

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

Diversidade genética de três linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas à seleção massal

Harold Julián Pérez Gutiérrez

Pelotas, 2014

HAROLD JULIÁN PÉREZ GUTIÉRREZ

Diversidade genética de três linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas à seleção massal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título Mestre em Ciências (área do conhecimento: Produção Animal)

Orientador: Prof. Dr. Heden Luiz Marques Moreira

Co-Orientador: Dr. Diones Bender Almeida

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G983d Gutierrez, Harold Julián Pérez

Diversidade genética de três linhagens de tilápia do nilo submetidas a seleção massal / Harold Julián Pérez Gutierrez ; Heden Luiz Marques Moreira, orientador ; Diones Bender Almeida, coorientador. — Pelotas, 2014.

94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Oreochromis niloticus. 2. Melhoramento genético. 3. Endogamia. I. Moreira, Heden Luiz Marques, orient. II. Almeida, Diones Bender, coorient. III. Título.

CDD : 639.31

Banca examinadora:

Dr. Heden Luiz Marques Moreira – Universidade Federal de Pelotas, UFPel

Dr. Nelson José Laurino Dionello – Universidade Federal de Pelotas, UFPel – PPGZ

Dr. Bernardo dos Santos Vaz – Instituto Federal Sul-Rio Grandense, IFSUL

Dr. Rafael Aldrighi Tavares – Universidade Federal de Pelotas, UFPel

“A Deus, minha guia neste caminho, meus pais Harold e Maria Teresa, pelo amor incondicional, apoio, bênçãos e desejos de êxito”.

Dedico

Agradecimentos

Para cumprir as metas e os objetivos que planejamos para nossa vida é necessário o acompanhamento e ajuda de muitas pessoas, devemos passar por momentos difíceis, momentos nos quais achamos que o final está perto que não chegaremos a onde nós queremos estar, mas sempre existe alguém que te ensina, te ajuda, te empurra para continuar adiante e cumprir com essas metas e esses objetivos que no início da vida nos propomos. Quero agradecer a todas as pessoas e entidades que me acompanharam neste processo, espero não deixar ninguém por fora mas se acontecer peço desculpas não por causa disso foram menos importantes.

Primeiramente, quero agradecer a Deus o criador e dono do universo, quem me deu as forças necessárias para continuar em momentos que o corpo e o espírito estiveram fracos. Graças a Deus pela felicidade e por todas as pessoas que fizeram parte desta etapa na minha vida;

Agradeço a meus pais, sem eles e seus conselhos não teria entendido como funciona a vida, que as coisas boas chegam no seu momento, que aquilo que dá valor as coisas está além do seu preço, a eles muito obrigado pelo amor e pela ajuda que sempre sem perguntar nem duvidar me ofereceram, a eles muito obrigado sem vocês não teria conseguido;

Se ficar curto de palavras para agradecer o que o professor Heden e sua esposa Carla tem feito para mim simplesmente é porque seriam muitas as linhas que eu teria que escrever, mas devo muito do meu crescimento profissional e pessoal a vocês dois, muito obrigado por seu tempo, palavras, conselhos, conhecimento e por todas as coisas que aportaram na minha formação e realização deste trabalho;

Diones, quero lhe agradecer por cada momento que compartilhamos, conselhos, risadas e projetos, muito obrigado meu amigo por ter sido um apoio importantíssimo neste processo, além disso quero te agradecer por cada oportunidade que me oferecias-te, muito obrigado;

Nati, tua chegada a minha vida foi num momento importante, graças por ter me ajudado, apoiado, por cada conselho e brincadeiras, por tua ajuda na execução desta pesquisa, tu fostes muito importante para o êxito deste trabalho. Muito obrigado pela tua companhia, carinho e por ser uma força gigante e uma luz em momentos de escuridão, muito obrigado por ter chegado na minha vida;

Agradeço a Marília e Rafael, pelos aportes que fizeram nesta pesquisa, muito obrigado pela ajuda e pelo interesse e disposição que sempre tiveram para me ajudar e aconselhar neste processo;

Para o pessoal do Laboratório de Engenharia Genética Animal LEGA por todos os momentos vividos durante este processo, rimos, brincamos, trabalhamos e graças a sua ajuda e disposição esta pesquisa foi possível.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado;

Agradeço a Universidade Federal de Pelotas pelo subministro de instalações, assim como um agradecimento muito especial ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia pelo apoio financeiro para viagens e coleta de dados, além da formação obtida de seus professores e o serviço sempre de qualidade dos funcionários vinculados ao programa;

Muito obrigado aos meus colegas, foi uma turma que fez minha estadia no Brasil muito prazenteira, aprendi a falar português com brincadeiras e noites longas de estudo, para João, Cristina, Tamiris, Sabrina, Ana, Rudolf, Fabio um abraço e desejo de êxitos futuros;

Por último e não menos importante queria agradecer à empresa AQUABEL por ter me permitido realizar grande parte do meu trabalho de mestrado na suas instalações, assim como pela oportunidade de ter aprendido muito e tem considerado meu serviço de qualidade.

“A solidão é a mestra da personalidade. Há muito que os orientais o sabem. O indivíduo que teve a experiência da solidão não se torna vítima fácil da sugestão das massas”.

Albert Einstein
(1879 – 1955)

Resumo

PEREZ, Harold Julián Gutierrez. **Diversidade genética de três linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas à seleção massal.** 2014. 94f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS

As práticas de manejo reprodutivo realizadas nos sistemas de produção aquícolas podem inadvertidamente diminuir a variabilidade genética das populações devido ao uso de pequenos grupos de reprodutores. Essa característica deste tipo de sistema, pode levar a um aumento na consanguinidade e por consequência a uma diminuição significativa do crescimento além de afetar outros fatores de interesse. Todos esses fatores podem, afetar negativamente o sistema e colocar em risco a sua sustentabilidade. O objetivo desta pesquisa foi analisar a diversidade genética através de marcadores moleculares microssatélites de três linhagens de tilápia do Nilo, em duas gerações, submetidas à seleção massal. Foram utilizados os locus: UNH160, UNH178, UNH222, ISPMS01, PRMS01 e PRMS02. A partir desses locus, foram obtidos o número de alelos, a heterozigosidade observada e esperada, o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o coeficiente de endogamia e de diferenciação populacional, a diversidade genética e as frequências alélicas. O número médio de alelos por locus em cada linhagem demonstraram que não houve perda de alelos entre uma geração e a seguinte evidenciando-se que a seleção massal não teve efeito negativo sobre o número de alelos. Foram observados altos índices de endogamia na geração inicial e filial das linhagens em estudo, demonstrando a importância da análise prévia das populações iniciais. O coeficiente de diferenciação populacional identificou homogeneização das linhagens ao longo dos processos de seleção e pouca variação destas com respeito a suas próximas gerações, demonstrando efeitos inexistentes da seleção massal sobre as frequências alélicas. Os resultados do estudo não evidenciaram efeitos negativos da seleção massal sobre a diversidade genética nas três linhagens de tilápia estudadas dentro da geração inicial e filial

Palavras-chaves: *Oreochromis niloticus*, melhoramento genético, endogamia.

Abstract

PEREZ, Harold Julián Gutiérrez. **Genetic diversity of three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) undergoing mass selection.** 2014. 94f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS

Reproductive management practices carried out in the aquaculture production systems may inadvertently decrease the genetic variability of populations due to the use of small groups of players. This characteristic of this type of system can lead to an increase in inbreeding and consequently a significant decrease in the growth and affect other factors of interest. All these factors can negatively affect the system and jeopardize its sustainability. The objective of this research was to analyze the genetic diversity through microsatellite markers from three strains of Nile tilapia in two generations undergoing mass selection. The locus were used: UNH160, UNH178, UNH222, ISPMS01, PRMS01 and PRMS02. From these loci were obtained, number of alleles, observed and expected heterozygosity, the test of Hardy-Weinberg equilibrium, the coefficient of inbreeding and population differentiation, genetic diversity and allele frequencies. The average number of alleles per locus in each pedigree showed no loss of alleles between one and the next generation evidencing that the mass selection had no negative effect on the number of alleles. High indices of inbreeding were observed in the initial and filial generation of strains under study, demonstrating the importance of analysis provided the initial populations. The coefficient of population differentiation of strains identified homogenization throughout the processes of selection and these little variation with respect to their future generations, indicating nonexistent effects of mass selection on allele frequencies. The study results showed no negative effects of mass selection on genetic diversity in the three tilapia strains studied in the initial generation and affiliate

Key words: *Oreochromis niloticus*, genetic improvement, inbreeding.

Lista de Figuras

Revisão de literatura

Figura 1	Produção de pescado (t) em 2010 e 2011 discriminada por região	36
Figura 2	Características morfológicas da Tilápia do Nilo	39
Figura 3	Incubação bucal de fêmea de tilápia do Nilo	41
Figura 4	Reprodução da tilápia do Nilo	42
Figura 5	Gônadas sexuais de <i>O. niloticus</i>	43
Figura 6	Fluxo de genes a partir do dentro de criação para o sistema de produção	45
Figura 7	Ilustração gráfica do Microssatélite	52
Figura 8	Esquema estatísticas F. Aonde, I é o indivíduo, S é a subpopulação e T é a população	56

Artigo

Figura 1	Processo de seleção das linhagens Supreme Tilápia, Premium Aquabel e Chitralada	83
----------	---	----

Lista de Tabelas

Projeto de Pesquisa

Tabela 1. Cronograma de atividades a realizar em um período de 24 meses	29
---	----

Revisão de literatura

Tabela 1. Produção mundial da Pesca e Aquicultura	34
Tabela 2 Produção Aquícola mundial por continente	35
Tabela 3. Produção Aquícola brasileira por espécie	37
Tabela 4. Exemplo dos motivos microssatélites	52

Artigo 1

Tabela 1. Loci microssatélites de tilápia do nilo, <i>primers</i> e acesso no GenBank. Sublinhado a cauda M13 adicionada aos <i>primers</i> para cada <i>locus</i>	80
Tabela 2. Marcadores moleculares, tamanho em pares de bases (pb), número de alelos (N_a), alelos mais frequentes e frequência alélica (entre parêntese), número de alelos por linhagem dentro de geração, número de alelos privativos por <i>locus</i> (entre parêntesis) nas linhagens Supreme tilápia, Premium Aquabel e Chitralada	80
Tabela 3. Heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) nas gerações inicial (G_0) e filial (F_1) de tilápia do nilo, das linhagens Supreme Tilápia (SP), Premium Aquabel (PA) e Chitralada (CHI). Pvalue do Equilíbrio de Hardy Weinberg	81
Tabela 4. Análise da diferenciação populacional F_{ST} entre as linhagens Supreme Tilápia, Premium Aquabel e Chitralada dentro de cada geração	82
Tabela 5 Análise da diferenciação população (F_{ST}) das linhagens Supreme Tilápia, Premium Aquabel e Chitralada dentro da geração inicial (G_0) e filial (F_1)	82

Sumario

1. Introdução	14
2. Projeto de Pesquisa	18
2.1. Caracterização do Problema	19
2.2. Objetivos e Metas	22
2.3. Metodologia	24
2.4. Resultados e Impactos esperados	27
2.5. Cronograma de Projeto	29
2.6. Outros projetos e financiamento	30
2.7. Aspectos Éticos	31
2.8. Referências Bibliográficas	32
3. Revisão de literatura	34
3.1. Produção Aquícola Mundial	34
3.2. Produção Aquícola do Brasil	36
3.3. Produção Aquícola continental do Brasil por espécie	37
3.4. Produção de Tilapia no Brasil	38
3.5. Biologia da Tilapia	39
3.6. Melhoramento genético e metodologias de seleção em piscicultura	44
3.6.1. Seleção por pedigree	47
3.6.2. Seleção por família	47
3.6.3. Seleção dentro de família	48
3.6.4. Seleção Combinada	49
3.6.5. Seleção massal ou individual	49
3.7. Diversidade genética	50
3.8. Marcadores moleculares microssatélites	51
3.9. Estatística na análise da variabilidade genética	53
3.9.1. Frequências alélicas	53
3.9.2. Equilíbrio Hardy-Weinberg	54
3.9.3. Estatísticas F	56
3.9.4. Estatística F_{IS}	57

3.9.5. Estatística F_{IT}	58
3.9.6. Estatística F_{ST}	58
4. Relatório do Trabalho de Campo	60
4.1. Local	60
4.2. Período Experimental	60
4.3. Obtenção dos reprodutores das linhagens Supreme Tilápia, Premium Aquabel e Chitralada	60
4.4. Análise molecular	62
5. Artigo	63
5.1. Introdução	66
5.2. Materiais e métodos	68
5.3. Resultados e discussão	70
5.4. Conclusões	75
5.5. Referências Bibliográficas	75
6. Conclusão	84
7. Referências	85

1. Introdução Geral

A domesticação de animais e plantas é um processo que acompanha o desenvolvimento das sociedades no tempo. Em peixes a domesticação parece ter iniciado há pouco tempo em comparação dos animais terrestres (GJEDREM, 2005). Este demorado processo de domesticação se deve ao reduzido interesse pelos sistemas de produção aquícolas e ao baixo tamanho efetivo destas populações. Estas características trouxeram um aumento nas doenças e diminuição do rendimento produtivo devido ao rápido acúmulo da consanguinidade. Portanto, para mitigar o impacto gerado, foi necessário introduzir aos sistemas produtivos animais selvagens interrompendo o ciclo de domesticação (GJEDREM, 2005).

Como testemunha deste fenômeno, a tilapicultura inicia sua expansão durante a segunda metade do século XX. Este crescimento aconteceu tanto geograficamente como na produção total. A tilápia foi introduzida na Ásia tropical nos anos 30 e entrou na América do Norte, América Latina, e Europa nos anos 50 (STICKNEY, 2000).

