeconomic analysis. **Aquaculture Economics and Management**, Oxford, v. 4, n. 1/2, p. 85-108, 2000.

[http:// www.FAO](http://www.FAO), 2005 (Internet). FAO_Stis (02). The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) 2004.htn/Part 1.World Reviews of Fisheries and Aquaculture.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 11, 15-68.

HASSANIEN, H. A.; ELNADY, M.; ITRIBY, A. O. H. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 587-593, 2004.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas - uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1/4, p. 199-205, 1995.

KOCHER, T. D.; LEE, W.; SOBOLEWSKA, H.; PENMAN, D.; MCANDREW, B. Genetic Linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics**, Ottawa, v. 148, n. 3, p. 1225-1232, 1998.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Degaspari, 2000. p. 6-8, 19-27, 235.

LEONHARDT, J. H.; FILHO, C. M.; FROSSARD, H.; MORENO, A. M. Características morfológicas, rendimento e composição do filé de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, da linhagem tailandesa, local e do cruzamento de ambas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 125-132, 2006.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 238, n. 1-4, p. 1-37, 2004.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L.C. Marcadores Moleculares Dominantes (Rapl e Aflp). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

MACARANAS, J. M.; MATHER, P. B.; LAL, S. N.; VERIVALU, T.; LAGIBALAVU, M.; CAPRA, M. F. Genotype and environment: a comparative evaluation of four tilapia stocks in Fiji. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 11-24, 1997.

MAINARDES-PINTO, C. S. R.; FENERICH-VERANI, N.; CAMPOS, B. E. S.; SILVA, A. L. Masculinização da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17 α -Metiltestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 654-659, 2000.

MARQUES, D. K. S. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. p. 11-16. (Documentos, 36).

MOREIRA, A. A.; MOREIRA, H. L. M.; HILSDORF, A. W. S. Comparative growth performance of two Nile tilapia (Chitralada and Red-Stirling), their crosses and the Israeli tetra hybrid ND-56. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1049-1055, 2005.

NEUMANN, E. **Características do desenvolvimento inicial de duas linhagens de tilápia *Oreochromis niloticus* e uma linhagem híbrida de *Oreochromis sp.*** 2004. 63 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

OSURE, G. O.; PHELPS, R. P. Evaluation of reproductive performance and early growth of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) with different histories of domestication. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 253, n. 1-4, p. 485–494, 2006.

PONZONI, R. W.; HAMZAH, A.; Tan, S.; KAMARUZZAMAN, N. Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 247, n. 1-4, p. 203–210, 2005.

POPMA, T.; MASSER, M. **Tilapia: life history and biology**. Auburn: Auburn University / Southern Regional Aquaculture Center, 1999. p. 1-4. (Publication, 283).

PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO JR., H.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, D. M.; PRIOLI, L. M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.

POVH, J. A.; MOREIRA, H. L. M., RIBEIRO, R. P., PRIOLI, A. J., BLANCK, D. V., GASPARINO, E., STREIT, D. P. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.

RIDHA, M. Comparative study of growth performance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. at two stocking densities. **Aquaculture Research**, Oxford, v.37, p.172-179, 2006.

ROMANA-EGUIA, M. R. R.; DOYLE, R. W. Genotype-environment interaction in the response of three strains of Nile tilapia to poor nutrition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 1-12, 1992.

ROMANA-EGUIA, M. R. R.; IKEDA, M.; BASIAO, Z. U.; TANIGUCHI, N. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, n. 1-4, p. 131-150, 2004.

SIFA, L.; CHENHONG, L.; DEY, M.; DUNHAM, R. Seisability of four strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in Chinese ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 174, n. 3-4, p. 223-227, 1999.

SOUZA, A. B.; MELO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; RIBEIRO, L. P.; TEIXEIRA, E. A.; SOUSA, S. N. Analysis of RAPD as genetic marker in tilapia (*Oreochromis* spp.). In: WORLD AQUACULTURE SYMPOSIUM, 2003, Salvador. **Anais...** Salvador: World Aquaculture Society, 2003. p. 742.

SUDEPE. **Criação de carpas e tilápias**. Brasília, 1982. p. 25-26.

SUGANUMA, C. H. **Caracterização de estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de microssatélites**. 2003. 72 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; Pezzato, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. R. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 305-311, 2004.

TOLEDO-FILHO, S. A.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. **Cadernos de ictiogenética**: biotecnologia genética aplicada à piscicultura. São Paulo: Divisão de Artes Gráfica da CCS, 1996. p. 6, 37-40.

TOLEDO-FILHO, S. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; CALCAGNOTTO, D.; SANTOS, S. B. A. F.; BERNARDINO, G. **Cadernos de ictiogenética**: programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. São Paulo: Divisão de Artes Gráfica da CCS, 1998. p. 7-53

TORRES, R. A.; MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F. Genética de peixes neotropicais. II. biologia molecular de peixes neotropicais. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 10, n. 2, p. 27-37, 2004.

TUAN, P. A.; LITTLE, D. C.; MAIR, G. C. Genotypic effects on comparative growth performance of all-male tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 159, n. 3-4, p. 293-302, 1998.

WAGNER, P. M.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; POVH, J. A. Avaliação do desempenho produtivo de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 187-196, 2004.

WALMSLEY, S. M. **Identificação dos estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de marcadores moleculares**. 2004. 104 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

WASKO, A. P.; GALETTI JR., P. M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiologia**, Netherlands, v. 474, n. 1-3, p. 131-137, 2002.

WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. **Journal of applied ichthyology**, Berlin, v. 20, n. 1, p. 48-52, 2004.

WATANABE, W. O.; LOSORDO, T. M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia Production systems in the americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, n. 3-4, p. 465-498, 2002.

WORLD aquaculture outlook. **Aquaculture Magazine Buyer's Guide**, Arden, v. 35, p. 6-22, 2006.

YUE, G. H.; ORBAN, L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 99-100, 2002.

ZIMMERMANN, S. Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 54, p. 15-21, 1999.

ZIMMERMANN, S. Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 69, 2003.

CAPÍTULO II: Desempenho de alevinos de quatro linhagens da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar o desempenho inicial de quatro linhagens comerciais de *Oreochromis niloticus* denominadas “Bouaké”, “GIFT”, “Supreme” e “Chitralada”, com ênfase no ganho em peso e sobrevivência. Utilizou-se os alevinos revertidos com o peso médio de um grama. O experimento foi conduzido em sistema fechado durante 112 dias, com biometrias realizadas a cada 28 dias. Inicialmente eram mantidos 38 peixes por 120 L em cada caixa e, após 84 dias, 13 peixes por 180 L. A qualidade da água foi avaliada através dos seguintes parâmetros: temperatura, oxigênio dissolvido (OD) e Potencial Hidrogeniônico (pH). Forneceu-se inicialmente a ração em pó com 45% de proteína bruta e, depois, a ração extrusada contendo 40% do mesmo nutriente. Os pesos médios finais das linhagens “Bouaké”, “GIFT”, “Supreme” e “Chitralada” foram 98,83 g, 121,46 g, 133,20 g e 112,89 g, respectivamente. As linhagens “Supreme” e “GIFT” apresentaram melhor desempenho, sendo que o desempenho da linhagem “GIFT” foi semelhante ao da “Chitralada”. O desempenho da linhagem “Bouaké” não diferiu da “Chitralada” ($p < 0,05$). A taxa de sobrevivência (acima de 80%, com exceção da “Bouaké”) pode ser considerada normal.

Palavras-chave: *tilápia nilótica*, ganho em peso, sobrevivência, genética.

CAPITULO II: Performance of fours strains of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings

ABSTRACT

This work aimed to verify the initial performance of four commercial *Oreochromis niloticus* strains named “Bouaké”, “GIFT”, “Supreme” and “Chitralada”, with special attention on the weight gain and survival rates. Tilapia fingerlings, post reversion with mean weight of one gram were used. The experiment was carried out in a closed system of Tilapia laboratory of CAUNESP, during 112 days, and biometries for performance evaluation have been done every 28 days. Water quality was evaluated through the following parameters: temperature, dissolved oxygen and pH value. Feeding was initially with powdered ration with 45 % crude protein, and after three weeks, with extruded ration with 40% crude protein. The final mean weight of the “Bouaké”, “GIFT”, “Supreme” and “Chitralada” strains were 98.83g, 121.46 g, 133.20 g and 112.89 g, respectively. “Supreme” and “GIFT” strains presented better performance, and the “GIFT” and “Chitralada” strains were similar too ($p < 0.05$). Survival rate was considered normal (above 80%), with the exception of “Bouaké” strain.