No Brasil, o incremento na produção aquícola está definido pelas condições extremamente favoráveis em termos ambientais, além das políticas públicas realizadas pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), as quais promovem o desenvolvimento sustentável do setor, facilitando o notório incremento da produção piscícola continental.

Entre um número variável de espécies aquícolas com potencial para produção piscícola, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ocupa um lugar importante na cadeia produtiva desde seu ingresso no Brasil, sendo uma das espécies mais produzidas no território nacional. Segundo o MPA (2012), a tilápia e a carpa (*Cyprinus Carpio*) foram às espécies mais cultivadas, representando juntas 63,4% da produção nacional da aquicultura continental. No mundo o panorama não é diferente, a tilápia é considerada uma espécie precursora do crescimento da aquicultura continental, atualmente produzida em 72% na Ásia, 19% na África e 9% no continente Americano (FAO, 2012). Em relação a essa espécie muito estudos

são realizados sobre seu cultivo. Porém uma questão importante é porque a tilápia do Nilo é um peixe de tanto interesse? *Oreochromis niloticus* é uma espécie de peixe omnívora que se originou na África. Desta espécie ao longo do tempo tem-se acumulado muita informação sobre sua alimentação, manejo, interação meio ambiente–animal e reprodução. As características mais representativas desta espécie são o seu rápido crescimento, a resistência ao estresse, a conversão alimentar, suas características reprodutivas que incluem alta fecundidade, incubação bucal, cuidado parental, e diferenciação sexual de fácil manipulação, susceptibilidade a baixas temperaturas dentre outras (SONG et al., 2009; ALMEIDA et al., 2013)

Na tilapicultura exercida no Brasil, as metodologias de reprodução se focam em um conjunto de reprodutores mantidos em hapas. Geralmente estes conjuntos de animais proporcionam um ambiente ideal para que uma diversidade de acasalamentos aconteça. Este tipo de acasalamento pode gerar ganho ou perda no material genético produzindo efeitos positivos ou negativos na geração seguinte. Os sistemas de reprodução estão acompanhados de uma diversidade de características que permitem a estimação eficaz dos valores de criação e o estabelecimento de sistemas de seleção de alta intensidade (GJEDREM, 2005).

Todas as metodologias utilizadas nos programas de reprodução sugerem a obtenção dos melhores reprodutores que irão compor a próxima geração cuja progênie tem a possibilidade de ter um alto mérito genético para características previamente definidas como ganho de peso, velocidade de crescimento, conversão alimentar, forma, etc. (GJEDREM; BARANSKI, 2009). As estratégias de seleção a utilizar vão depender de vários fatores dentro dos quais se inclui a herdabilidade da característica(s), a natureza da característica(s), o método de registro dos dados, assim como a capacidade reprodutiva da espécie, estratégia de manejo e instalações. Todas as metodologias têm como finalidade obter estimativas que permitam definir os animais com maior potencial para reprodução, ou seja, maximizar a correlação entre o valor reprodutivo estimado e o verdadeiro dos indivíduos (FJALESTAD, 2005).

Fjalestad (2005) realizou uma recopilação dos métodos de seleção empregados nos sistemas de produção atuais e concluiu que em sistemas de produção aquícolas a seleção massal é o método mais eficaz sempre que sejam

cumpridas todas as exigências desta metodologia. Para realizar uma seleção exitosa a população alvo deve ser homogênea, o ambiente de cultivo constante e ser direcionada a características de média para alta herdabilidade como é o caso da variável resposta crescimento em espécies aquícolas que varia entre 0.20 - 0.40 (GJEDREM, 2009).

Os efeitos das diferentes metodologias de seleção nos sistemas de produção atuais são variados e irão depender da pressão de seleção realizada. Estas metodologias são realizadas em populações com número limitado de indivíduos (populações finitas) característica principal dos programas de reprodução animal (GJEDREM, 2005). Esta distinção dos programas de reprodução somado a diferentes acontecimentos como perda de reprodutores por mortalidade ou transporte, aumentam a probabilidade dos alelos menos frequentes estejam ausentes em indivíduos amostrados para estudos de genética de populações reduzindo a variabilidade genética quando comparados com a geração inicial (WALMSLEY, 2004). Outro efeito deste tipo de acontecimento que envolve perda de reprodutores é o acúmulo indesejado de consanguinidade e diminuição da diversidade genética, reduzindo o desempenho produtivo e produzindo respostas muito variáveis que poderiam colocar em risco o melhoramento genético dos sistemas produtivos aquícolas.

Um parâmetro de interesse nos sistemas produtivos focados na produção de alevinos é o tamanho efetivo da população o qual pode ser definido como o tamanho de uma população idealizada que poderia gerar quantidade de endogamia ou variância nas frequências alélicas de seus descendentes, este parâmetro é definido em relação a uma população de referência ideal a qual consiste em uma população base de tamanho infinito, subdivida em infinitas subpopulações de cruzamentos aleatórios com um número constante de reprodutores por geração (SEBBENN, 2005). Este parâmetro pode afetar o rendimento reprodutivo de espécies como a tilápia que realiza, na maioria dos casos, uma reprodução conjunta. Outro fator importante nesses sistemas é a aquisição de ovos, larvas e alevinos com qualidade e quantidade suficiente (ALMEIDA et al, 2013), que permitam a sustentabilidade de empresas responsáveis pela disponibilidade de formas jovens desses animais mercado.

Apesar da tilápia apresentar características zootécnicas de alta qualidade e do número de estudos realizados sobre ela, os efeitos dos métodos de seleção provenientes dos programas de melhoramento genéticos sobre as características reprodutivas e genéticas tem sido pouco estudadas. Portanto, definir métodos de seleção adequados que tenha como finalidade mitigar o efeito negativo de determinado tipo de seleção é um fator de muita importância. Baseado no exposto, o objetivo desta trabalho foi analisar a diversidade genética através de marcadores moleculares microssatélites e o desempenho reprodutivo de três linhagens de tilápia do Nilo submetidas a seleção massal.

PRPPG – PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

2. PROJETO DE PESQUISA

CONSANGUINIDADE E VARIABILIDADE GENÉTICA EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) REPRODUZIDAS EM HAPAS EM UM PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO ANIMAL

Equipe:

Orientador

Dr. Heden Luiz Marques Moreira

Professor Adjunto do Depto. De Zoologia e Genética – Instituto de Biologia – UFPEL

Co-orientador

Dr. Diones Bender Almeida

Bolsista PDI

Colaboradores

Dra. Cecília Irene Perez Calabuig – UFRGS

Dr. Fabio Ricardo Pablos de Souza-UFPEL

Carla G. Ávila Moreira – Doutoranda-UFRGS

Marília Danyelle Nunes Rodrigues – Doutoranda – UFPEL

Natalia Ossa Hernandez -UNISARC

Graduação

Alunos interessados em projetos de pesquisa na área de Melhoramento e Reprodução animal.

Harold Julián Pérez Gutiérrez

Pelotas-RS, Julho/2012

2.1 Caracterização do Problema

A aquicultura é a prática de cultivar organismos aquáticos como: plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes. Este tipo de produção envolve inúmeras atividades que geram uma importante fonte de emprego para o Brasil. No relatório da FAO (2010) a pesca e a aquicultura representam o meio de subsistência para mais de 540 milhões de pessoas, o que corresponde a aproximadamente 8% da população mundial. Na produção aquícola atual, uma das espécies de peixe mais produzidas é a tilápia, nome comum de aproximadamente 70 espécies de peixes taxonomicamente classificadas da família Cichlidae (FITZSIMMONS, 2000). Diversas características como, boa conversão alimentar, resistência a doenças, dentre outras qualidades, fazem com que a tilápia seja tão bem difundida mundialmente. A produção de tilápia teve um crescimento médio superior a 14% ao ano (KUBITZA, 2012), sendo a espécie de peixe mais produzida no Brasil (33,08%) (FAO, 2010). Os parâmetros zootécnicos de interesse da espécie são: alta capacidade de reprodução, maturidade sexual precoce, fecundidade relativa elevada, desova frequente, rusticidade, rápido crescimento, carne de ótima qualidade e boa aceitação pelo mercado consumidor (BORGES et al., 2005).

O aumento do consumo da carne, subprodutos, importações e pesquisas que estão sendo desenvolvidas constituem uma clara tendência de crescimento deste sistema de produção. Um bom exemplo é o caso do melhoramento genético da linhagem GIFT realizado junto a Universidade Estadual de Maringá (UEM-Codapar) (LUPCHINSKI et al., 2008). Esse programa de melhoramento faz parte da rede AquaBrasil, a qual foi criada em 2008, e que tem como finalidade o melhoramento genético desta espécie e a proposta de seleção de outras espécies como: Cachara, tambaqui e camarão branco.

Um aspecto chave para maximizar a produtividade em peixes, deve ser a utilização de indivíduos geneticamente superiores que apresentem desempenho elevado em termos de superioridade, produtividade e sobrevivência em condições ambientais específicas (RESENDE et al., 2009).

Na tentativa de manter a alta produção da tilápia, estão sendo desenvolvidas diferentes metodologias de seleção. Técnicas essas que podem levar tanto à diminuição da variabilidade genética como o aumento na consanguinidade nos reprodutores, os quais tem efeitos negativos nos sistemas de produção. Estes acontecimentos podem ocorrer pela falta de um planejamento dos programas de seleção e pelo uso de um número reduzido de reprodutores, o que pode aumentar a probabilidade de endocruzamentos (HILSDORF; DERGAM, 1999).

Por conseguinte, várias questões surgem nas diferentes metodologias utilizadas em programas de melhoramento genético. Com base nisso, as questões a serem tratadas, são:

- Qual é o efeito do modo de seleção na consanguinidade dos animais e sua tendência a aumentar ou diminuir a variabilidade genética?
- Será possível identificar diferenças nas frequências alélicas/genotípicas através de marcadores, partindo teoricamente de um ambiente onde todos os animais de uma família estão reunidos?
- Quantos indivíduos estão contribuindo com o material genético na reprodução em hapas, e com isto é possível realizar descarte de reprodutores com baixos índices reprodutivos?

Segundo Moreira (1999), estabelecer o parentesco genético ao nível de populações apresenta uma alta dificuldade, isso ocorre porque registros genealógicos de populações aquáticas são notoriamente difíceis de manter, já que a maioria dos peixes produz um grande número de progênie, as quais são geralmente muito pequenas para serem marcadas. Esta característica sugere pensar em estratégias de melhoramento genético que permitam aumentar a produtividade e ter um controle e manejo da endogamia com ajuda de técnicas moleculares.

Para o controle genético em peixes tais como, sistema de cruzamento, fluxo gênico e estrutura genética dos estoques vêm sendo utilizados marcadores microsatélites (YUE; ORBAN, 2002). Esses marcadores são empregados para estimativas dos coeficientes de endocruzamento e parentesco, além de ser utilizados para identificar possíveis relações genéticas entre a geração parental e progênie (FESSEHAYE et al., 2006). Esta metodologia facilita a tomada de decisões

no momento da seleção dos reprodutores e do auxílio na redução dos níveis de consanguinidade para evitar efeitos indesejáveis causados pela acumulação de genes em homozigose (YAÑEZ et al., 2012).

A utilização de marcadores moleculares acompanhados de técnicas de manejo reprodutivo apropriadas podem contribuir para a redução da endogamia (BENTSEN; OLESEN, 2002). Neste sentido manter um nível apropriado de variabilidade genética promove o progresso genético das gerações (YAÑEZ et al., 2012). Portanto, é importante direcionar as pesquisas para a identificação dos estágios críticos do processo reprodutivo no qual a diversidade genética é perdida, como propósito de maximizar a eficácia da seleção genética, aumentar a acurácia das estimativas de mérito genético e dar resposta às questões aqui propostas.

2.2 Objetivos e Metas

Objetivo Geral:

Estimar através de marcadores moleculares a consanguinidade, parentesco e variabilidade genética em três linhagens de tilápia, *Oreochromis niloticus*, dentro e entre: hapas, linhagens e gerações, resultante do processo de seleção em um programa de melhoramento genético animal, baseado em reprodução em hapas.

Objetivos específicos:

- Realizar a reprodução da geração1 (F1) e a seleção dos reprodutores da geração 2 (F2) que serão distribuídos nas hapas de reprodução;
- Estimar as frequências alélicas/genotípicas através de marcadores moleculares nos animais e suas gerações, utilizados em um sistema de melhoramento genético com reprodução em hapas;
- Estudar o polimorfismo dos genes da reprodução nos animais e suas gerações utilizados em um sistema de melhoramento genético com reprodução em hapas;
- Determinar o Numero efetivo (N_e) para as três linhagens mantidas em hapas de reprodução;

Metas

- Obter os reprodutores da F2 os quais irão ser distribuídos em 15 hapas sendo 5 hapas representativas de cada linhagem. O número de reprodutores foi definido em 30 fêmeas e 10 machos em uma proporção de 3:1;

- Alcançar estimativas dos coeficientes de consanguinidade e parentesco individuais que permitam avaliar a qualidade da proposta nos 105 reprodutores da geração 0 e os 600 reprodutores selecionados da geração 1 e 2 respectivamente;
- Buscar através de uma análise genética, avaliar a causa e o efeito do polimorfismo nos gêneses colhidos, e com isso poder identificar os potenciais reprodutores que vêm sendo utilizados no processo reprodutivo;
- Obter estimativas do Número efetivo (N_e) nas linhagens como nas gerações para determinar se a proposta tem efeitos negativos ou positivos na seleção dos reprodutores da geração seguinte.