Key- words: *niloticus tilapia*, weight gain, survival rate, genetics.

INTRODUÇÃO

As diversas espécies das tilápias que pertencem ao gênero *Oreochromis* e *Tilapia* correspondem atualmente ao grupo de peixes que mais cresce em termos de comercialização mundial e, hoje são produzidos em mais de 100 países. No Brasil a produção desses ciclídeos cresceu de 20.000 toneladas em 1996 para 75.000 toneladas em 2003 (CYRINO *et al.*, 2004). Este aumento da produção das tilápias no mundo se deve, além do apreciado sabor de sua carne, às diversas características zootécnicas (HILSDORF, 1995; KUBITZA, 2000; WATANABE *et al.*, 2002).

Os testes de desempenho são necessários para aumentar a produtividade, sendo que a taxa de crescimento é a de maior interesse em programa de seleção das tilápias (PONZONI *et al.*, 2005). Vários trabalhos demonstraram o melhor desempenho da linhagem “Chitralada” comparada às linhagens locais na fase inicial e de crescimento (TUAN *et al.*, 1998; BOSCOLO *et al.*, 2001; WAGNER *et al.*, 2004; LEONHARDT *et al.*, 2006). Outros trabalhos também indicam os melhores ganhos em peso nas linhagens melhoradas, como o peso final 18 a 58% maior da linhagem “GIFT” em relação às “não-GIFT” (DAN e LITTLE, 2000; DEY *et al.*, 2000).

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o desempenho inicial de quatro linhagens de *O. niloticus* denominados “Bouaké” (obtido da Fundação Municipal 25 de Julho – Joinville/SC, procedente de Bouaké/Costa do Marfim em 1971), “GIFT” (doado pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) - Maringá/PR, procedente de Malásia em 2005), “Supreme” (obtido do plantel do Centro de Aqüicultura da Unesp, *Campus* de Jaboticabal/SP, a partir de doação da empresa AQUABEL), “Chitralada” (produzida e comercializada pela Geneforte – Belo Horizonte, MG, originário do lote F1 de um plantel procedente da Tailândia, em 1996). Foram analisados a taxa de sobrevivência, ganho em peso, comprimento padrão e altura, num sistema fechado de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de tilapicultura do CAUNESP, *Campus* de Jaboticabal, São Paulo, no período de 27 de fevereiro a 18 de junho de 2006, totalizando 112 dias.

Inicialmente foram usadas 16 caixas retangulares com 130 L (litros) de capacidade e 120 L de água. Após quatro semanas, os alevinos foram transferidos para caixas cilíndricas com capacidade de 200L e 180L de água (Figura 1). As caixas eram abastecidas através de um sistema de recirculação e filtragem da água. As caixas cilíndricas foram cobertas com tela de 1mm de malha, e oxigenadas por um compressor radial, sendo o ar impelido por uma mangueira de silicone de 5mm de diâmetro que terminava em uma pedra porosa.



Figura 1. Caixa retangular com 120L de água (fase 1) e caixas cilíndricas com 180L de água (fase 2), para o cultivo de tilápia do Nilo.

Animais utilizados

Foram utilizados alevinos revertidos de quatro linhagens de *O. niloticus* denominadas “Bouaké”, “Chitralada”, “Supreme” e “GIFT”, com peso médio de 1,0 g.

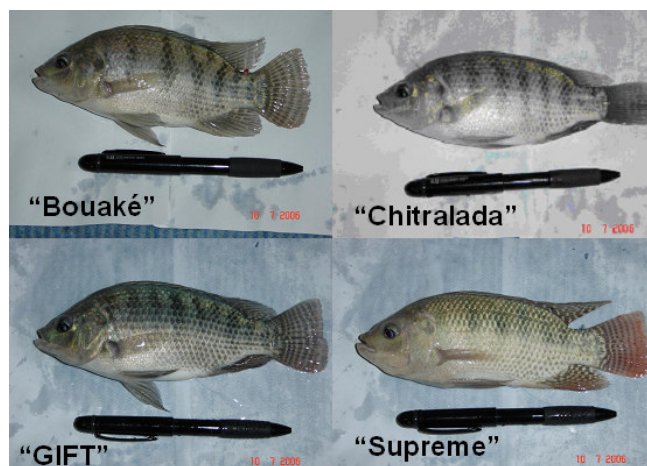


Figura 2. *Oreochromis niloticus* das linhagens “Bouaké”, “Chitralada”, “GIFT” e “Supreme”.

Procedimentos

Os peixes revertidos foram mantidos em quarentena em uma caixa retangular com 1200 L de água durante três a quatro semanas. Após esse período, foi medido o peso e comprimento padrão, e colocadas em 16 caixas (quatro linhagens e quatro repetições).

A qualidade da água foi analisada semanalmente, sendo monitorados os seguintes parâmetros: oxigênio dissolvido (OD) medido com oxímetro digital (YSI - 55), pH com pHmetro digital (Mite). A temperatura foi medida diariamente com termômetro de mercúrio.

O período experimental foi de 112 dias, sendo 84 dias de cultivo com 38 peixes de aproximadamente 1 g em cada unidade experimental. Após 84 dias, a densidade foi reduzida para 13 peixes por unidade. As biometrias foram repetidas a cada 28 dias (quatro semanas), aferindo-se o comprimento padrão e peso individual dos peixes. Nas duas últimas biometrias, mediu-se também a altura dos peixes.

As tilápias foram alimentadas com ração comercial fornecida pela Mogiana Alimentos, sendo, inicialmente, com ração em pó contendo 45% de PB (proteína bruta) e, a partir da terceira semana, fornecida ração extrusada de 1,7mm e 40% PB e, a partir da décima segunda semana, os peixes receberam ração extrusada de 2~4 mm e 40% PB. O fornecimento das rações oscilou, desde o início até o final do experimento entre 6 a 2,5% da biomassa de peixe por dia, reduzindo a quantidade de ração fornecida conforme o consumo. Foram alimentados quatro vezes ao dia até nona semana e posteriormente, três vezes por dia. Diariamente as caixas eram sifonadas, e a temperatura da água aferida antes da alimentação.

Para as variáveis acompanhadas ao longo do tempo, o delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, tendo nas parcelas as linhagens e nas subparcelas o tempo de cultivo. Para sobrevivência, o delineamento foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos as linhagens. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o SAS v.9.1 (SAS INSTITUTE, 2002-2003). Sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Parâmetros da água de cultivo

Durante o período experimental (27 de fevereiro a 18 de junho), a temperatura da água das caixas experimentais oscilou entre 24,1 a 29,4 °C (Figura 3), reduzindo-se gradativamente do início ao final do experimento. Pode-se considerar que a temperatura manteve-se, durante a maior parte do experimento (final de fevereiro até meados de maio de 2006), dentro dos níveis de conforto para a espécie (CASTAGNOLLI e CYRINO, 1986).

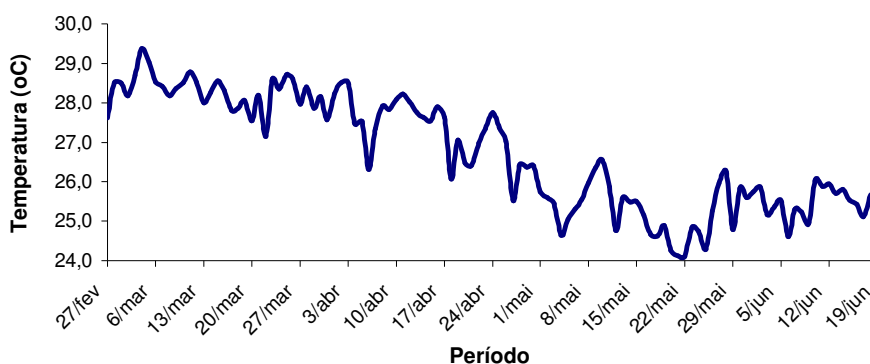


Figura 3. Temperatura da água de cultivo das tilápias, durante o período experimental.

O oxigênio dissolvido manteve-se entre 4,08 a 6,22 mg/l e o pH levemente alcalino, entre 7,40 e 8,12 como apresenta a Figura 4.

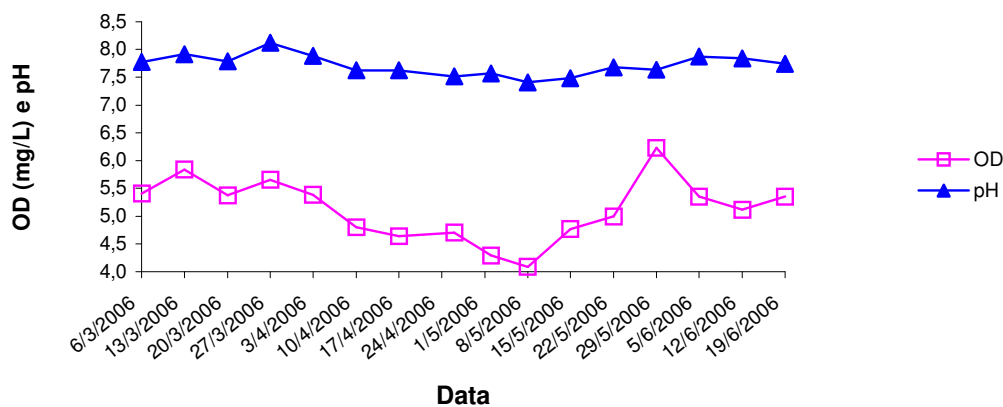


Figura 4. Oxigênio dissolvido e pH da água de cultivo das tilápias, durante o período experimental.

As condições dos parâmetros analisados estavam dentro de níveis considerados adequados para a tilápia do Nilo e outras espécies de peixes tropicais (BOYD, 1990).

Sobrevivência

A sobrevivência das tilápias durante o experimento foi acima de 80%, exceto para a linhagem “Bouaké” que apresentou a sobrevivência abaixo de 50% na primeira fase, como apresenta a Tabela 1 e Figura 5 (apêndice).

Tabela 1. Sobrevivência (%) das quatro linhagens de tilápia nilótica durante o período experimental.

Dias	Linhagens			
	“Bouaké”	“Chitralada”	“Supreme”	“GIFT”
0 a 84	46,05 ±4,16 ^b	86,84 ±4,70 ^a	90,13 ±7,09 ^a	82,24 ±7,53 ^a
85 a 112	100,00 ±0,00 ^a	100,00 ±0,00 ^a	100,00 ±0,00 ^a	98,08 ±3,33 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na horizontal diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

A maior mortalidade ocorreu entre os peixes da linhagem “Bouaké”, talvez devido a maior dificuldade de adaptação às temperaturas mais elevadas de Jaboticabal (SP), em relação às de sua procedência, em Joinville (SC).

Outros autores como WAGNER *et al.* (2004) e BOSCOLO *et al.* (2001) também encontraram a maior sobrevivência em tilápia “Chitralada” comparadas à “Bouaké” na fase inicial. Há também dados controversos, como o relatado por NEUMANN (2004), que verificou a maior taxa de sobrevivência da linhagem “Bouaké” em relação à “Chitralada”, o que justifica a nossa suposição de que, a adaptação à temperatura possa ter exercido alguma influência nos peixes da linhagem “Bouaké”.

Biometria

Houve diferenças significativas entre as linhagens quanto ao ganho em peso, comprimento padrão e altura do corpo.

Pelo teste F da análise da variância (Tabelas 2), houve interação significativa entre as linhagens da tilápia (em relação ao peso e comprimento padrão) e dias de cultivo ($p > 0,05$), e também no peso e comprimento padrão entre linhagens.

Tabela 2. Valores de F e Coeficiente de Variação (CV) obtidos na análise de variância para o Peso e Comprimento Padrão das tilápias do Nilo durante o período experimental.

Fator de variação	Variável	
	Peso	Comprimento Padrão
Linhagem	2,88*	7,38**
Dia	1395,24**	4737,58**
Linhagem x Dia	3,64**	8,62**
CV (%)	51,58	13,98

* significativo em nível de 5%; ** significativo em nível de 1%.

A comparação das médias do peso e comprimento padrão mostrou que as linhagens “Supreme” e “GIFT” apresentaram o peso final maior (133,20g e 121,46g) respectivamente, seguido de “Chitralada” (112,89g) e “Bouaké” (98,83g), como pode observar na Tabela 3 e Figura 6 (apêndice).

Tabela 3. Média de peso P(g) e comprimento padrão CP (cm) das quatro linhagens de tilápia nilótica e dias de cultivo, com respectivos desvios-padrão.

Dias		Linhagem			
		“Bouaké”	“Chitralada”	“Supreme”	“GIFT”
00	P(g)	1,40 ± 0,16 ^a	0,86 ± 0,11 ^d	1,06 ± 0,10 ^b	1,02 ± 0,15 ^c
	CP (cm)	3,51 ± 0,18 ^a	3,07 ± 0,16 ^c	3,124 ± 0,23 ^c	3,24 ± 0,19 ^b
28	P(g)	7,77 ± 3,03 ^a	6,00 ± 1,97 ^b	6,19 ± 1,98 ^b	6,37 ± 2,12 ^{ab}
	CP (cm)	5,95 ± 0,63 ^a	5,26 ± 0,80 ^c	5,67 ± 0,55 ^{ab}	5,35 ± 0,74 ^{bc}
56	P(g)	25,76 ± 9,49 ^a	27,82 ± 8,46 ^a	30,93 ± 12,74 ^a	27,82 ± 8,28 ^a
	CP (cm)	8,57 ± 1,03 ^b	8,96 ± 1,01 ^{ab}	9,46 ± 1,36 ^a	8,91 ± 0,94 ^{ab}
84	P(g)	58,59 ± 24,59 ^b	62,83 ± 20,89 ^{ab}	68,89 ± 25,43 ^a	65,35 ± 19,49 ^{ab}
	CP (cm)	11,04 ± 1,53 ^b	11,67 ± 1,41 ^a	12,05 ± 1,72 ^a	11,66 ± 1,23 ^a
112	P(g)	98,83 ± 43,01 ^c	112,89 ± 35,94 ^{bc}	133,20 ± 42,26 ^a	121,46 ± 36,35 ^{ab}
	CP (cm)	13,27 ± 1,92 ^c	14,38 ± 1,61 ^b	15,26 ± 1,56 ^a	14,57 ± 1,55 ^{ab}

Médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

As linhagens “Chitralada”, “GIFT” e “Supreme” apresentaram o peso final 14,2%, 22,9% e 34,8% maior em relação à “Bouaké”. Quanto ao comprimento padrão final, as linhagens “Supreme” e “GIFT” apresentaram os maiores valores, seguidos pelas linhagens “Chitralada” e “Bouaké”.

Pelo teste F da análise da variância (Tabela 4), não houve interação significativa entre a altura do corpo das linhagens e dias de cultivo ($p>0,05$) nos dias 84 e 112, porém, houve diferença entre as médias das alturas.

Tabela 4. Valores de F e Coeficiente de Variação (CV) obtidos na análise de variância para a Altura das tilápias do Nilo durante o período experimental.

Fator de variação	Altura
Linhagem	9,36**
Dia	263,54**
Linhagem x Dia	0,28 ^{NS}
Coeficiente de variação (%)	12,73

* significativo em nível de 5%; ** significativo em nível de 1%; ^{NS} não significativo

Pela análise da comparação das médias entre as alturas das linhagens, observou-se diferenças significativas, como apresentadas na Tabela 5 e Figura 7 (apêndice). A maior altura no dia 112 foi observada em “Supreme”, com 5,76cm, que foi igual a “GIFT”, com 5,1cm. A média da “Chitralada”, com 4,37cm, foi igual a “GIFT”. A “Bouaké” apresentou 4,cm, que foi igual a “Chitralada”, mas diferiu significativamente das demais.

Tabela 5. Média de Altura(cm) das quatro linhagens de tilápia nilótica e dias de cultivo, com respectivos desvios-padrão.

Linhagem	Dia		Geral
	84	112	
“ Bouaké ”	4,20 ± 0,70	5,20 ± 0,90	4,70±0,94 ^c
“ Chitralada ”	4,37 ± 0,59	5,39 ± 0,78	4,88±0,86 ^{bc}
“ Supreme ”	4,67 ± 0,66	5,76 ± 0,80	5,22±0,91 ^a
“ GIFT ”	4,55 ± 0,50	5,47 ± 0,66	5,01±0,74 ^{ab}

Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

A relação altura do corpo/comprimento padrão ao final do experimento, para as linhagens “Bouaké”, “Chitralada”, “Supreme” e “GIFT” foram 0,39, 0,37, 0,38 e 0,37, respectivamente. A linhagem Bouaké apresentou maior altura em relação ao comprimento, indicando que é mais arredondado.