2.3 Metodologia

Proposta de melhoramento genético animal baseado em reprodução em hapas na tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Foi realizado na Estação de Piscicultura Aquabel um experimento de desempenho e seleção em 4 linhagens (Chitralada, GIFT, Supreme e Premium Aquabel). Foram coletadas larvas de diferentes desovas das 4 linhagens de forma sincronizada e com maximização do número de reprodutores utilizados. As larvas foram alocadas a diferentes hapas (2x3x1m) dentro de tanques de terra e criados por um mês para a seleção de uniformização. Após esse período, os animais foram criados por mais 5 meses, sendo tomadas amostragens a cada 30 dias. Um total de 75 fêmeas e 30 machos foram selecionados após as diversas classificações, formando os reprodutores que deram origem a F1 e distribuídos aleatoriamente em cinco hapas de reprodução, totalizando em cada família 6 machos e 15 fêmeas.

Após a obtenção dos reprodutores selecionados dos 4 grupos genéticos (linhagens), optou-se por trabalhar apenas com três linhagens (Supreme, Premium Aquabel e Chitralada), pois a linhagem GIFT está sendo trabalhada pela Universidade Estadual de Maringá no Programa AquaBrasil. Esta decisão evitou o gasto de recursos físicos e financeiros para o processo de seleção desta linhagem, uma vez que há um acordo e estudos em colaboração entre a UFPel e UEM para troca de material referente a linhagem GIFT.

Todas as larvas eclodidas em cada uma das 15 hapas de reprodução foram direcionadas, após a absorção do saco vitelínico, para hapas de crescimento separadamente. Nesse ambiente, foram submetidos a teste de desempenho, sendo realizadas seleções mensais, a fim de selecionar aqueles animais de crescimento superior. Conforme as seleções foram ocorrendo, o número de animais foi diminuindo até chegar ao final de 6 meses, com um total de 30 fêmeas e 10 machos em cada hapa. Esse número foi estipulado para que pudessem compor os reprodutores da F1. Todos os animais depois de selecionados, tanto na F1 como na G0, foram chipados.

Para implantação dos microchips na região lateral-dorsal de cada peixes (modelo PA121 – antimigratório) os mesmos foram anestesiados com benzocaína. Após a recuperação da anestesia retornaram para a mesma hapa para continuação do crescimento, mantendo ainda a identidade das famílias (hapas). Durante toda a fase de criação, foram monitorados diariamente a porcentagem de oxigênio dissolvido e a temperatura da água. O procedimento foi igual para G(0), F1 e será realizado da mesma forma na F2 em todas as linhagens.

A formação da geração 2 (F2) será o próximo passo, é de muita importância para o programa pois permitirá avaliar o grau de parentesco entre os indivíduos, dentro e entre as gerações e linhagens. Avaliar se esse modo de seleção que estamos praticando, está mantendo pelo menos, a variabilidade genética dos animais. Isso será alcançado, através de uma análise onde partimos da F2 como objetivo de chegar até a G0, portanto será possível identificar os potenciais reprodutores que vêm sendo selecionados. Isso responderá uma questão importante, que diz respeito à estratégia de seleção praticada a cada geração, pois a mesma está sendo praticada de forma massal.

Extração de DNA

Serão coletadas amostras de nadadeira caudal para checagem da variabilidade genética, consanguinidade e parentesco de 3 gerações de tilápia da linhagem Chitralada, Supreme e Premium Aquabel. A extração de DNA será realizada seguindo a metodologia proposta por Bardakci e Skibinski (1994). Brevemente, 20 mg de nadadeira serão colocadas em tampão de lise contendo proteinase K e deixadas over night até digestão completa. Posteriormente a fase orgânica será precipitada utilizando uma solução salina e centrifugação, sendo o DNA precipitado por centrifugação e etanol. A qualidade da extração será checada em gel de agarose 0,7%, corado com Gelgreen (Biotium, USA), visualizado em transluminador de luz branca (Clarechemical, USA) e fotografado para registro.

Genotipagem dos marcadores

As reações de PCR serão orientadas para trabalhar com um volume final de 25µl, contendo 10-20 ng de DNA genômico, 5 pmol de cada *primer*, 1X buffer de PCR [10mM TrisHCl (pH9.0), 1,5mM MgCl₂ e 50mM KCl], 100µM dNTP e 0,5 unidades de Taq DNA polimerase (Fermentas, USA). O *primer* M13 marcado com TET, HEX ou FAM será adicionado a cada reação (Schuelke, 2000). As condições de amplificação serão de acordo com o descrito por Fessehayé et al. (2006). O controle negativo (reação sem a presença de DNA) será utilizado em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação dos reagentes. A eficiência da amplificação será verificada através de eletroforese em gel de agarose a 0,7% (w/v) com coloração com Gelgreen (Biotium, USA) e visualizado em transluminador de luz branca (Clarechemical, USA). Logo após, através de imagem digital, será registrado o resultado final da análise. Em um passo seguinte, 1-2µL de produto diluído será separado em um sequenciador ABI310 juntamente com 10µL de formamida e 0.6µL Map Maker LOW (BioVentures, Inc. USA). Os resultados serão analisados pelo Genes can Analysis Software (Versão3.1, Perkin-Elmer Corporation, 1998).

Os *primers* para amplificação do polimorfismo dos genes da reprodução serão os descritos por Fessehayé et al. (2006).

Análise genética dos reprodutores

A diversidade genética geral e entre reprodutores e progênie selecionada será caracterizada pelas frequências alélicas, heterozigidade observada (H₀), diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), número de alelos por *locus* (A) e a porcentagem de *locus* polimórficos (P). A análise da consanguinidade e de parentesco dentro e entre as linhagens, hapas e gerações será realizado utilizando a metodologia descrita por Ritland (1996), através do programa Coancestry. Testes do equilíbrio de HW (Hardy-Weinberg) e desequilíbrio de ligação dentro de cada geração e família serão avaliados pelo programa GENEPOP (ROUSSET, 2008) e/ou ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2005).

2.4 Resultados e Impactos esperados

Impacto tecnológico:

Oferecer uma solução aos problemas de seleção genética de espécies, como a tilápia, utilizadas comercialmente na produção aquícola do Brasil. Os programas terão aplicabilidade tanto para espécies exóticas como para espécies nativas oferecendo ferramentas para aumentar a produtividade dos sistemas de criação.

Impacto Econômico e Social:

O programa de melhoramento genético baseado no modelo animal aplicado à piscicultura requer, para sua implementação, um grande investimento. O custo com infraestrutura, mão de obra e marcação da progênie são os principais problemas na hora de estabelecer este tipo de programa.

Portanto, resultados aceitáveis na análise genética dos reprodutores que foram utilizados nesta proposta, facilitaria estabelecer este tipo de metodologias nos sistemas produtivos. O incremento do valor genético dos plantéis de reprodutores, da produtividade e os baixos custos pela menor inversão em estrutura e marcação da progênie aumentaria a rentabilidade dos produtores.

A segurança alimentar é uma das preocupações nas políticas federais e estaduais no Brasil. O estabelecimento de programas de melhoramento genético na aquicultura acompanhado por técnicas moleculares são fundamentais para o aumento da produção de peixe de ótima qualidade. O crescimento no consumo, o conhecimento gerado pelo estudo das espécies exóticas como das nativas e as importações de indivíduos de alto valor genético direcionam os esforços a oferecer à sociedade um produto em quantidade e qualidade suficiente, com rastreabilidade capaz de satisfazer as necessidades da população. Cabe neste momento dizer que a proposta de melhoramento genético baseado em reprodução em hapas, poderá resolver este tipo de inconvenientes na produção de peixe.

Impacto Científico:

A produção de informação que esteja relacionada com a explicação ou entendimento dos fenômenos de interesse na produção animal será de muita importância para a comunidade científica. Os resultados deste projeto serão apresentados em revistas especializadas e avaliadas pelo Qualis, assim como em congressos da área.

A seleção por marcadores nos garante progênies com uma quantidade maior de alelos favoráveis, fortalecendo os sistemas de produção. A seleção assistida por marcadores irá permitir manter dentro do sistema animais melhorados, o que significa crescimento contínuo sem prejuízos resultantes da consanguinidade ou perda da diversidade genética. Em virtude da inexistência deste tipo de aplicação na piscicultura nacional, este projeto contribuirá de forma marcante para a formação de recursos humanos na área de melhoramento genético.

Resultados esperados:

No final do projeto espera-se obter informação suficiente em termos de consanguinidade, parentesco e variabilidade genética que permitam dar um conceito favorável ou não favorável da proposta de melhoramento genético baseado em reprodução em hapas. Pretende-se definir o número efetivo de reprodutores e dar uma possível conclusão a cercado fenômeno estudado, para explicar a diminuição ou aumento da consanguinidade como da variabilidade genética e por último gerar uma matriz de cruzamentos (parentesco) dos reprodutores que darão origem à geração seguinte.

2.5 Cronograma do Projeto

Tabela 1. Cronograma de atividades a realizar em um período de 24 meses

Atividade	Mês											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
2012												
Revisão bibliográfica												
Obtenção de créditos												
Coleta de material biológico F1												
Reprodução da F1												
Padronização dos protocolos laboratoriais												
Extração de DNAF1												
Análises laboratoriais F1												
Seleção dos reprodutores F2												
2013												
Revisão bibliográfica												
Seleção dos reprodutores F2												
Coleta de material biológico F2												
Extração de DNA F2												
Análises laboratoriais F2-G0												
Análise estatística												
Análise genética(G0,F1eF2)												
2014												
Revisão bibliográfica												
Análise genética (G0,F1eF2)												
Entrega de relatório												
Publicação dos resultados												

O interesse da empresa Aquabel é continuar trabalhando com esse material que vai ser selecionado. O DNA da geração 0 foi extraído em procedimentos de padronização da metodologia de extração proposta por Bardakci e Skibinski (1994).

2.6 Outros Projetos e Financiamentos

Projeto de Pós doutorado empresarial (PDI) denominado “Avaliação de uma nova metodologia de seleção genética em tilápias e monitoramento da variação genética através de genes candidatos” aprovado junto ao CNPq. Número da identificação do processo 300132/2012-3. Valor total aprovado R\$ 41.698,56.

Projeto “Núcleo Temático em Inovação e Melhoramento Genético de Peixes” aprovado pelo Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Valor total aprovado R\$ 504.915,58.

2.7 Aspectos Éticos (quando aplicável)

Para projetos de pesquisa clínica, epidemiológica, ou no âmbito das Ciências Humanas, que envolva experimentos com seres humanos ou animais, explicitar como estão sendo contemplados seus aspectos éticos.

2.8 Referências Bibliográficas

- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, v. 70, p. 117–123, 1994.
- BENTSEN, H.B.; OLESEN, I. Designing Aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. **Aquaculture**, v.204, p.349-359, 2002.
- BORGES, A. M.; MORETTI, J. O. C.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A.S. Produção de populações monosssexo macho de tilápia-do-nilo da linhagem Chitralada. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.40, n.2, p.153-159, 2005.
- EXCOFFIER, L; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p. 47-50, 2005.
- FESSEHAYE, Y.; EL-BIALY, Z.; REZK, M.A.; CROOIJMANS, R.; BOVENHUIS, H.; KOMEN, H. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) inbreeding hapas: a microsatellite analysis. **Aquaculture**, v.256, p.148-158, 2006.
- FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most importante Aquaculture species of the 21 century. In: FITZSIMMONS, K.; CARVALHOFILHO, J. (Eds.) **Proceedings from the fifth international symposium on tilapia aquaculture**. Rio de Janeiro: Panorama da aquicultura Magazine, 2000 p.3-8.
- HILSDORF, A.W.S.; DERGAM, J.A. Depressão por endogamia: somente uma terminologia genética ou um fato na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, v.9, p.34-36, 1999.
- ITALIA. Organização das nações unidas para agricultura e alimentação. **FAO NO Brasil, Memoria de cooperação técnica**. Toscana, 2010. 43 p.

KUBITZA, F. Panorama da Piscicultura no Brasil Estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. **Panorama da aquicultura**, v. 22, n. 132, p.14-25, 2012

LUPCHINSKI, E.; VARGAS, L.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; MANGOLIN, C. A.; BARRERO, N. M. L. Avaliação da variabilidade das gerações G0 e F1 da linhagem GIFT de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 2, p. 233-240, 2008.

RESENDE, E.K.; RIBEIRO, R.P.; LEGAT, A.P.; BENITES, C. Genetic improvement in fish-an aquacultural revolution in Brazil. Boletim SBI, **Sociedade Brasileira de Ictiologia**, v.12, p.5-6, 2009.

RITLAND, K. Estimator for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. **Genetics research**, vol. 67, p. 175-185, 1996.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106, 2008

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18. p 2, 2000.

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

YAÑEZ, J.M; MARTINES, A; ARO, L; CABREJOS, M. Aplicación de herramientas moleculares en el mejoramiento genético de peces cultivos: Evaluacion de la condición genética de reproductores. **Revista versión diferente**, v.16, p.48 – 51,2012

3. Revisão de Literatura

3.1 Produção Aquícola Mundial

Segundo dados da FAO (2012) existe um aumento notório da produção em toneladas de peixe entre o ano de 2006 a 2011 provenientes da aquicultura de águas continentais e marinhas passando de 47,3 milhões de toneladas para 63,6 milhões respectivamente (tab. 1). Dados do *Earth Policy Institute* de 2013 informaram a cifra recorde de 66 milhões de toneladas em 2012 superando a produção de carne bovina que atingiu uma produção de 63 milhões de toneladas demonstrando o notório crescimento deste sistema de produção.

Atualmente se criam 600 espécies aquícolas em cativeiro em diferentes sistemas de produção e com diferente complexidade tecnológica (FAO, 2012), contribuindo notavelmente à produção de peixe mundial.