O melhor desempenho em ganho em peso da linhagem “Chitralada” em relação à “Bouaké” obtidas neste trabalho está de acordo com BOSCOLO *et al.* (2001) e WAGNER *et al.* (2004), que também observaram o melhor ganho em peso da linhagem “Chitralada”, quando comparada à “Bouaké”. Da mesma forma, MACARANAS *et al.* (1997), TUAN *et al.* (1998) e LEONHARDT *et al.* (2006) obtiveram melhores ganhos em peso da linhagem tailandesa (“Chitralada”), quando comparada à local e híbrida. MOREIRA *et al.* (2005) relatou o melhor desempenho da “Chitralada” em relação à tilápia vermelha. No entanto, na fase de reversão sexual, TACHIBANA *et al.* (2004) verificaram melhores sobrevivência e ganho em peso da linhagem “Bouaké” de Santa Catarina e “Chitralada”, comparadas às outras duas linhagens “Bouaké”.

Ao final do experimento, a linhagem “Supreme” destacou-se das demais, e o ganho em peso obtido por esta linhagem foi 34,8%, 18,0% e 9,7% maior quando comparadas às linhagens “Bouaké”, “Chitralada” e “GIFT”, respectivamente. Estes dados concordam com ZIMMERMANN (2003) ao relatar que a linhagem “Supreme” apresentou melhor desempenho que as demais linhagens.

Neste trabalho, a linhagem “GIFT” apresentou ganhos em peso 7,6 e 22,9% maiores que as linhagens “Chitralada” e “Bouaké”, respectivamente. Este desempenho superior de “GIFT” em relação a linhagens “Chitralada” e ou local, foi demonstrado também por DAN e LITTLE (2000) que obtiveram peso final significativamente maior da linhagem “GIFT” em relação à “Chitralada” e outra *O. niloticus* do Vietnã, criados durante seis meses em gaiolas e viveiros. DEY *et al.* (2000), comparando “GIFT” com outras linhagens em cinco países da Ásia, obtiveram ganhos de peso entre 18 a 58% maiores de “GIFT” em relação às “não-GIFT”. RIDHA (2006) também observou o melhor ganho em peso das linhagens melhoradas de *O. niloticus* “FAST” e “GIFT”, comparadas com a linhagem não-selecionada “NS”.

O resultado da análise indica que, nas condições de teste realizado, as linhagens que sofreram seleção e melhoramento genético mais intenso (“Supreme” e “GIFT”) foram as de melhores desempenhos.

CONCLUSÕES

Com exceção da linhagem “Bouaké”, a sobrevivência dos peixes, pode ser considerada normal.

As linhagens selecionadas apresentaram melhor desempenho.

Ao final do experimento, a linhagem “Supreme” apresentou ganho em peso 34,8%, 18,0% e 9,7% superior quando comparadas às linhagens “Bouaké”, “Chitralada” e “GIFT”, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.
- BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Auburn: Auburn University, 1990. p. 135-159.
- CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J. E. P. **Piscicultura nos trópicos**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1986. p. 2, 103-104.
- CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 204, 217, 238, 240-241.
- DAN, N. C.; LITTLE, D. C. The culture performance of monosex and mixed-sex new-season and overwintered fry in three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in northern Vietnam. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 184, n. 3-4, p. 221-231, 2000.
- DEY, M. M.; EKNATH, A.E.; SIFA, L.; HUSSAIN, M.G.; THIEN, T. M.; HAO, N. V.; AYPAN, S.; PONGTHANA, N. Performance and nature of genetically improved farmed tilapia: a bioeconomic analysis. **Aquaculture Economics and Management**, Oxford, v. 4, n. 1/2, p. 85-108, 2000.
- HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas - uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1/4, p. 199-205, 1995.
- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Degaspari, 2000. p. 6-8.
- LEONHARDT, J. H.; FILHO, C. M.; FROSSARD, H.; MORENO, A. M. Características morfológicas, rendimento e composição do filé de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, da linhagem tailandesa, local e do cruzamento de ambas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 125-132, 2006.
- MACARANAS, J. M.; MATHER, P. B.; LAL, S. N.; VEREIVALU, T.; LAGIBALAVU, M.; CAPRA, M. F. Genotype and environment: a comparative evaluation of four tilapia stocks in Fiji. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 11-24, 1997.
- MOREIRA, A. A.; MOREIRA, H. L. M.; HILSDORF, A. W. S. Comparative growth performance of two Nile tilapia (Chitralada and Red-Stirling), their crosses and the Israeli tetra hybrid ND-56. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1049-1055, 2005.
- NEUMANN, E. **Características do desenvolvimento inicial de duas linhagens de tilápia *Oreochromis niloticus* e uma linhagem híbrida de *Oreochromis* sp.** 2004.

63 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

PONZONI, R. W.; HAMZAH, A.; Tan, S.; KAMARUZZAMAN, N. Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 247, n. 1-4, p. 203–210, 2005.

RIDHA, M. Comparative study of growth performance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. at two stocking densities. **Aquaculture Research**, Oxford, v.37, p.172-179, 2006.

SAS INSTITUTE. SAS System for Microsoft Windows, version 9.1. Cary, 2002-2003.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; Pezzato, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. R. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 305-311, 2004.

TUAN, P. A.; LITTLE, D. C.; MAIR, G. C. Genotypic effects on comparative growth performance of all-male tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 159, n. 3-4, p. 293-302, 1998.

WAGNER, P. M.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; POVH, J. A. Avaliação do desempenho produtivo de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 187-196, 2004.

WATANABE, W. O.; LOSORDO, T. M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia Production systems in the americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, n. 3-4, p. 465-498, 2002.

ZIMMERMANN, S. Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 69, 2003.

APÊNDICE

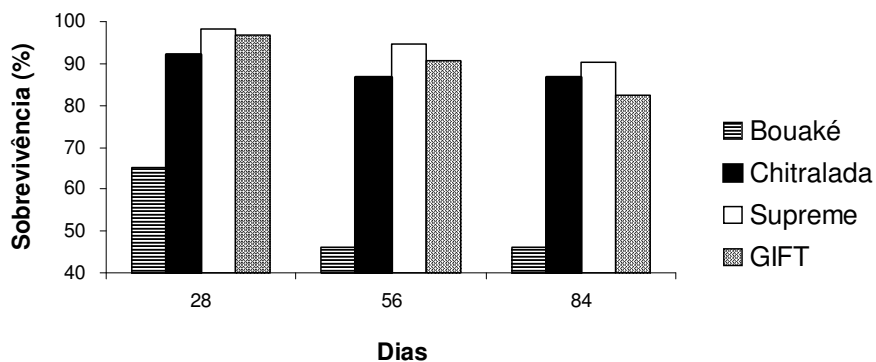


Figura 5. Sobrevivência das quatro linhagens de tilápia do Nilo durante a primeira fase (dias 0 a 84) do período experimental.

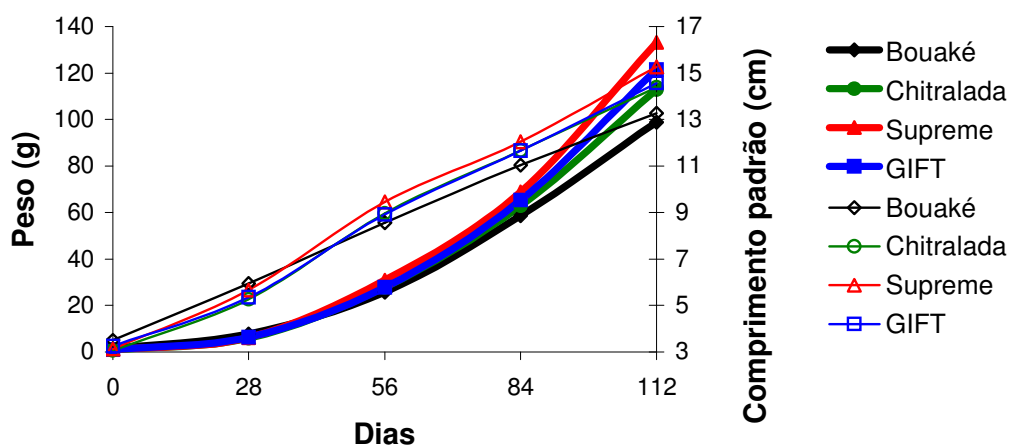


Figura 6. Peso(g) e comprimento padrão (cm) das quatro linhagens da tilápia do Nilo durante o período experimental. As linhas mais espessas indicam o peso.

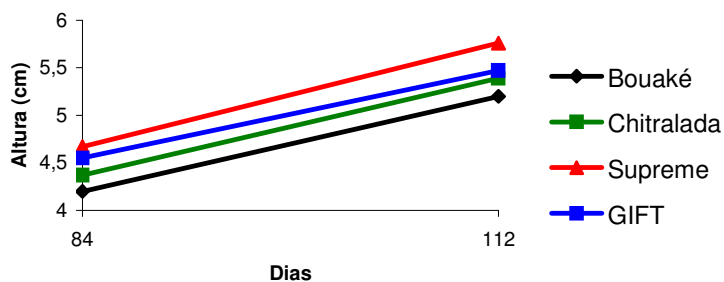


Figura 7. Altura(cm) das quatro linhagens da tilápia do Nilo durante o período experimental.

CAPÍTULO III: Análise da variabilidade genética pelos marcadores RAPD

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo analisar a divergência genética entre quatro linhagens comerciais da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*: “Bouaké”, “Chitralada”, “GIFT” e “Supreme”. Estas linhagens foram geneticamente identificadas através dos marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), a partir de amostras de tecido de nadadeira caudal de oito indivíduos de cada linhagem. Os valores da divergência genética das quatro linhagens foram calculados pelo teste de Jaccard, pelo programa Mantel-Estruct e, a variabilidade genética das populações, foi determinada pelo índice de diversidade genética de Shannon e porcentagem de locos polimórficos, usando o programa PopGene 1.31. O dendrograma foi obtido com o programa NTSYS 1.7. A linhagem “Bouaké” apresentou maior distância genética em relação às demais linhagens, com divergência genética significativa ($p < 0,05$). A linhagem “Bouaké” apresentou também o maior polimorfismo.

Palavras-chave: tilápia, marcador genético, divergência genética.

CHAPTER III: Genetic variability determination through RAPD markers in four Nile tilapia strains

ABSTRACT

The aim proposal of this work was to study the genetically divergences among four commercial Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus*): “Bouaké”, “Chitralada”, “GIFT” and “Supreme”. The strains were genetically identified through the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular markers, analyzed in segments of the anal fin tissues taken from eight individuals of each strain. The genetic divergence values were estimated through Jaccard and Mantel-Estruct program and the genetic variability patterns were calculated using the genetic diversity index of Shannon and the percentage of polymorphic loci, through the PopGene 1.31 program. The dendrogram was made through the NTSYS 1.7 program. “Bouaké” strain presented the wider genetic distance in relation to the other ones, with a significant genetic divergence ($P < 0.05$). “Bouaké” strain has presented also higher polymorphism.

Key- words: tilapia, molecular markers, genetic divergence.

INTRODUÇÃO

A necessidade da seleção de linhagens e programas de melhoramento de características tais como crescimento e ganho em peso faz de marcadores moleculares ferramentas amplamente utilizadas, associados aos métodos tradicionais de seleção para manter a variabilidade e obter plantéis de melhor desempenho (MARQUES, 2002; WALMSLEY, 2004). Entre as várias técnicas de marcadores moleculares usadas, a técnica de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) apresenta como vantagem a simplicidade e rapidez, obtenção de muitos locos com pouca quantidade de DNA, não necessita do conhecimento prévio da seqüência do DNA, além de um custo relativamente baixo. O RAPD comporta como marcadores genéticos dominantes e são utilizados na análise da estrutura e diversidade genética, no estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre espécies; na construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e localização de genes de interesse econômico (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; LOPES *et al.*, 2002; HASSANIEN, 2004).

Vários trabalhos com marcadores moleculares têm sido realizados para *Oreochromis*. Este grande interesse nos estudos sobre a tilápia se deve ao fato deste ciclídeo africano ter se espalhado no mundo todo, com cultivo em mais de 100 países atualmente, sendo o segundo peixe mais produzido em todo o mundo (CYRINO *et al.*, 2004; ROMANA-EGUIA *et al.*, 2004), além de facilidade de manejo. Foram realizados vários trabalhos de populações com marcadores RAPD, como na análise da estrutura e diversidade genética (BARDAKCI e SKIBINSKI, 1994; SOUZA *et al.*, 2003; HASSANIEN *et al.*, 2004; WALMSLEY, 2004; POVH *et al.*, 2005), para investigar a herdabilidade (APPLEYARD e MATHER, 2000; ASTOLPH, 2003; CEPOLLARO e COLOMBO, 2003), construção de mapas genéticos (KOCHER *et al.*, 1998) e discriminação sexual (BARDAKCI, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo realizar a análise genética pelo método de RAPD, para analisar a divergência genética entre quatro linhagens de *O. niloticus* denominados “Bouaké” (da introdução oficial de 1971, de Bouaké, Costa do Marfim), “Chitralada” (introdução de 1996, da Tailândia), “Supreme” (Genomar Supreme Tilápia) e “GIFT” (Genetically Improved Farmed Tilápia - introdução da Malásia, em 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

As análises genéticas das nadadeiras foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Maringá (UEM), localizada no município de Maringá - PR.

Material Biológico

A análise do DNA foi realizada a partir dos segmentos da nadadeira caudal dos juvenis de quatro linhagens da tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* denominadas “Bouaké”, “GIFT”, “Supreme” e “Chitralada”.

Retirou-se aproximadamente 2cm² da nadadeira caudal de oito tilápias de cada linhagem. Esse material foi fixado individualmente em frasco numerado contendo álcool etílico, para posterior análise genética.

Procedimentos

Extração de DNA

Realizou-se as análises do DNA das linhagens seguindo-se a metodologia descrita por BARDAKCI e SKIBINSKI (1994), modificado por POVH *et al.* (2005).

Foram cortadas aproximadamente 0,5cm² de nadadeiras, colocadas em micro tubos e lavadas três vezes com álcool comum. Em seguida foram adicionados 550µL de tampão de lise (50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl e 1% de SDS), 30µl de SDS (20%) e 7µL de proteinase K (200µg/ml) nas amostras e incubadas “*overnight*” em banho-maria a 50°C.

Posteriormente o DNA foi purificado com duas extrações com fenol-Tris pH 8,0 e três com clorofórmio: colocou-se 550µl de fenol/clorofórmio, sendo 275µl de fenol e 275µl de clorofórmio, misturou-se as fases por inversão do tubo e centrifugou-se por cinco minutos a 12000rpm. Em seguida retirou-se aproximadamente 400µl do sobrenadante, o qual foi colocado em tubo novo. Repetiu-se a adição do fenol/clorofórmio, sendo 250µl de fenol e 250µl de clorofórmio. Misturou-se as fases por inversão do tubo, e centrifugou-se por quatro minutos a 12000rpm. Retirou-se aproximadamente 400µl do sobrenadante que foi

colocado em tubo novo, ao qual foi adicionado 400µl de clorofórmio. Misturaram-se as fases por inversão do tubo e centrifugou-se durante três minutos a 12000rpm.

Aproximadamente 300 µl do sobrenadante foi transferido para um tubo novo e adicionado 1/10 de acetato de sódio 3M (pH 7,0) e 2,5 vezes (em relação ao volume de acetato de sódio) de etanol absoluto gelado (para 300µl de sobrenadante, ao qual foram adicionados 30µl de acetato de sódio e 750µl de etanol). Novamente as fases foram cuidadosamente misturadas por inversão do tubo até aparecer um precipitado branco (DNA), que foi incubado “*overnight*” a -20°C .

Para precipitar e ressuspender o DNA, centrifugou-se 4 minutos a 12000 rpm e, depois de vertido o etanol, colocou-se 500µl de etanol 70%, centrifugou-se 5 minutos a 12000rpm, e novamente vertida o etanol, secou-se a temperatura ambiente por aproximadamente 30minutos. Em seguida adicionou-se 85µl de tampão TE (10mM de Tris pH 8,0 e 1mM de EDTA). A seguir tratou-se com 6µl de RNase (30µg/ml), e deixou-se em banho-maria à 37°C por uma hora. Posteriormente o DNA foi conservado em freezer a -20°C .

O DNA foi quantificado por comparação com concentrações de DNA fago λ conhecidas. Para tanto foi colocado no micro túbulo 8µl de TE, 2µl de STOP e 1µl de solução de DNA. Para o padrão de DNA fago λ -25ng/µl (λ 25, λ 50, λ 75 e λ 100). Usou-se TE, 2µl de STOP e padrão DNA, totalizando 11µl. Após homogeneizar, foi pipetada em gel de agarose 1%. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X (40mM de Tris-acetato e 1mM de EDTA) por uma hora a 70 V. Colocou-se numa bandeja com brometo de etídio (30µL/L) para ser revelada. A imagem foi capturada por um sistema de EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

Após a análise visual das amostras de DNA, padronizou a solução de DNA acrescentando o TE.