Tabela 1. Produção mundial da Pesca e Aquicultura

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
	(Milhões de toneladas)					
PRODUÇÃO						
Pesca de captura						
Continental	9,8	10,0	10,2	10,4	11,2	11,5
Marítima	80,2	80,4	79,5	79,2	77,4	78,9
Pesca de captura total	90,0	90,3	89,7	89,6	88,6	90,4
Aquicultura						
Continental	31,3	33,4	36	38,1	41,7	44,3
Marítima	16,0	16,6	16,9	17,6	18,1	19,3
Aquicultura total	47,3	49,9	52,9	55,7	59,9	63,6
Produção pesqueira mundial total	133,7	140,2	142,6	145,3	148,5	154,0

Fonte: FAO, 2012

O aumento das taxas de crescimento da produção aquícola mundial entre 1980 e 2010 é superior ao crescimento apresentado pela população mundial (1,5%).

Portanto, o consumo médio anual per capital de espécies cultivadas aumentou sete vezes, passando de 1,1 kg na década de oitenta para 8,7 kg no ano de 2010 (7,1%) (FAO, 2012). Este fenômeno pode ser explicado por vários acontecimentos, como a procura por uma alimentação mais adequada por parte da população mundial, políticas federais e estaduais, aumento da oferta, além das melhoras na qualidade do produto oferecido (sabor, textura, coloração, etc.) ao consumidor final. Segundo dados da FAO (2012) se estima que o valor total da produção aquícola foi de 194,4 bilhões de dólares no ano de 2010. Embora o crescimento deste sistema produtivo seja representativo ainda existem muitas diferenças quando se observa detalhadamente a produção em toneladas de carne de peixe e seus subprodutos entre os países com disponibilidade de tecnologias e território para este tipo de sistemas. Na atualidade, a maior produção aquícola é representada pela Ásia, seguido das Américas, Europa, África e Oceania respectivamente (tab. 2). Nas Américas a produção de peixe de água doce tem diminuído passando de 54,8% na década noventa para 37,9% em 2010 devido ao pouco crescimento na América do Norte (FAO, 2012). Para efeitos contrários o crescimento nos países da América do Sul é contínuo e significativo, sendo países como Brasil, Peru, Colômbia e Equador os principais produtores.

Tabela 2. Produção Aquícola mundial por continente

Continente		1990	2000	2009	2010
África	(Toneladas)	81 015	399 676	991 183	1 288 320
	(Porcentagem)	0,6	1,2	1,8	2,2
Américas	(Toneladas)	548 479	1 423 433	2 512 829	2 576 428
	(Porcentagem)	4,2	4,4	4,5	4,3
Ásia	(Toneladas)	10 801 356	28 422 189	49 538 019	53 301 157
	(Porcentagem)	82,6	87,7	88,9	89
Europa	(Toneladas)	1 601 524	2 050 958	2 499 042	2 523 179
	(Porcentagem)	12,2	6,3	4,3	4,2
Oceania	(Toneladas)	42 005	121 482	173 283	183 516
	(Porcentagem)	0,3	0,4	0,3	0,3
Total mundial	(Toneladas)	13 074 379	32 417 738	55 714 357	59 872 600

Fonte: FAO, 2012

3.2 Produção Aquícola do Brasil

O Brasil possui uma diversidade de espécies com potencial na aquicultura e a maior reserva de água doce do mundo, o que faz deste país um lugar com capacidade de produzir produtos de origem aquícola de qualidade e em quantidade. Segundo dados da FAO (2012) o Brasil ocupa o terceiro lugar no continente americano superado pelo Chile e os Estados Unidos da América. A produção de pescado do Brasil segundo dados informados pelo MPA (2011) a produção do país foi de 1.431.974,4 t apresentando um incremento de 13,2% com relação à produção do ano de 2010. Cabe ressaltar que a produção aquícola do Brasil está distribuída ao longo do país, sendo o Nordeste a principal região produtora, seguida pela região Sul, Norte, Sudeste e Centro-Oeste respectivamente (Fig. 1) (MPA, 2011).



Figura 1. Produção de pescado (t) em 2010 e 2011 discriminada por região.

Fonte: MPA, 2011.

Quando se analisa a produção de peixe por estado, pode se observar que o estado de Santa Catarina apresentou o maior número de toneladas de peixe com 194.866,6 t correspondendo a 13,6%, seguido pelos estados do Pará e Maranhão com 10,7% e 7,2%, respectivamente (MPA, 2011). Da produção de pescado em geral a aquicultura representa 43,9% da produção total do país com 628.704,3 t, sendo 86,6% desta produção proveniente da aquicultura continental (MPA, 2011).

3.3 Produção Aquícola continental do Brasil por espécie

A produção de peixe de água doce do Brasil não tem uma espécie predominante nos sistemas de cultivo (tab. 3). Hoje no Brasil a produção de pescado é produto de espécies nativas, assim como de espécies considera exóticas para o país, porém a maior produção se concentra em duas classes: Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) as quais somadas segundo dados do MPA (2011) representaram 67,0% da produção nacional.

Cabe ressaltar que espécies como o tambacu, carpa e pacu juntas representam 20,1% da produção nacional. Esses dados indicam que embora a produção nacional de pescado não esteja dominada por uma espécie específica se concentram em cinco espécies, duas exóticas: a tilápia do Nilo e a carpa, duas nativas: o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o híbrido destas duas espécies (tambacu).

Tabela 3. Produção Aquícola brasileira por espécie

Espécie	Produção em toneladas em 2011
Bagre (<i>Liposarcus multiradiatus</i>)	7.048
Carpa (<i>Cyprinus Carpio</i>)	38.079
Cascudo (<i>Hypostomus sp</i>)	58
Curimatã (<i>Prochilodus argenteus</i>)	7.143
Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	1.747
Matrinxã (<i>Brycon sp</i>)	5.702
Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	21.689
Piau (<i>Leporinus obtusidens</i>)	4.309
Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	1.137
Pirapitinga (<i>Piaractus brachyomus</i>)	9.859
Piraputanga (<i>Brycon microleps</i>)	265
Pintado (<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>)	8.824
Tambacu (<i>C. macropomum x P. mesopotamicus</i>)	49.818
Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	111.084
Tambatinga (<i>C. macropomum x P. brachyomus</i>)	14.326
Tilápia (<i>Oreochormis niloticus</i>)	253.824
Traíra (<i>Hoplias malabaricus</i>)	926.5
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	3.277
Outros	5.372
TOTAL	544.490

Fonte: MPA, 2011

3.4 Produção de Tilápia no Brasil

A Tilápia, uma espécie exótica para o Brasil foi considerada uma praga e desvalorizada até meados do século XX é hoje a espécie mais produzida do país com 253.824,1 t (MPA, 2011). A produção de tilápia entre o ano de 2000 e 2010 teve um incremento do 17%. Este crescimento quando comparado com o aumento apresentado pela produção aquícola do país foi superior em 7% (KUBITZA, 2012), indicando que esta espécie tem uma alta aceitabilidade no mercado consumidor alvo dos sistemas produtivos.

Atualmente se tem desenvolvidos estratégias como o mono cultivo masculino visando obter o máximo rendimento dos tanques de criação, esta condição favoreceu positivamente à produção de tilápia. Muitos outros eventos enriqueceram este sistema produtivo, segundo Kubitza (2012) a incorporação de tanques-rede, o desenvolvimento de rações de altos valores nutritivos, o aproveitamento dos reservatórios do país, além da oferta de produtos de boa qualidade ao mercado consumidor são fatores importantes no crescimento desta atividade.

Todos esses acontecimentos somado à introdução de novas linhagens de tilápias tem favorecido a renovação dos estoques de reprodutores e como consequência um aumento da variabilidade genética das populações. Um claro exemplo disso ocorreu no ano de 1996 quando ingressaram ao país reprodutores de novas linhagens de tilápia originárias da Tailândia, que propiciaram um incremento de 3,75 vezes o número de toneladas produzidas desde sua incorporação até o ano de 2003 (MASSAGO et al. 2010).

O MPA (2013), indicou no censo aquícola de 2008, 15.469 produtores de pescado os quais se diferenciam em tamanho e recursos financeiros. O principal foco de produção está localizado na região Sul com 8.855 produtores de tilápia representando 41% da produção, 31% na região Nordeste, 22% na região Sudeste, 3% na região Norte e 3% no Centro-Oeste. Claramente se observa que a produção desta espécie tem se distribuído ao longo do território nacional e se convertendo na principal espécie cultivada. Este crescimento tem gerado interesse não só para produtores piscícolas como também para pesquisadores, tendo direcionado suas pesquisas para explicar e aumentar o conhecimento que se tem das principais

características produtivas da espécie e também solucionar os problemas ambientais produzidos por espécies exóticas.

3.5 Biologia da Tilapia

Tilápia é o nome comum de três gêneros de espécies de peixes da família Cichlidae: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*. Essas espécies estão sendo criadas em vários países dos hemisférios norte, sul e especialmente no Oriente Médio e Ásia (FAO, 2012). As espécies da família *Cichlidae* apresentam características morfológicas diversas que permitem seu reconhecimento de uma forma fácil e rápida, possuem linha média, seu corpo tem uma tendência a redondo, cabeça pequena e nadadeira dorsal bem desenvolvida (Fig. 2). O gênero *Oreochromis* está entre os mais importantes comercialmente utilizados na aquicultura mundial, com mais de 75 países produtores (FAO, 2012).

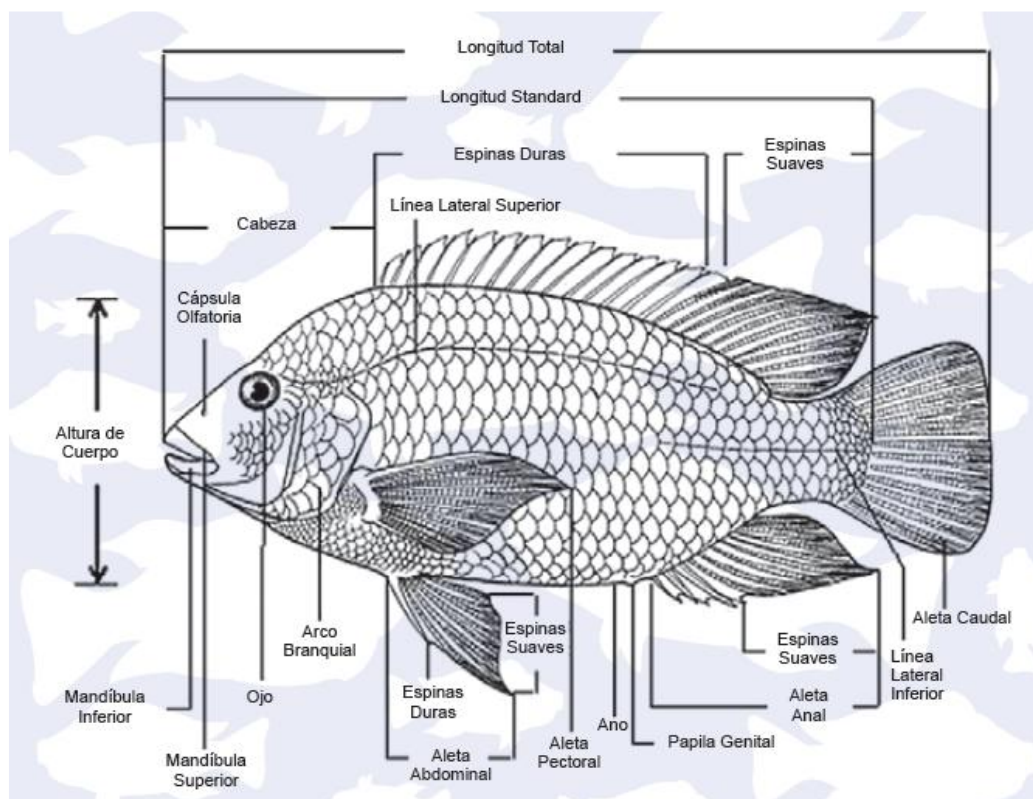


Figura 2. Características morfológicas da Tilápia do Nilo
Fonte: Tsang e Quintanilla, 2008, p. 11

A tilápia é uma espécie versátil para a piscicultura, pois, adapta-se tanto ao cultivo extensivo, sem qualquer tecnologia empregada, quanto ao sistema de criação de tanques-rede, com rações completas e alta tecnologia de produção (KUBITZA, 2012). Uma das características do gênero *Oreochromis* é seu baixo custo de produção, aceitação a altas densidades, poucas exigências de oxigênio e tolerância a águas salgadas com baixos teores de salinidade (10 ppt – 15 ppt) (TSANG; QUINTANILLA, 2008; KUBITZA, 2000). A tilápia é típica de ambiente tropical, adaptando-se melhor em clima onde a temperatura da água varie entre 18°C e 28°C. Temperaturas abaixo de 12°C e acima de 42°C são letais. A desova é estimulada com temperatura da água entre 22°C e 24°C, apresentando o melhor desempenho produtivo com temperatura da água entre 26°C e 28°C e quando esta é inferior a 15°C, pouco se alimenta e não se reproduz.

A tilápia é um vertebrado omnívoro que aproveita de forma eficiente o fitoplâncton e zooplâncton. Em viveiros com pouca renovação de água, cerca de 50 a 70% do crescimento está relacionado com o consumo de alimento natural, mesmo com o fornecimento de alimento suplementar permitindo a redução do custo de produção quando comparado com o sistema intensivo em tanque-rede (DOS SANTOS et al., 2006; KUBITZA, 2012). Esta família se localiza na base da cadeia alimentar e apresenta resposta positiva à fertilização dos viveiros. Seus hábitos alimentícios dependem entre outros fatores da espécie de tilápia, tamanho do indivíduo, hora do dia, foto período, profundidade da água e localização geográfica (EL-SAYED, 2006). Sua maturidade sexual é atingida com 4 ou 5 meses pós eclosão, sendo determinante para isto o fator clima, espaço, manejo, linhagem e alimentação (OLIVEIRA et al., 2007). Além da maturidade, o desempenho reprodutivo pode ser definido pelas características próprias de cada linhagem (ALMEIDA et al., 2013). Portanto, deve ser escolhida a linhagem de tilápia que apresente características específicas de acordo com o sistema que irá ser utilizado. A adaptabilidade, tolerância a diferentes ambientes, reprodução em cativeiro e a taxa de crescimento são variáveis que devem ser avaliadas (DOS SANTOS et al., 2006).