Amplificação

As condições das amplificações foram baseadas em WILLIAMS *et al.* (1990), modificadas por POVH *et al.* (2005).

O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 15µL, no qual se utilizou tampão 1X Tris-KCl, 2mM de MgCl_2 , 0,2mM de cada dNTP, 0,46µM de *primer*, uma unidade de *Taq* DNA Polimerase e 10ng de DNA.

Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida foram realizados 40 ciclos, cada um consistindo de: um minuto de desnaturação a 94°C, um minuto e trinta segundos de anelamento a 40°C e dois minutos de extensão a 72°C, após o que realizou uma extensão final a 72°C durante cinco minutos. As reações de RAPD foram amplificadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient”, com oligonucleotídeos de 10 bases do Kit OPA, OPW e OPX da Operon (Operon Technologies Ltd.), usados como *primers* aleatórios de RAPD, para a seleção dos *primers* que geraram bandas mais nítidas e consistentes.

A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 0,5X (45mM de Tris-Borato e 1mM de EDTA) por quatro horas a 70V. A imagem foi capturada por um sistema de EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

Análise estatística

O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão *ladder* 100 pb. A presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo locos) foi usada para a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando “1” como a presença da banda no gel e “0” como sua ausência (Tabela 01). A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, com a matriz de similaridade foi construído um dendrograma com o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*). Utilizou-se para essas análises, o programa NTSYS 1.7 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 1989).

Os valores de divergência genética dentro e entre as quatro linhagens, as correlações entre as matrizes e as permutações foram calculadas pelo teste de Jaccard, pelo programa Mantel-Estruct (MILLER, 1999).

A variabilidade genética dentro de cada população foi determinada pelo Índice de diversidade genética de Shannon, pela diversidade genética de Nei's (1973), e pela porcentagem de locos polimórficos, e a variabilidade genética entre as populações foi determinada pela diversidade genética de Nei's (1973) (G_{st}). Para estas análises foi utilizado o programa PopGene 1.31 (YEH *et al.*, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 81 locos com 11 primers nas linhagens de *O. niloticus* “Bouaké”, “GIFT”, “Supreme” e “Chitralada”, como apresentam as Tabelas 1 (anexo) e 2. O tamanho dos fragmentos de DNA variou de 250-2500pb, e ocorreu a ausência de locos nos primers OPA02 para “GIFT” (1500pb), OPA12 para “Supreme” (1200pb), “Bouaké” e “GIFT” (1200pb) e OPA20 para “Bouaké” (1100pb), porém não foram encontrados locos exclusivos para a linhagem, como mostra a Tabela 1. Talvez o uso de mais indivíduos e diferentes primers possibilitem encontrar alguns locos linhagem-específica.

Tabela 2. Seqüência de nucleotídeos dos primers, número de locos total e polimórfico, e tamanho dos fragmentos amplificados nas linhagens de *O. niloticus*.

Primers	Seqüência de nucleotídeos (5' → 3')	Nº de locos total	Nº de locos polimórficos	Tamanho dos fragmentos (pb)
OPA 01	5'-CAGGCCCTTC-3'	8	2	300-2000
OPA 02	5'-TGCCGAGCTG-3'	10	5	400-2500
OPA 03	5'-AGTCAGCCAC-3'	8	5	600-1500
OPA 12	5'-TCGGCGATAG-3'	9	6	450-2500
OPA 16	5'-AGCCAGCGAA-3'	7	3	200-2000
OPA 20	5'-GTTGCGATCC-3'	8	4	350-2500
OPW 01	5'-CTCAGTGTCC-3'	5	1	350-1100
OPW 04	5'-CAGAAGCGGA-3'	6	2	500-1300
OPW 08	5'-GACTGCCTCT-3'	7	1	600-1700
OPW 19	5'-CAAAGCGCTC-3'	6	1	500-1400
OPX 01	5'-CTGGGCACGA-3'	7	4	250-1400
Total		81	34	250-2500

WALMSLEY (2004) encontrou locos exclusivos para as diferentes linhagens usando métodos de marcador RAPD, ao trabalhar com quatro linhagens de *O. niloticus*, sendo três linhagens originárias da primeira introdução em 1971- “Bouaké”, e uma “Chitralada”.

A Tabela 3 apresenta o total de bandas polimórficas (41,98%), um valor semelhante ao encontrado por POVH *et al.* (2005) que obteve 90 locos, com 50% de

polimorfismo, porém mais baixa do que a encontrada por WALMSLEY (2004) que obteve 42 bandas, com 95,24% de polimorfismo.

Tabela 3. Número de reprodutores, índice de Shannon e % de locos polimórficos nas quatro linhagens de *O. niloticus*, obtidas pelo programa Popgen.

Linhagem	Número de reprodutores (macho: fêmea)	Índice de Shannon	% de locos polimórficos
“Bouaké”	28:70	0,1493	24,69
“Chitralada”	20:30	0,1166	19,75
“Supreme”	10:30	0,1242	20,99
“GIFT”	30:30	0,1177	18,52
Geral para 4 linhagens	-	0,2035	41,98

Em relação a linhagens, o maior polimorfismo foi encontrado pela linhagem “Bouaké” (24,69%), o que sugere maior variação genética desta espécie em relação às demais, sendo a “GIFT” menos polimórfica (18,52%). O maior polimorfismo é evidenciado também pelo índice de Shannon da “Bouaké” (0,1493), que foi maior do que nas linhagens, “GIFT” (0,1177), “Supreme” (0,1242) e “Chitralada” (0,1166). O maior polimorfismo da “Bouaké” pode ter sido ocasionado pelo maior número de reprodutores que participaram dos acasalamentos.

Este resultado está de acordo com WALMSLEY (2004) que encontrou maior polimorfismo nas três linhagens “Bouaké” (85,7%, 85,7% e 83,3%) comparadas à “Chitralada” (78,6%). Contrariamente, ao estudar as duas linhagens de reprodutores de gerações de 1997, POVH *et al.* (2005) obtiveram a menor porcentagem de locos polimórficos para a linhagem “Bouaké” (18,9%) comparada à “Chitralada” (33,3%), com índice de Shannon 0,104 (“Bouaké”) e 0,198 (“Chitralada”). Não se sabe a que atribuir essa aparente incoerência.

SUGANUMA (2004) também observou a maior variabilidade genética na população da linhagem “Chitralada”, ao analisar quatro populações de *O. niloticus*, três da linhagem “Bouaké” e uma da linhagem “Chitralada”, pelo método de Microsatélites. Em outro estudo, HASSANIEN *et al.* (2004) observaram a diversidade genética de *O. niloticus* coletados de quatro rios do Nilo (Cairo, Assuit e Qena) e os lagos Delta (Burullus e Manzalla) no Egito, analisados pelo método RAPD. Os autores obtiveram 230 bandas, com polimorfismo em linhagem da

Manzalla (29,4%) e Burullus (24%), que eram baixas comparadas com Assuit (30,54%) e Qena (44,84%), sugerindo grande potencial da linhagem Qena para uso em programa de melhoramento devido a maior chance de obter indivíduos com características genéticas variadas.

Neste trabalho, os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram a divergência genética nas quatro linhagens de *O. niloticus*. A maior distância foi obtida pela “Bouaké”, com divergência em relação a todas as demais linhagens. A linhagem “Supreme” não apresentou divergência significativa em relação a linhagens “GIFT” e “Chitralada” pelo coeficiente de Jaccard ($p > 0,05$).

Tabela 4. Divergência genética nas quatro linhagens de *O. niloticus*, apresentando a dissimilaridade genética intra e entre linhagens na e abaixo da diagonal, e probabilidade do erro da correlação entre a matriz representada acima da diagonal, obtida pelo coeficiente de Jaccard, utilizando matrizes de dissimilaridade pelo programa Mantel-Estruct.

Linhagem	“Bouaké”	“Chitralada”	“Supreme”	“GIFT”
“Bouaké”	0,0991	0,040 *	0,001 **	0,005 **
“Chitralada”	0,1070	0,0968	0,124^{ns}	0,025 *
“Supreme”	0,1409	0,1109	0,1086	0,089^{ns}
“GIFT”	0,1104	0,0979	0,1019	0,0684

^{ns} Não significativo; *Significativo em nível de 5% e **Significativo em nível de 1%.

POVH *et al.* (2005) encontraram diferenças de divergência genética com valores de 0,224 e 0,221 quando comparou as linhagens “Bouaké” e “Chitralada”. WALMSLEY (2004) também observou diferenças significativas ao analisar quatro linhagens de *O. niloticus*, sendo as três linhagens de “Bouaké” e uma de “Chitralada”. Contudo, dentro das linhagens de “Bouaké” não foram encontradas diferenças significativas. HASSANIEN *et al.* (2004) observaram distância genética acentuada entre duas populações de rios da bacia do Nilo e lagos do Delta, com distância entre 0,183 a 0,213, pelo método RAPD ao analisarem a diversidade genética de *O. niloticus* coletados de quatro rios do Nilo (Cairo, Assuit e Qena) e lagos do Delta (Burullus e Manzalla) no Egito.

Pelo dendrograma baseado na distância genética de Nei (1972): Método UPGMA para as quatro linhagens de *O. niloticus* (Figura 1), observa-se que as

linhagens “Chitralada” e “GIFT” apresentam maior proximidade genética, e a linhagem “Bouaké” apresenta a maior distância genética das demais. Isso demonstra a possibilidade obter maior variação genética quando cruzada aos demais, o que poderá auxiliar no aumento da variabilidade genética de futuros cruzamentos, e que não deve ter havido contribuição dessa linhagem na formação das linhagens melhoradas “GIFT” e “Supreme”.

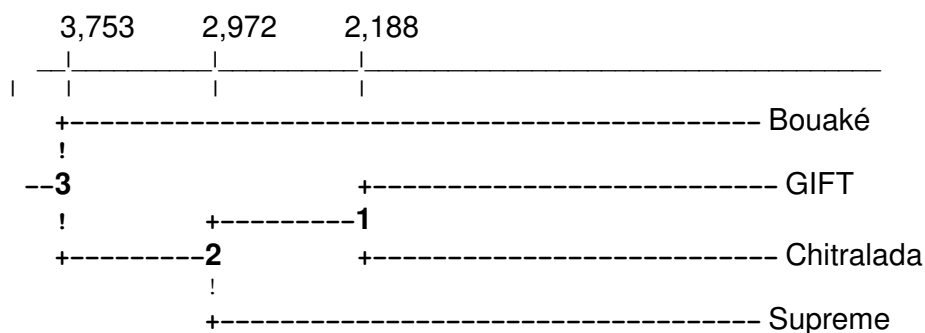


Figura 1. Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1972): Método UPGMA, para as quatro linhagens de *O. niloticus*.

O dendrograma obtido com o agrupamento UPGMA, pelo coeficiente de Jaccard utilizando o programa NTSYS, para as linhagens “Bouaké” (B), “GIFT” (G), “Supreme” (S) e “Chitralada” (C) apresentado na Figura 2 mostra que não houve a separação de indivíduos de mesma linhagem em grupos distintos, indicando que há grande divergência entre indivíduos da mesma linhagem. A tabela 4 (anexo) mostra a similaridade genética entre os indivíduos de “Bouaké” (B), “GIFT” (G), “Supreme” (S) e “Chitralada” (C), com variações entre 0,871-1,000 (B x B), 0,792-0,968 (B x G), 0,734-1,000 (B x S), 0,772-0,969 (B x C), 0,896-1,000 (G x G), 0,787-1,000 (G x S), 0,714-1,000 (G x C), 0,786-1,000 (S x S), 0,800-1,000 (S x C) e 0,783-1,000 (C x C). A elevada similaridade encontrada intra e entre linhagens demonstra a grande semelhança genética entre todos os indivíduos. Os indivíduos da mesma linhagem apresentaram valores levemente mais elevados, em comparação com valores para entre linhagens.

Os autores BENITES (2003), WALMSLEY (2004) e POVH *et al.* (2005) observaram a formação de grupos separados entre os indivíduos da linhagem “Bouaké” e “Chitralada”.

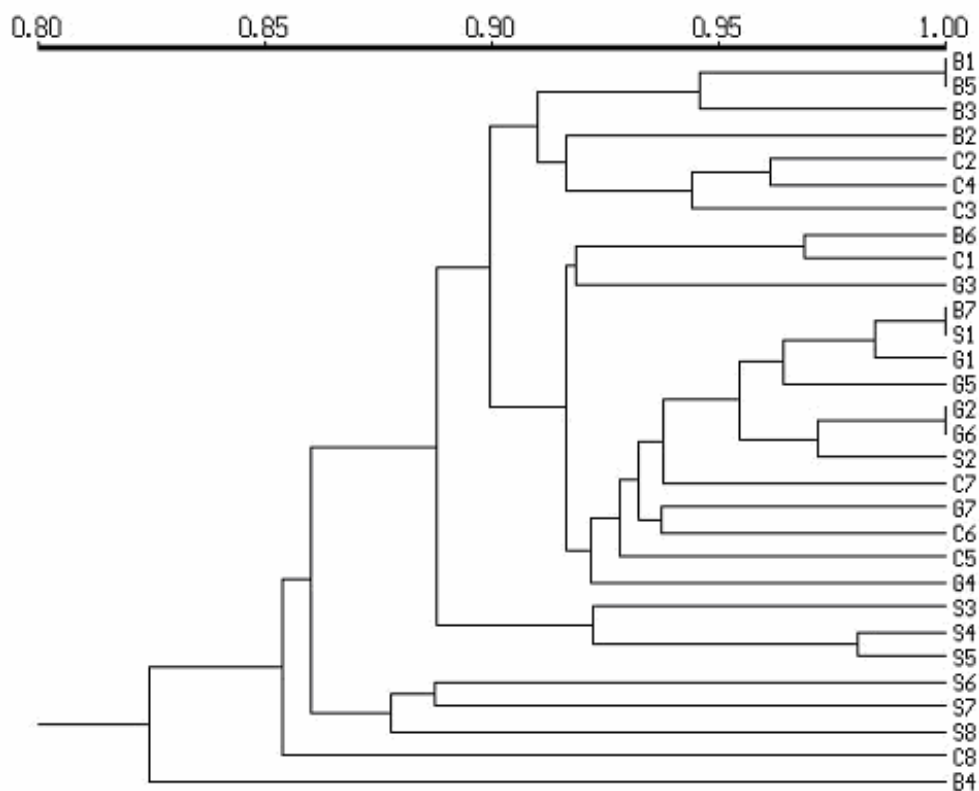


Figura 2. Dendrograma obtido com o agrupamento UPGMA, pelo coeficiente de Jaccard utilizando o programa NTSYS, para as linhagens “Bouaké” (B), “GIFT” (G), “Supreme” (S) e “Chitralada” (C).

CONCLUSÃO

A linhagem “Bouaké” apresentou maior distância genética em relação a demais linhagens, o que é também um indício de que não tenha participado do pool de linhagens dos programas de melhoramento das linhagens melhoradas.

REFERÊNCIAS

- APPLEYARD, S. A.; MATHER, P. B. Investigation into the mode of inheritance of allozyme and random amplified Polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 435-445, 2000.
- ASTOLPH, J. L. L. **Avaliação da diversidade genética entre a geração parental e sua progênie selecionada de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem chitralada com o uso do marcador de RAPD**. 2003. 37 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2003.
- BARDAKCI, F. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in Sex Discrimination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Turkish Journal of Biology**, Kavaklidere, v. 24, n. 1, p. 169–175, 2000.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 117-123, 1994.
- BENITES, C. **Análise por RAPD da diversidade genética entre diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2003. 23 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2003.
- CEPOLLARO, F.; COLOMBO, L. Optimization of semi-automated microsatellite and AFLP analyses for marker-assisted selection in tilapia breeding programs. In: WORLD AQUACULTURE SOCIETY SYMPOSIUM, 2003, Salvador. **Anais...** Salvador: World Aquaculture Society, 2003. p. 169.
- CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 195, 207, 239-240.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 11, 15-68.
- HASSANIEN, H. A.; ELNADY, M.; ITRIBY, A. O. H. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 587-593, 2004.
- KOCHER, T. D.; LEE, W.; SOBOLEWSKA, H.; PENMAN, D.; MCANDREW, B. Genetic Linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics**, Ottawa, v. 148, n. 3, p. 1225-1232, 1998.
- LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L.C. Marcadores Moleculares Dominantes (Rapid e Aflp). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

MARQUES, D. K. S. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. p. 11-16. (Documentos, 36).

MILLER, M. Mantel-Estruct: a program for the detection of population structure via mantel tests. **Journal of Heredity**, Cary, v. 90, n. 1, p. 258-259, 1999.

POVH, J. A.; MOREIRA, H. L. M., RIBEIRO, R. P., PRIOLI, A. J., BLANCK, D. V., GASPARINO, E., STREIT, D. P. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publishers, 1989.