A fêmea realiza incubação bucal até as larvas reabsorverem o saco vitelino (DOS SANTOS et al., 2006) (Fig. 3), este processo se completa em um período de uma ou duas semanas (Fig. 4). O dimorfismo sexual pode ser observado quando os animais atingirem 50 a 70 gr (Fig. 5) (TSANG; QUINTANILLA, 2008).

Para garantir a qualidade dos ovos existem algumas condições que devem ser cumpridas, por exemplo, diferentes níveis de proteína na ração influenciam na fecundidade (GUNASEKERA et al., 1996), na fertilização, na taxa de eclosão e no tamanho do ovo (KJORSVIK et al., 1990).



Figura 3. Incubação bucal de fêmea de tilápia do Nilo
Fonte: Perez, HJG, 2012

Em relação ao tamanho dos ovos, estes variam entre e dentro de espécies sendo que o tamanho e o número dos ovos produzidos por uma fêmea influenciam no tamanho das larvas, na resistência às doenças, sobrevivência e na eclosão (BONISLAWSKA et al., 2001; WALLACE; AASJORD, 1984; COLEMAN; GALVANI, 1998). Um fator importante na qualidade das larvas pós-eclodidas é o tamanho do saco vitelino o qual está relacionado com o tamanho das larvas e difere entre as linhagens de tilápia (GISBERT, 2000; NEUMANN, 2004).

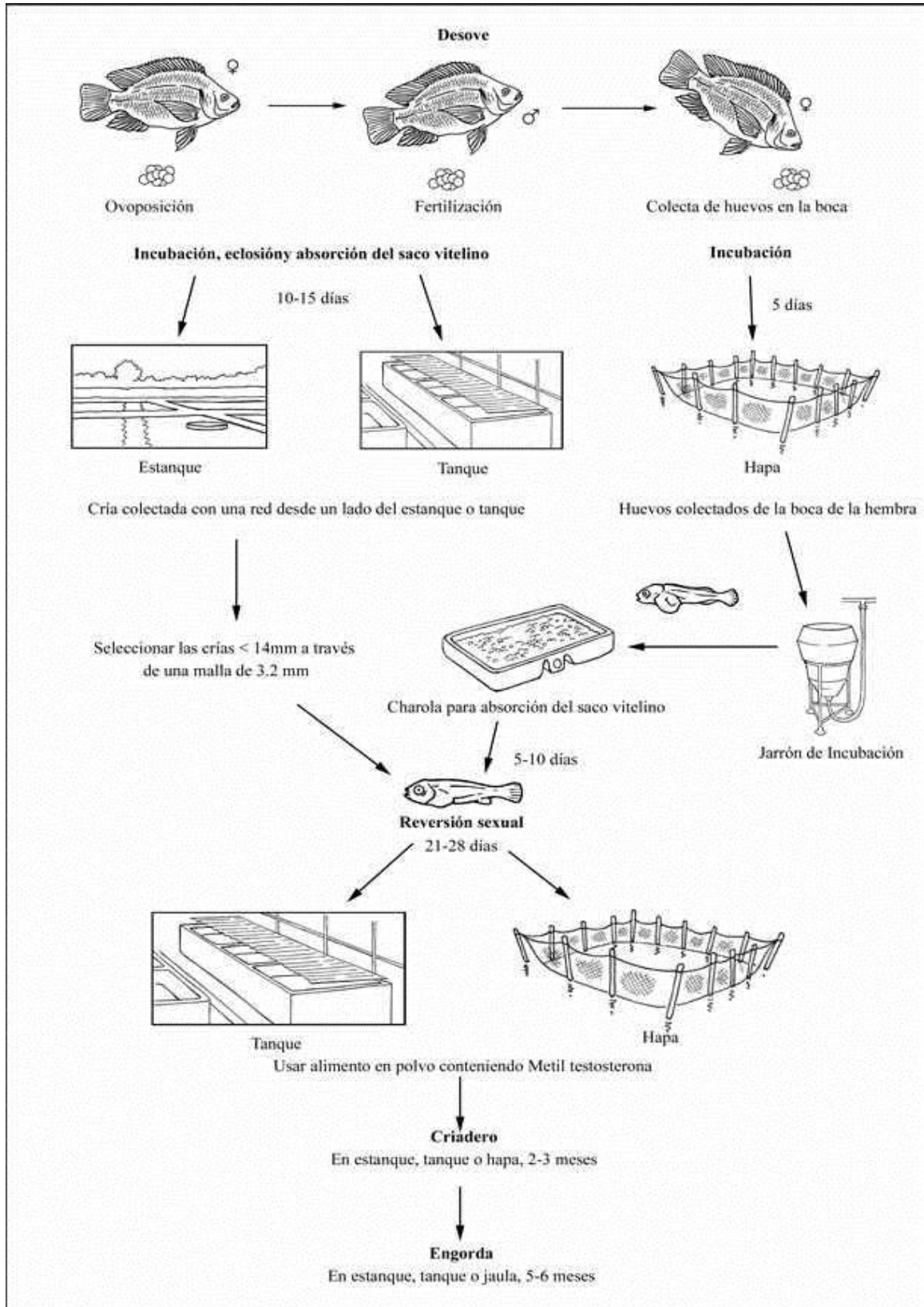


Figura 4. Sistema Reproductivo da tilápia do Nilo
 Fonte: FAO, 2014

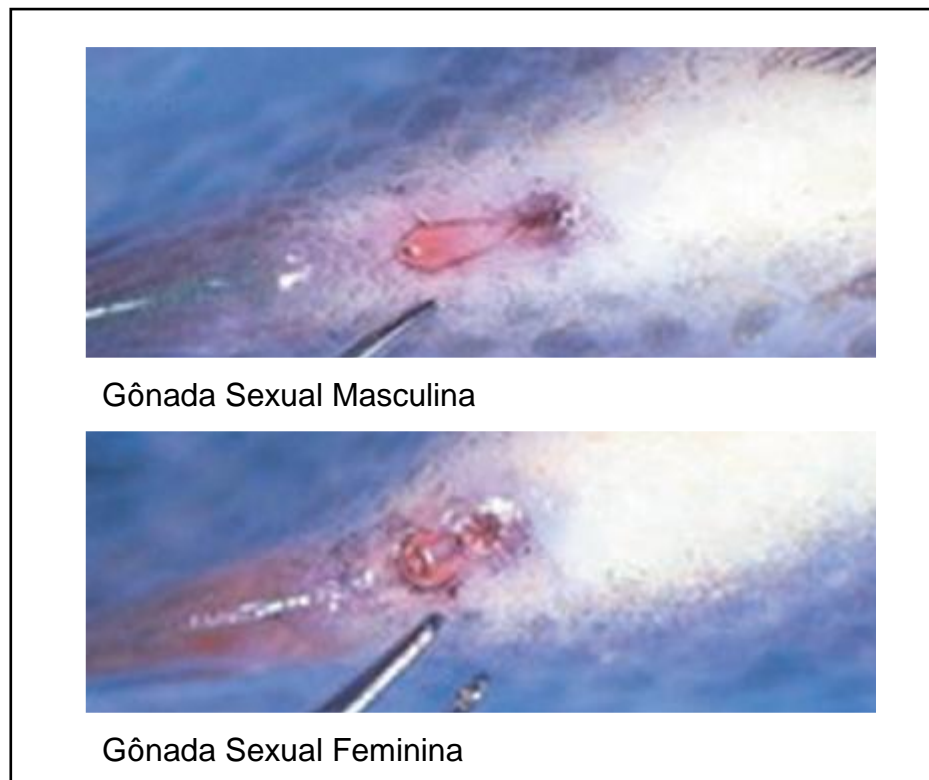


Figura 5. Gônadas sexuais da Tilápia do Nilo
Fonte: Tsang, Quintanilla, 2008, p. 16

As diversas características da espécie tem favorecido o aparecimento nos ambientes de cultivo de diferentes tipos de linhagens com morfologia, hábitos e desempenhos produtivos diferenciados, dando a oportunidade a novas ciências de atuar e potencializar o rendimento da tilápia. No entanto, tais caracteres têm valor restrito, devido à grande variação interpopulacional e diferenças sutis entre plantéis (BARDAKCI; SKIBINSKI, 1994), o que dificulta a identificação das linhagens.

As variedades comerciais conhecidas no Brasil são o produto de anos de estudo e de programas de melhoramento genético da espécie. Essas linhagens entraram no país na década de 70 com a primeira importação de tilápia Nilótica chamada Bouaké originária de Costa do Marfim, seguida pela Chitralada da Tailândia e a linhagem Supreme da empresa Genomar em 2002 (MASSAGO et al., 2010).

A Chitralada ou Tailandesa é uma linhagem desenvolvida no Japão e melhorada no Palácio Real de Chitralada em 1965 que após o melhoramento genético realizado pela empresa GENOMAR apareceu sobre o nome de Supreme Tilápia (SCORVO et al., 2010).

Outra linhagem que tem sido bem recebida pelos produtores é a linhagem GIFT que entrou ao Brasil através do projeto apoiado pela Secretaria especial de Aquicultura e Pesca do estado de Paraná em conjunto com o World Fish Center.

Além das linhagens citadas anteriormente, existem na atualidade outras linhagens como: A GMT (Genetically Male Tilápia) a qual foi formada utilizando “tecnologia YY” na qual permite obter indivíduos 100% machos, a Tilápia Prateada, a Tilápia Vermelha e a linhagem Premium Aquabel cultivada pela empresa Piscicultura Aquabel há três anos aproximadamente, desta linhagem informação sobre seus origens ainda não foi disponibilizada. A introdução e o estudo de novas linhagens no Brasil é importante para melhorar e continuar com o cultivo da tilápia (SCORVO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013), Impulsando o uso de programas de melhoramento genético nos sistemas produtivos.

3.6 Melhoramento genético e metodologias de seleção em piscicultura

Um fator importante quando se deseja maximizar a produtividade em peixes, é a utilização de indivíduos geneticamente superiores que apresentam rendimento elevado em ambientes específicos. Para a obtenção de peixes com estas características os programas de melhoramento genético são uma ferramenta útil que permitem selecionar os melhores exemplares e como resultado disso um incremento na produtividade dos sistemas (PONZONI et al. 2010). Ponzoni (2006) descreveu os critérios que devem ser cumpridos no momento de estabelecer programas de melhoramento genético, os quais são descritos na continuação:

1. Descrição ou desenvolvimento do sistema de produção;
2. Escolha da espécie, variedades e sistema de cruzamento;
3. Definir qual é o objetivo de seleção;
4. Definição dos critérios de seleção;
5. Delineamento do sistema de avaliação genética;
6. Seleção dos animais e definição do sistema de acasalamento;
7. Desenho do sistema para expansão e disseminação dos estoques melhorados;
8. Monitoramento e comparação de programas alternativos.

Dentre as muitas condições que devem ser consideradas a variabilidade genética da população é um ponto chave e fundamental para garantir o êxito do programa de melhoramento genético. Dessa forma, os programas de melhoramento devem ser direcionados a características específicas, considerando as condições de criação, objetivos, manejo e mercado consumidor. Além disso, é necessária a estruturação das famílias em gerações e a análise dos dados (produto de medições programadas das características de interesse), de maneira a identificar os indivíduos geneticamente superiores e permitir o acasalamento preferencial destes (RESENDE, 2009).

Esta característica de acasalamento preferencial (dirigido) pode ser explicada pelo fato do melhoramento genético ser realizado em porções pequenas da população, pois este é direcionado aos indivíduos “elite” ou superiores, multiplicando e disseminando o material genético nos sistemas de produção (Fig. 6) (PONZONI, 2006).

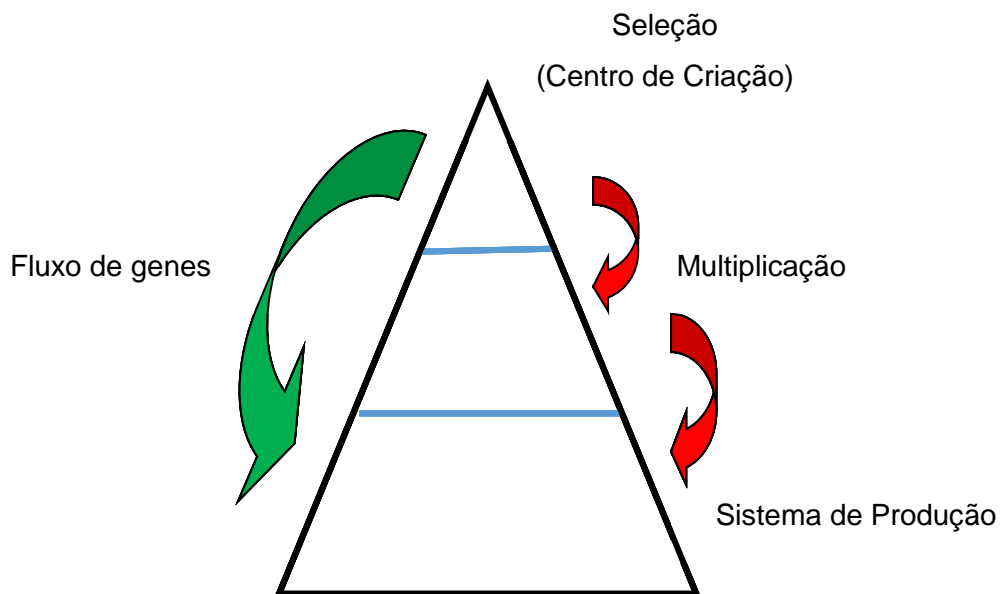


Figura 6. Fluxo de genes a partir do centro de criação para o sistema de produção
Fonte: Ponzoni, 2006

Em piscicultura, Turra et al. (2010), descrevem os principais atributos que são incluídos neste tipo de programas, como:

- Taxa de crescimento;
- Conversão alimentar;
- Resistências a doenças específicas;
- Qualidade da carne;
- Idade à maturação sexual.