ROMANA-EGUIA, M. R. R.; IKEDA, M.; BASIAO, Z. U.; TANIGUCHI, N. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, n. 1-4, p. 131-150, 2004.

SOUZA, A. B.; MELO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; RIBEIRO, L. P.; TEIXEIRA, E. A.; SOUSA, S. N. Analysis of RAPD as genetic marker in tilapia (*Oreochromis* spp.). In: WORLD AQUACULTURE SYMPOSIUM, 2003, Salvador. **Anais...** Salvador: World Aquaculture Society, 2003. p. 742.

SUGANUMA, C. H. **Caracterização de estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de microssatélites**. 2003. 72 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

WALMSLEY, S. M. **Identificação dos estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de marcadores moleculares**. 2004. 104 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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

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

APÊNDICE

Tabela 1. Tamanho dos fragmentos (pb) estimados nas quatro linhagens de *O. niloticus*. O valor (1) significa a presença da banda no gel, (0) a sua ausência e (9) a amostra perdida.

Primer	Tamanho dos fragmentos (pb)	Linhagem																															
		"Bouaké"							"GIFT"							"Supreme"								"Chitralada"									
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8		
OPA 01	2000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	9
	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	9	
	1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	9	
	1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	9	
	900	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	9	
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	9	
	500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	9	
400	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	9	9	9	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	0	1	9		
OPA 02	2500	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	2000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1300	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	9	0	9	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	
	1200	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	
	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPA 03	1500	1	1	1	1	9	1	9	1	1	0	1	0	9	1	9	9	9	9	0	0	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1400	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	9	1	9	9	9	9	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1200	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	9	1	9	9	9	9	1	1	1	1	9	1	0	1	1	1	1	1	1	
	1000	0	1	0	1	9	1	9	1	0	1	1	1	9	1	9	9	9	9	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	
	900	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	9	1	9	9	9	9	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	
	800	1	0	1	1	9	0	9	1	1	1	1	0	9	1	9	9	9	9	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	
	700	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	9	0	9	9	9	9	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	
600	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	9	1	9	9	9	9	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPA 12	2500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	9	1	9	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	1	1	1	1	0	0	
	1100	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	0	0	0	0	0	0	1	1	9	1	1	1	1	1	0	0	
	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	
	900	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	
	650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	0	0	0	0	1	0	0	9	1	0	1	1	1	1	0	0	
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	9	0	0	0	0	1	1	1	9	0	0	0	0	1	0	0	0	
	450	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	9	1	9	0	0	1	1	1	0	1	9	0	0	0	0	1	0	0	0	
OPA 16	2000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	1	1	9	9	1	9	9	9	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1800	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	9	0	0	9	9	1	9	9	9	9	1	0	1	1	0	0	1	
	1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	1	1	9	9	1	9	9	9	1	1	1	1	1	1	1	
	1100	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	9	9	1	1	9	9	0	9	9	9	0	0	1	1	0	0	1	
	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	1	1	9	9	1	9	9	9	9	1	1	1	1	1	1	
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	1	1	9	9	1	9	9	9	9	1	1	1	1	1	1	
	200	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	1	1	9	9	0	9	9	9	9	1	1	1	1	1	1	
OPA 20	2500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1800	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	9	0	9	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
	900	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
OPW 01	1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1000	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	9	1	9	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
	350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPW 04	1300	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	9	
	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
	1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	9	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1							

Tabela 5. Similaridade genética nas quatro linhagens de *O. niloticus* “Bouaké” (B), “GIFT” (G), “Supreme” (S) e “Chitralada” (C).

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
B1	1.000																													
B2	0.892	1.000																												
B3	0.951	0.872	1.000																											
B4	0.871	0.831	0.851	1.000																										
B5	1.000	0.914	0.940	0.879	1.000																									
B6	0.921	0.922	0.920	0.853	0.941	1.000																								
B7	0.895	0.901	0.899	0.838	0.900	0.928	1.000																							
G1	0.908	0.878	0.901	0.845	0.908	0.903	0.968	1.000																						
G2	0.906	0.873	0.895	0.853	0.899	0.921	0.941	0.903	1.000																					
G3	0.864	0.899	0.872	0.808	0.887	0.897	0.929	0.904	0.897	1.000																				
G4	0.864	0.863	0.859	0.818	0.859	0.885	0.928	0.917	0.960	0.910	1.000																			
G5	0.850	0.890	0.875	0.792	0.892	0.915	0.968	0.924	0.915	0.944	0.944	1.000																		
G6	0.952	0.952	0.857	0.857	0.952	0.905	0.950	0.905	1.000	1.000	0.950	1.000	1.000																	
G7	0.850	0.890	0.875	0.817	0.877	0.889	0.952	0.896	0.915	0.917	0.917	0.917	0.929	1.000																
S1	0.909	0.909	0.818	0.909	0.909	0.909	1.000	1.000	1.000	0.909	0.909	1.000	1.000	1.000	1.000															
S2	0.857	0.909	0.889	0.796	0.873	0.926	0.963	0.939	0.943	0.893	0.926	0.939	1.000	0.939	1.000	1.000														
S3	0.854	0.891	0.870	0.778	0.873	0.889	0.907	0.875	0.906	0.891	0.889	0.898	1.000	0.898	0.909	0.957	1.000													
S4	0.875	0.903	0.839	0.758	0.871	0.871	0.857	0.814	0.902	0.873	0.857	0.845	1.000	0.860	0.909	0.872	0.911	1.000												
S5	0.857	0.903	0.869	0.787	0.871	0.918	0.889	0.862	0.902	0.889	0.857	0.862	1.000	0.877	0.909	0.906	0.933	0.980	1.000											
S6	0.833	0.915	0.808	0.778	0.846	0.849	0.892	0.853	0.875	0.877	0.863	0.866	1.000	0.866	1.000	0.909	0.857	0.893	0.873	1.000										
S7	0.806	0.802	0.775	0.734	0.806	0.823	0.845	0.849	0.823	0.848	0.835	0.836	0.857	0.787	1.000	0.839	0.786	0.841	0.841	0.887	1.000									
S8	0.849	0.879	0.833	0.785	0.845	0.864	0.833	0.839	0.864	0.866	0.866	0.838	1.000	0.838	0.800	0.804	0.814	0.898	0.875	0.879	0.877	1.000								
C1	0.889	0.912	0.906	0.844	0.879	0.969	0.912	0.929	0.939	0.939	0.912	0.929	1.000	0.893	0.909	0.912	0.926	0.909	0.938	0.886	0.857	0.963	1.000							
C2	0.922	0.910	0.883	0.842	0.913	0.909	0.928	0.917	0.909	0.886	0.897	0.877	0.905	0.877	0.909	0.926	0.889	0.887	0.887	0.889	0.883	0.908	0.912	1.000						
C3	0.893	0.891	0.873	0.839	0.927	0.889	0.963	0.906	0.889	0.891	0.875	0.879	0.917	0.897	0.909	0.918	0.907	0.854	0.857	0.847	0.800	0.830	0.893	0.935	1.000					
C4	0.953	0.949	0.922	0.857	0.957	0.948	0.943	0.932	0.923	0.924	0.911	0.918	0.952	0.918	0.909	0.927	0.909	0.889	0.889	0.890	0.850	0.881	0.912	0.961	0.952	1.000				
C5	0.896	0.912	0.886	0.823	0.889	0.911	0.930	0.919	0.911	0.912	0.900	0.905	0.952	0.932	1.000	0.911	0.860	0.862	0.875	0.904	0.840	0.868	0.912	0.900	0.879	0.938	1.000			
C6	0.912	0.903	0.886	0.855	0.919	0.914	0.935	0.894	0.942	0.889	0.901	0.908	0.950	0.938	1.000	0.917	0.875	0.873	0.857	0.879	0.808	0.867	0.912	0.901	0.929	0.944	0.904	1.000		
C7	0.862	0.889	0.871	0.841	0.873	0.900	0.951	0.908	0.928	0.875	0.887	0.892	0.950	0.892	1.000	0.936	0.872	0.855	0.891	0.908	0.819	0.867	0.939	0.887	0.893	0.903	0.917	0.929	1.000	
C8	0.824	0.862	0.828	0.772	0.840	0.828	0.878	0.879	0.860	0.800	0.862	0.831	0.714	0.847	1.000	0.927	0.894	0.829	0.854	0.863	0.825	0.827	0.783	0.911	0.877	0.897	0.850	0.863	0.860	1.000