Como pode ser observado existem diversas características ou atributos a serem usados pelos programas de melhoramento, sendo muito importante a definição do tipo de variável a ser melhorada, ou seja qualitativa ou quantitativa e a metodologia de seleção a ser empregada.

Segundo Moreira et al. (2013), as características qualitativas são variáveis discretas ou seja, são evidenciadas como poucas variações do fenótipo. Este mesmo autor define as características qualitativas como variáveis controladas por um ou por poucos genes, portanto este tipo de variáveis tem poucas classes fenotípicas e são pouco influenciadas pelo ambiente. Um exemplo clássico do processo seletivo realizado sobre uma característica qualitativa é o descrito por Beaumont et al. (2010), no qual se fixa a coloração dourada da Carpa (*Cyprinus carpio*).

A principal diferença entre uma característica qualitativa e quantitativa se fundamenta no fato das características quantitativas serem controladas por mais de um gene e são conhecidas como variáveis poligênicas (BEAUMONT et al., 2010). Tanto as quantitativas como as qualitativas são influenciadas pelo ambiente, mas é claro que quando um determinado atributo é controlado por um número muito grande de genes este se faz mais influenciável por fatores ambientais. É por este aspecto que dizemos que as características quantitativas são altamente afetadas por variações externas, em muitos casos impossíveis de serem controladas (MOREIRA et al., 2013).

Essas características ou variáveis sofrem diferentes efeitos da seleção quando vinculadas a programas de melhoramento genético. Todas as metodologias de seleção tem como finalidade obter estimativas que permitam definir os animais

com maior potencial para produção, ou seja, maximizar a correlação entre o valor produtivo estimado e o verdadeiro dos indivíduos (FJALESTAD, 2005). As metodologias de seleção não criam novos genes, o efeito desses processos é a alteração das frequências alélicas incrementando as frequências dos alelos favoráveis para as características submetidas ao processo seletivo, dando como resultado uma diminuição dos alelos menos favoráveis (GJEDREM, 2005). O resultado da seleção pode ser confirmado com o incremento da média populacional do atributo sobre seleção.

Existem diversas metodologias de seleção, a escolha depende da característica e do interesse do sistema de produção. As metodologias que são utilizadas pelos programas de melhoramento genético são: seleção por pedigree, seleção por família, seleção dentro de família, seleção combinada e seleção massal ou individual, esta última é a mais utilizada em sistemas de produção aquícolas (GJEDREM; BARANSKI, 2009). Na continuação serão descritas de uma forma breve as metodologias mencionadas, ressaltando suas principais características.

3.6.1 Seleção por pedigree

Este método de seleção se caracteriza por selecionar indivíduos considerando o desempenho dos pais, avós e ancestrais mais distantes. As limitações deste método de seleção, de não proporcionar informação do indivíduo, diminui a sua utilização ou direciona o seu uso a situações específicas, sendo isto o principal motivo para ser inutilizado quando se tem outras fontes de informação disponíveis (MOREIRA et al., 2013). Esta metodologia é usada quando se quer avaliar o desempenho de animais juvenis que ainda não possuem informação sobre seu comportamento produtivo (GJEDREM; BARANSKI, 2009). Embora o indivíduo carregue a metade do material genético de seus progenitores pelo efeito da segregação mendeliana, pode existir variação entre a prole diminuindo a precisão do método (FJALESTAD, 2005).

3.6.2 Seleção por família

A seleção por família se refere ao método de seleção que se realiza mediante um ranking das famílias que estão sendo avaliadas segundo o

desempenho de cada família, sendo descartada ou armazenada a família completa (FJALESTAD, 2005). Este tipo de metodologias é implementada em análises de características que não podem ser medidas em indivíduos vivos tais como qualidade da carne. Uma das desvantagens deste método é o efeito do ambiente comum de cada família. Este ambiente sendo muito diferente entre as famílias pode favorecer ou prejudicar um grupo de animais específico (GJEDREM; BARANSKI, 2009). Outro atributo que deve ser cumprido para poder executar este tipo de métodos é o conhecimento do parentesco de cada indivíduo, portanto é importante manter registros adequados do pedigree e identificação individual, incrementando o custo da metodologia (GJEDREM; BARANSKI, 2009).

A precisão da seleção por famílias depende de vários fatores, sendo um método de seleção com particular importância para características de baixa herdabilidade como é o caso da sobrevivência, resistência a doenças e idade de maturação sexual (GJEDREM; BARANSKI, 2009), além disso variáveis como o tamanho da família (n), o grau de parentesco (irmãos completos e/ou meios irmãos) e o efeito ambiental comum entre as famílias também devem ser considerados (FJALESTAD, 2005).

3.6.3 Seleção dentro de família

A seleção dentro de família é quanto se desvia a média individual da média da família que pertence, sendo contrária ao método anterior (seleção por família) (FJALESTAD, 2005). Este método ignora o valor médio da família, sendo de interesse quando o efeito ambiental comum é grande. Além disso, este método permite diminuir o aumento da consanguinidade sendo aplicável somente para características que são medidas em animais vivos (GJEDREM; BARANSKI, 2009).

Esta metodologia de seleção é muito utilizada em experimentos de laboratório e é um método que economiza espaço em termos de infraestrutura sendo um método muito eficiente quando comparado com outras metodologias de seleção (FJALESTAD, 2005).

3.6.4 Seleção combinada

Esta metodologia de seleção combina toda a informação disponível de um indivíduo, seus irmãos completos, meios irmãos, prole e parentes com a finalidade de maximizar a eficácia na estimação dos valores de criação e obtenção de indivíduos superiores (DA COSTA et al., 2000; GJEDREM; BARANSKI, 2009). Estes valores de criação podem ser fortemente reduzidos quando o efeito ambiental comum entre irmãos completos aumenta. Destacando a importância da padronização do meio ambiente durante o período da análise (GJEDREM; BARANSKI, 2009).

Segundo Negreiros (2006 apud FALCONER; MACKAY, 1996) os resultados deste método de seleção pode proporcionar resultados tão bons como os obtidos com a seleção entre famílias, a seleção dentro de famílias e a seleção individual. No entanto, estes autores relatam que a expectativa de superioridade não supera os 10% do ganho obtido pela seleção entre e dentro de famílias.

3.6.5 Seleção massal ou individual

Segundo Fjalestad (2005), a seleção massal se baseia no fenótipo ou desempenho individual, este método é amplamente utilizado nos sistemas de criação animal e para a maioria das espécies aquícolas é o único método utilizado. Este mesmo autor descreve o método como uma metodologia fácil de ser aplicada e em muitas circunstâncias produz respostas muito rápidas. Apesar das vantagens anteriormente mencionadas pelo autor, cabe ressaltar que este método de seleção é inadequado quando se utiliza sistemas de produção com grande variação ambiental ou baixa uniformidade dos lotes. A intensidade da seleção realizada nos sistemas de criação pode levar a um acúmulo indesejado da consanguinidade, isto é explicado no fato dos pedigrees não serem conhecidos facilitando o acasalamento de indivíduos aparentados (MOREIRA et al., 2013).

Esta metodologia é de difícil aplicação quando se quer avaliar características qualitativas como qualidade da carne, resistência a doenças e idade de maturação sexual. Em geral esta metodologia aumenta sua precisão quando aplicadas a atributos de media para alta herdabilidade (FJALESTAD, 2005).

Características como peso do filé, peso corporal, comprimento e altura são consideradas atributos de moderada para alta herdabilidade (TURRA et al., 2010), esta herdabilidade implica que grande parte da variação da característica pode ser transmitida (herdada), portanto a resposta à seleção individual é positiva, contrário ao que acontece quando a característica a ser selecionada é de baixa herdabilidade na qual o efeito ambiental pode mascarar o desempenho e explicar a variação da variável, diminuindo a resposta a este método de seleção. No entanto, existem várias características que podem ser incluídas nestes processos seletivos. Este método se restringe a uma ou duas características por vez (MOREIRA et al., 2013).

Como pode ser observado Fjalestad (2005), tem sido os autores que mais tem se interessado por estudos deste tipo, eles realizaram uma recopilação dos métodos de seleção empregados nos sistemas de produção atuais na qual deixa claro que em sistemas de produção aquícolas a seleção massal é o método mais eficaz sempre que sejam cumpridas todas as variáveis presentes na metodologia, por exemplo, homogeneidade na população alvo da seleção, controle do ambiente de cultivo, forma de acasalamento e a herdabilidade da característica em estudo.

3.7 Diversidade genética

A evolução pode ser definida como mudanças de frequências de genes ao longo das gerações o que representa que alguns indivíduos da população são geneticamente de maior qualidade que outros (PITCHER; MAYS, 2008). A diversidade de genótipos formados pela aleatoriedade de acasalamentos e efeitos ambientais produz um interesse grande sobre como estão sendo formadas as populações de peixes utilizadas na piscicultura. Beaumont (2010) questiona a importância de definir se uma população é geneticamente homogênea ou heterogênea, também inclui o termo variedade, raça, estirpe, linha quando se refere a espécies cultiváveis e a terminologia de estoques, população, subpopulação e tipos quando são espécies selvagens.

Para estudar o comportamento genético das populações ou linhas é importante conhecer a variabilidade genética delas através da caracterização genética que é utilizada como uma alternativa na quantificação e otimização desta variabilidade (MENEZES, 2005). Sendo importante pois as metodologias de reprodução em cativeiro nos sistemas de produção, assim como a introdução das

linhagens podem influenciar esta variabilidade (MASSAGO et al., 2009). As variações podem acontecer por vários motivos, especificamente são duas opções, a primeira, produto de pequenas modificações por alterações em poucos nucleotídeos, ou seja a substituição de uma base nitrogenada por outra e a segunda é o resultado direto ou indireto de inserções ou deleções de um ou vários nucleotídeos numa porção de DNA (BARNES, 2010).

As variações genéticas podem ser estudadas através de diversas técnicas moleculares, com a finalidade de oferecer informação sobre a distância genética entre indivíduos e com isto orientar o acasalamento de animais menos similares geneticamente (MENEZES, 2005). Metodologias como os marcadores moleculares são utilizadas para avaliar o parentesco entre os indivíduos. Portanto, marcadores podem ser utilizados na seleção e orientação dos cruzamentos a serem realizados. Além disso, servem para determinar o tamanho efetivo da população, identificação de híbridos, filogenia, definição de estratégias de melhoramento genético, entre outras funções (MELO et al., 2008).

3.8 Marcadores moleculares microssatélites

Os marcadores moleculares se definem como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (MELO et al., 2008). Um marcador molecular ideal deve cumprir com várias especificações: i) alto nível de polimorfismo, ii) estabilidade em diferentes ambientes, iii) detectar grande número de *loci* não ligados e iii) ser de herança simples (MELO et al., 2008).

Existem vários tipos de marcadores moleculares os quais podem ser utilizados para análises da variabilidade genética. Menezes (2005) menciona os RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Radom Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), mtDNA (DNA mitocondrial) e os STR (*Short tandem repeats*).

Os microssatélites ou STR se definem como elementos repetitivos em *tandem*, de dois a seis nucleotídeos de comprimento e estão entre os *locus* mais polimórficos observados nos genomas (MELO et al., 2008). Os STR podem ser de vários motivos dependendo da sequência que se repete (Fig. 7), sendo dímeros quando é a repetição consecutiva de dois nucleotídeos, trimero quando é a

sequência de três nucleotídeos, tetrâmero quando é a sequência de quatro nucleotídeos e assim por diante (tab. 4).

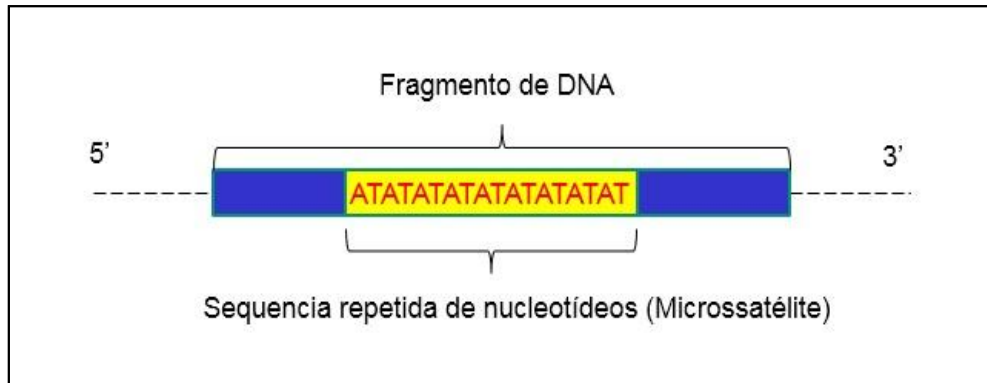


Figura 7. Ilustração gráfica do Microsatélite
Fonte: Perez, HJG, 2014

Os microsatélites são considerados os marcadores moleculares mais usados em estudos de genética de populações, nos quais o foco de investigação é a diferenciação genética. Isso decorre do tipo de ação gênica que apresenta (codominância) e também por ser multialélico (CARLSSON, 2008).

Tabela 4. Exemplo dos motivos microsatélites

MOTIVO	SEQUENCIA
Dímero	ATATATATATATAT
Trimero	ATCATCATCATCATC
Tetrâmero	ACTGACTGACTGACTG
Pentâmero	AATTTAATTTAATTTAATTT
Hexâmetro	GGGCCCGGGCCC

Fonte: Perez, HJG, 2014

Segundo Carlsson (2008), as estatísticas associadas a análise com microsatélites tem evoluído rapidamente deslocando o foco dos estudos das populações aos indivíduos. Este mesmo autor menciona que existem diversas

aplicações destes marcadores, tais como: diferenciação de populações, detecção de migrações recentes, análises de estoques mistos, identificação forense, identificação de animais para conservação. Menezes (2005), também cita que os microssatélites podem ser utilizados em identificação individual, controle de paternidade e caracterização genética de populações.

O polimorfismo deste marcador é produto das variações no número de repetições de cada motivo, provavelmente por erros da DNA polimerase durante o processo de replicação ou reparo da molécula de DNA (MELO et al., 2008). Quando comparados com outros marcadores são evidenciadas várias vantagens, entre elas: este marcadores são abundantes, cobrem extensivamente o genoma, possuem natureza multialélica, utilizam pequenas quantidades de DNA para análise, são de fácil detecção por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), têm herança do tipo mendeliana e são expressos como alelos codominantes (MELO et al., 2008).

3.9 Estatística na análise da variabilidade genética

Para estudos de variabilidade genética tem-se utilizado as frequências alélicas, a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), a obtenção de estimativas dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para diferentes *loci*, índices de fixação (ou estatísticas de F) e cálculos de distâncias genéticas.

3.9.1 Frequências alélicas

Os métodos moleculares tem sido fundamentais no desenvolvimento dos sistemas produtivos e na obtenção de informação das populações. Conhecer um pouco sobre alguns parâmetros de genética de populações que permitem entender o comportamento dos indivíduos e prever a resposta produtiva das proles no tempo atual, é de muita importância.

Dentre muitos outros conceitos a frequência alélica é um conceito que deve ser estudado, estas se definem como: as frequências relativas de um alelo de um dado *locus* em uma população. A partir das frequências alélicas e genotípicas são realizadas as análises de diversidade genética ao nível do indivíduo, população ou espécie. Quando os genótipos de *loci* codominantes são obtidos a partir de amostras

de indivíduos, a frequência dos alelos para cada *locus* pode ser estimada facilmente (BEAUMONT et al., 2010).

É importante lembrar que todos os indivíduos diploides possuem pares de cromossomos, portanto existem alelos pares para cada *locus*. Quando há presença de dois alelos iguais se define como homocigoto, pelo contrário, quando os alelos são diferentes é chamado de heterocigoto. Embora um indivíduo diploide só pode apresentar dois alelos para um *locus* podem existir muitos alelos diferentes para o mesmo *locus* dentro de uma população (BEAUMONT et al., 2010).

Para determinar se um *locus* é polimórfico ambos os alelos devem estar presentes na população com uma certa frequência e não ser o resultado de mutações repetidas introduzidas na população. É por causa disso que o conhecimento de polimorfismos permite ter uma noção da diversidade genética de uma população (PEREIRA; ALMEIDA, 2005). No entanto, realizar estudos mais específicos e aprofundados de cada *locus* aprimorou informação sobre a distribuição e dinâmica da diversidade, assim como a estimação de medidas de variabilidade genética das populações. Para realizar o cálculo das frequências alélicas dos alelos para cada *locus* por convenção são simbolizadas usando as letras minúsculas p, q, r, s, então, a frequência de um alelo é mediada por:

$$p = \frac{2H_o + H_e}{2N}$$

Onde, H_o é o número de homocigotos, H_e é o número de heterocigotos e N é o número total de alelos da população (BEAUMONT et al., 2010).

3.9.2 Equilíbrio Hardy-Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi descrito pelo matemático inglês G. H. Hardy e o físico alemão W. Weinberg em 1908. Esta teoria propõe que em uma população finita com acasalamentos panmíticos ou seja aleatórios sem seleção nem restrição, mutação ou migração as frequências alélicas e genotípicas permanecem constantes de uma geração a outra (MCMANUS et al., 2011).

Segundo Andersen e Hayes (2005) para entender como ocorre o equilíbrio Hardy-Weinberg devemos considerar um organismo diploide, no qual as células

diploides possuem duas cópias de cada gene localizado em uma posição específica ou *locus*, no par de cromossomos recebidos da mãe e do pai. Esses autores relatam que o valor das frequências genóticas está determinado pelas frequências alélicas em uma população, isto é, o conceito base da lei Hardy-Weinberg a qual indica que as frequências genóticas são mantidas constantes em uma geração sempre que as frequências alélicas não mudem e o princípio de acasalamentos ao acaso se mantenha.

Este equilíbrio pode ser demonstrado matematicamente através da estrutura matemática binomial simples (para dois alelos) ou multinomial (alelos múltiplos) e na distribuição das frequências gênicas, como descrito a seguir:

$$p^2 + 2pq + q^2$$

Para que uma população possa evoluir deve estar no seu ambiente natural, isto é que as características ou parâmetros para que o equilíbrio Hardy-Weinberg ocorra não se cumpram, por tanto as frequências alélicas mudam de uma geração para outra. Este fenômeno pode ser verificado utilizando um teste simples como o χ^2 (qui-quadrado) o qual compara os resultados observados versus os esperados. O qui-quadrado é descrito pela fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{l=1}^k \frac{(O - E)^2}{E}$$

Onde,

O é o número observados de indivíduos com genótipo específico

E é o número esperado de indivíduos com base no equilíbrio de Hardy-Weinberg

K é o número de genótipos

Pereira e Almeida (2005) citam que uma população em equilíbrio Hardy-Weinberg permite introduzir a mais importante das medidas de diversidade genética: a heterozigosidade, este parâmetro é indicado através de duas formas, a heterozigosidade observada (H_o) e a heterozigosidade esperada (H_e). A primeira é

calculada dividindo o número observado de indivíduos heterozigóticos pelo número total da amostra, a segunda corresponde ao valor de heterozigotidade no caso da população estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo dada pela expressão $2pq$. Assim, estudos que envolvam microssatélites obtêm necessariamente valores de heterozigotidade superiores aos que são obtidos pelos marcadores proteicos, uma vez que a taxa de mutação do primeiro tipo de marcadores moleculares é muito superior à do segundo (PEREIRA; ALMEIDA, 2005).

3.9.3 Estatísticas F

Em um estudo de diferenciação genética de populações, Wright (1943, 1951) introduziu o seguinte modelo matemático:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

Aonde, F_{IT} e F_{IS} são a correlação entre os dois gametas de um indivíduo em relação à população e em relação à subpopulação, respectivamente. Enquanto F_{ST} é a correlação entre dois gametas sorteados ao acaso de cada subpopulação e as medidas do grau de diferenciação genética de subpopulações (NEI, 1977). As estatísticas F são modelos matemáticos que utilizam os coeficientes de endocruzamento para avaliar o efeito da variação genética dentro e entre populações (Fig. 8) (MACMANUS et al., 2011).

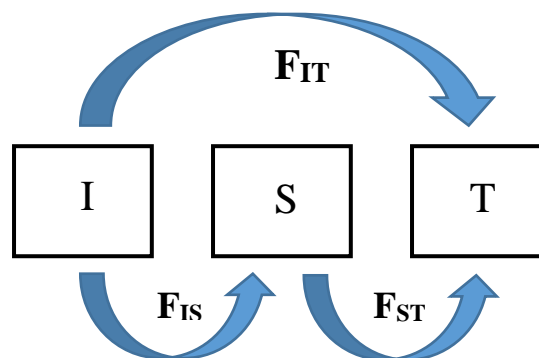


Figura 8 – Esquema estatísticas F. Aonde, I é o indivíduo, S é subpopulação e T é a população

Fonte: MacManus et al., 2011, p. 11

3.9.4 Estatística F_{IT}

Esta estimativa expressa a correlação entre os gametas que se unem para produzir os indivíduos em relação aos gametas da população total (MUNIZ et al., 2008). Esta estatística é conhecida como índice de fixação da população e é determinada pela medida de heterozigosidade de um indivíduo em relação ao total da população (todas as subpopulações combinadas), este conceito é expressado pela seguinte fórmula (MACMANUS et al., 2011):

$$F_{IT} = \frac{(H_{et} - H_o)}{H_{et}}$$

Onde,

H_{et} é a Heterozigosidade esperada da população total

H_o é a Heterozigosidade observada do indivíduo

Este modelo também pode ser descrito como:

$$F_{IT} = F_{IS} + F_{ST}$$

Esta estatística é o resultado da somatória da variação por efeitos da consanguinidade (F_{IS}) e o efeito de Wahlund (F_{ST}). O efeito Wahlund se apresenta quando uma população for dividida em subpopulações grandes, o resultado desse isolamento (efeito Wahlund) será semelhante ao dos acasalamentos consanguíneos, isto é, haverá aumento da frequência de homozigotos na população (WAHLUND, 1928), ou seja, a heterozigosidade de um indivíduo com respeito ao total da população está definido pelo grau de consanguinidade dos reprodutores e seus acasalamentos. Quando uma população é subdividida em subpopulações o processo evolutivo não acontecerá, portanto só existirá alterações nas frequências genotípicas, mas não das frequências gênicas.

3.9.5 Estatística F_{IS}

A estatística F_{IS} descreve a distribuição dos genótipos dentro das populações indicando a distância entre uma população e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EGUIARTE et al., 2010). Esta estimativa a semelhança da anterior também é conhecida como índice de fixação dentro de uma população sendo a probabilidade de dois genes serem homólogos num indivíduo derivado de um ancestral comum (MACMANUS et al., 2011).

Esta estatística mede o grau de endogamia, reflete a probabilidade de que dois alelos dentro do mesmo indivíduo sejam idênticos por descendência descrita pela mesma formula do modelo F_{IT}

$$F_{IS} = \frac{(H_{st} - H_o)}{H_{st}}$$

Aonde, H_{et} é a heterozigosidade observada da subpopulação e H_o Heterozigosidade esperada do indivíduo.

3.9.6 Estatística F_{ST}

Esta estimativa define a diferença de pares de cromossomos de indivíduos diploides amostrados com a média obtida de uma amostragem aleatória de cromossomos de uma população (excluindo o agrupamento por indivíduo) (MACMANUS et al., 2011). Outra definição foi citada por Muniz et al. (2008) como a correlação entre os gametas ao acaso dentro da subpopulação em relação aos gametas da população total.

$$F_{ST} = \frac{var(p)}{p(1-p)}$$

Aonde, a variância de p é calculada através de subpopulações e $p(1-p)$ é a frequência esperada de heterozigotos.

A estatística F_{ST} é utilizada no cálculo de diversidade genética por meio da seguinte fórmula:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) \quad \text{ou} \quad (F_{IT}) = (F_{ST}) + (1 - F_{ST}) \cdot F_{IS}$$

O valor de F_{ST} pode variar de 0 até 1, sendo 0 quando as populações têm frequências de alelos idênticas e 1 quando as populações fixaram alelos diferentes.

4. Relatório do trabalho de campo

4.1 Local

O estudo foi realizado no Laboratório de Engenharia Genética Animal LEGA, coordenado pelo Prof. Dr. Heden Luiz Marques Moreira do Departamento de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, no *campus* universitário, no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. Os indivíduos utilizados foram obtidos através do programa de melhoramento genético da empresa Aquabel localizada em Rolândia, Paraná, Brasil.

4.2 Período Experimental

O estudo iniciou na piscicultura Aquabel no segundo semestre de 2012 com a reprodução da geração filial e seleção dos reprodutores da geração seguinte. Durante este processo, no primeiro semestre de 2013, iniciou-se as análises moleculares, as quais se prolongaram até o final do segundo semestre de 2013, totalizando 18 meses de período experimental.

4.3 Obtenção dos reprodutores das linhagens Supreme, Premium Aquabel e Chitralada

Para a formação da geração inicial foram utilizadas 30.000 larvas das linhagens Supreme, Premium Aquabel e Chitralada. O processo de seleção foi realizado até atingir 120 reprodutores de cada linhagem, os quais foram distribuídos em cinco hapas de reprodução conservando a sua identidade por linhagem e uma relação de duas fêmeas para um macho (2:1). Estes indivíduos deram origem aos reprodutores da geração filial (F1). Para formar a F1 foram coletadas desovas (5 ml de ovos por cada fêmea desovada) para incubação das cinco hapas de cada linhagem em um período de três semanas cada sete dias, sendo utilizadas para o

teste de desempenho larvas com diferença em idade de uma semana, com a finalidade de mitigar o efeito, idade – crescimento. O procedimento de incubação foi realizado seguindo as condições da piscicultura Aquabel. O processo de seleção realizado permitiu obter 120 reprodutores de cada linhagem que foram distribuídos em cinco hapas conservando a sua identidade por linhagem e uma relação de duas fêmeas para um macho (2:1). Quando os reprodutores da geração filial atingiram o primeiro ano reprodutivo foram submetidos ao mesmo processo para formar a F2, adicional as coletas realizadas para formar a geração F2 foi realizado um teste de desempenho reprodutivo durante oito semanas, foram coletados dados cada sete dias das três linhagens de forma sincronizada. Medidas morfométricas como comprimento total, comprimento padrão, profundidade, peso, volume de ovos, peso de ovos, número de fêmeas desovas por semana e número de ovos por quilograma de peso vivo, foram tomadas no momento de constatado a presença de ovos na cavidade bucal das fêmeas. Após o processo de incubação da F2, as larvas foram alocadas a diferentes hapas (2x3x1m) dentro de tanques de terra e criados por um mês para a seleção de uniformização. Após esse período, os animais foram criados por mais seis meses. Nesse ambiente, foram submetidos a teste de desempenho, a fim de selecionar aqueles animais de crescimento superior. Conforme as seleções foram ocorrendo, o número de animais foi diminuindo até chegar ao final do período um total de 90 fêmeas e 30 machos de cada linhagem, formando os reprodutores que foram distribuídos aleatoriamente em cinco hapas de reprodução conservando sua identidade, totalizando em cada família 6 machos e 18 fêmeas.

Todos os animais depois de selecionados, tanto na geração inicial, filial e F2, foram chipados. Para implantação dos microchips antimigratórios na região lateral-dorsal de cada peixe os mesmos foram anestesiados com Eugenol em uma concentração de 50 mg/L⁻¹ (VIDAL et al., 2008). Após a recuperação da anestesia retornaram para a mesma hapa para continuação do crescimento, mantendo ainda a identidade das famílias (hapas). Durante toda a fase de criação, foram monitorados diariamente a porcentagem de oxigênio dissolvido e a temperatura da água encontrando valores de 5 mg/L e 26°C respectivamente.

4.4 Análise molecular

Posteriormente à distribuição dos reprodutores foi coletado aproximadamente 0,5 cm de nadadeira caudal para análise molecular. O material biológico da geração inicial e da geração filial iniciou seu processo de análise com a extração do DNA de cada indivíduo utilizando o protocolo de NaCl. Esta etapa iniciou no primeiro trimestre de 2013 e concluiu no segundo trimestre deste mesmo ano para dar início à segunda etapa do processo de análise molecular, a realização do PCR-Multiplex na revelação utilizando o primer marcado com o fluoróforo FAM permitiu a análise dos marcadores propostos para esta pesquisa através da genotipagem em sequenciador automático, os primers para amplificação dos fragmentos foram redesenhados a partir das sequências obtidas no GenBank usando o programa Vector NTI (Invitrogen). Esta análise finalizou-se no final do quarto trimestre de 2013. Os dados obtidos foram analisados no software Genepop e FSTAT para análises da Heterozigosidade Observada e esperada, Frequências alélicas, Equilíbrio Hardy-Weinberg e Estatísticas FIS e FST.

5. Artigo

Diversidade genética de três linhagens de tilápia do Nilo submetidas a seleção massal

Artigo formatado de acordo com as normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

Diversidade genética de três linhagens de tilápia do nilo submetidas a seleção massal

Harold Julián Perez Gutierrez⁽¹⁾, Diones Bender Almeida⁽¹⁾, Natalia Ossa Hernandez⁽¹⁾,

Carla Giovane Ávila Moreira⁽¹⁾, Marília Danyelle Nunes Rodrigues⁽¹⁾ e Heden Luiz

Marques Moreira⁽²⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão s/nº, caixa postal 354, CEP: 96010-900 - Pelotas -RS, Laboratório de Engenharia Genética Animal, Departamento de Zoologia e Genética, E-mail: hajupegu@gmail.com, nattoo.biologia@gmail.com, diones_almeida@yahoo.com.br, carlafarma@gmail.com, nunes.mdnunes@gmail.com; ⁽²⁾Professor adjunto do Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas; heden.luiz@gmail.com

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi analisar a diversidade genética através de marcadores moleculares microssatélites de três linhagens de tilápia do Nilo, em duas gerações, submetidas à seleção massal. Foram utilizados os *locus*: *UNH160*, *UNH178*, *UNH222*, *ISPMS01*, *PRMS01* e *PRMS02*. A partir desses *locus*, foram obtidos o número de alelos, a heterozigosidade observada e esperada, o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o coeficiente de endogamia e de diferenciação populacional, a diversidade genética e as frequências alélicas. O número médio de alelos por *locus* em cada linhagem demonstraram que não houve perda de alelos entre uma geração e a seguinte evidenciando-se que a seleção massal não teve efeito negativo sobre o número de alelos. Foram observados altos índices de endogamia na geração inicial e filial das linhagens em estudo, demonstrando a importância da análise prévia das populações iniciais. O coeficiente de diferenciação populacional identificou homogeneização das linhagens ao longo dos processos de seleção e pouca variação destas com respeito a suas próximas gerações, indicando efeitos inexistentes da seleção massal sobre as frequências alélicas. Os resultados do estudo não evidenciaram efeitos

30 negativos da seleção massal sobre a diversidade genética nas três linhagens de tilápia
31 estudadas dentro da geração inicial e filial

32

33 Termos para indexação: *Oreochromis niloticus*, melhoramento genético, endogamia.

34

35 **Genetic diversity of three strains of Nile tilapia subjected to mass selection**

36

37 **Abstract**

38 The objective of this research was to analyze the genetic diversity through microsatellite
39 markers from three strains of Nile tilapia in two generations undergoing mass selection. The
40 locus were used: UNH160, UNH178, UNH222, ISPMS01, PRMS01 and PRMS02. From
41 these loci were obtained, number of alleles, heterozygosity observed and expected, the test of
42 Hardy- Weinberg equilibrium, the coefficient of inbreeding and population differentiation,
43 genetic diversity and allele frequencies. The average number of alleles per locus in each
44 pedigree showed no loss of alleles between one and the next generation evidencing that the
45 mass selection had no negative effect on the number of alleles. High indicates of inbreeding
46 were observed in the initial and filial generation of strains under study, demonstrating the
47 importance of analysis provided the initial populations. The coefficient of population
48 differentiation of strains identified homogenization throughout the processes of selection and
49 these little variation with respect to their future generations, indicating nonexistent effects of
50 mass selection on allele frequencies. The study results showed no negative effects of mass
51 selection on genetic diversity in the three tilapia strains studied in the initial generation and
52 affiliate

53

54 Index Terms: *Oreochromis niloticus*, genetic improvement, inbreeding.

Introdução

55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79

O incremento da população mundial e com ela a necessidade de oferecer um alimento de ótima qualidade, fortaleceu os sistemas produtivos não convencionais, como a produção de peixe. As características produtivas das espécies vinculadas ao sistema de produção aquícola permitem uma relação de tempo-rentabilidade positiva, seja pela facilidade na alimentação ou em alguns casos pela forma como são cultivadas essas espécies. O Brasil apresenta um número diverso de espécies com potencial para piscicultura, porém são as espécies exóticas como a tilápia que têm demonstrado maior viabilidade econômica, devido ao conhecimento técnico disponível, tanto no campo da biologia quanto nas técnicas de manejo (Nogueira et al., 2007).

Tilápia é o nome comum de um grupo de peixes onívoros da família Cichlidae originárias da África (Song et al., 2009). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais utilizada nos cultivos comerciais devido a sua rusticidade, ao rápido crescimento, à ótima qualidade da sua carne, à boa aceitação no mercado consumidor e outras qualidades como prolificidade, maturidade sexual precoce, fecundidade relativa elevada e desova frequente, todas estas características são vinculadas a programas de melhoramento genético com a finalidade de potencializar o desempenho da espécie (Turra et al., 2010). Esses atributos tem aumentado de forma continua sua produção, contribuindo ao uso de metodologias de seleção de reprodutores para o controle da qualidade genética e produtiva da espécie, mas nem sempre os métodos executados produzem efeitos positivos na população. As práticas de manejo reprodutivo realizadas nos sistemas de produção aquícolas podem inadvertidamente diminuir a variabilidade genética das populações devido ao uso de pequenos grupos de reprodutores (Briñez et al., 2011). Esta prática de manejo contribuiu para o aumento na consanguinidade e como consequência diminuição significativa do crescimento e da diversidade genética na

80 população, bem como de outros fatores de interesse, afetando negativamente o sistema e
81 colocando em risco a sua sustentabilidade (Fjalestad, 2005; Briñez et al., 2011). Existem
82 vários métodos de seleção de reprodutores os quais são específicos para cada programa de
83 melhoramento genético e sistema de produção, sendo o mais utilizado a seleção por pedigree,
84 mas o custo de implementação desta metodologia em sistemas aquícolas é alto e o retorno
85 econômico é pouco, isto devido ao efeito ambiental que afeta notoriamente estes sistemas. A
86 seleção massal ou individual se destaca como a metodologia mais usada em aquicultura, de
87 fácil aplicação e se caracteriza por ser de alta intensidade na formação de famílias
88 “superiores”, quando aplicada a sistemas de reprodução conjunta se faz necessário o controle
89 genético das populações. Para exemplificar a importância do controle dos estoques de
90 reprodutores foi relatado que no estado do Paraná (Brasil) o índice de consanguinidade
91 atingiu níveis alarmantes de cerca de 35%, o que causou uma diminuição da produção de
92 alevinos (Tenório et al., 2012). A baixa variabilidade genética pode levar ao declínio do
93 desempenho zootécnico, fazendo com que características fenotípicas de pouco interesse
94 econômico ou indesejadas sejam expressas (Oliveira et al., 2011).

95 A intensificação dos sistemas de produção aquícolas aumenta a necessidade de uma maior
96 profissionalização da atividade. Portanto, o incremento da produção é proporcional ao
97 controle genético sobre a população, principalmente no que se refere à variabilidade genética
98 dos estoques de reprodutores (Oliveira et al., 2011), e a implementação de programas de
99 melhoramento genético de baixo custo. A caracterização da variabilidade genética em plantéis
100 de tilápia do Nilo é uma etapa importante para o estabelecimento de programas de
101 melhoramento genético nesta espécie (Moreira et al., 2007). Para a realização deste análise
102 são utilizados marcadores moleculares do tipo microssatélite, os quais foram isolados do
103 genoma da tilápia do Nilo (Yue & Orban, 2002). Estes marcadores são usados para obtenção
104 de estimativas de distâncias genéticas, monitoramento de linhagens endocruzadas, testes de

105 paternidade, comparações de composição genética de amostras recentes e antigas, análise da
106 diversidade genética, assim como indicar aos criadores a ocorrência da redução da diversidade
107 genética por meio da comparação dos níveis de variabilidade entre a origem e o material
108 derivado (Melo et al., 2008). Com base no exposto, o objetivo desta pesquisa foi analisar a
109 diversidade genética através de marcadores moleculares microssatélites de três linhagens de
110 tilápia do Nilo, em duas gerações, submetidas à seleção massal.

111

112

Materiais e métodos

113

114 Foi realizado no período de 2011 a 2013 na empresa Piscicultura Aquabel localizada em
115 Rolândia, PR, Brasil, um programa de melhoramento genético de três linhagens de tilápia do
116 Nilo ao longo de duas gerações, como uma proposta alternativa ao uso do modelo animal
117 convencional. Esta metodologia de melhoramento proposta incluía como base fundamental
118 para sua execução a reprodução conjunta de indivíduos das linhagens Supreme Tilapia (SP),
119 Premium Aquabel (PA) e Chitralada (CHI) conservando a sua identidade. Portanto, devido à
120 falta de controle do pedigree este modelo utilizou somente o desempenho individual como
121 critério de seleção e os acasalamentos na geração após a seleção também foi aleatório. Após o
122 processo de seleção o total de indivíduos, 120 animais de cada linhagem, foram distribuídos
123 em uma relação de duas fêmeas para um macho (2:1) em cinco hapas de reprodução, com
124 alimentação *ad libitum* e qualidade da água medida periodicamente seguindo a metodologia
125 estabelecida pela piscicultura Aquabel (figura 1). O material biológico foi coletado a partir da
126 amostragem de 70 indivíduos de cada linhagem, totalizando 210 reprodutores avaliados por
127 geração.

128 As análises moleculares das amostras foram conduzidas no Laboratório de Engenharia
129 Genética Animal (LEGA), da Universidade Federal de Pelotas, RS. Para a extração do DNA,

130 utilizou-se aproximadamente 1 cm² de nadadeira caudal por indivíduo e armazenada em
131 álcool 70% a - 20°C. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o protocolo de
132 Cloreto de Sódio (NaCl), as amostras de DNA foram diluídas em solução buffer contendo
133 Tris HCL 10mM (pH 7,5) e EDTA 1mM (pH 8,0). A integridade do DNA extraído foi
134 verificada em gel de agarose 1% e corado com *Gelgreen* (Biotium, USA).

135 Os *loci* utilizados foram escolhidos para compor um painel de análise a partir de marcadores
136 microssatélites publicados (Yue & Orban, 2002; Fesseaye et al., 2006; Trong et al., 2013).
137 Para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram usados os microssatélites,
138 *UNH160*, *UNH178*, *UNH222* os quais se encontravam em grupos de ligações diferentes e os
139 *locus ISPMS01*, *PRMS01*, *PRMS02* ligados ao crescimento. Foi seguido o protocolo de
140 amplificação proposto por Schuelke (2000). Os *primers* para amplificação destes motivos
141 foram redesenhados com o software Vector NTI (Invitrogen) a partir das sequências
142 depositadas no GenBank. Em um dos *primers* de cada *locus* foi adicionada a sequência 5´
143 TGTAACGACGGCCAGT 3´ (tabela 1), conhecida como cauda M13, com a finalidade de
144 gerar uma marcação fluorescente no produto amplificado (Schuelke, 2000).

145 A temperatura de anelamento da PCR-multiplex na revelação foi de 58°C para todos os *locus*.
146 Acrescentou-se para o mix de PCR o *primer* denominado M13 contendo na extremidade 5´ o
147 fluoroforo FAM (6-carboxy-fluoresceine). As proporções dos *primers forward*, *reverse* e cauda
148 M13 foram descritas por Schuelke (2000). O mix de PCR com volume final de 10 µl foi
149 usado para a amplificação dos fragmentos.

150 A checagem da amplificação se realizou com gel de agarose 1% e corado com *Gelgreen*
151 (Biotium, USA). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese capilar com
152 sequenciador automático ABI 3500 (Detecta, Brasil). O número de alelos (Na), as frequências
153 alélicas, a diversidade genética (Nei, 1977), a heterozigosidade observada (Ho) e esperada
154 (He) (Weir & Cockerham, 1984), o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), o

155 coeficiente de endogamia (F_{IS}) e o coeficiente de diferenciação populacional (F_{ST}) de Wright
156 (1978) foram calculados para cada *locus* de cada população dentro da geração inicial e filial
157 utilizando o programa Genepop (Rousset, 2008) e FSTAT (versão 2.9.3.2) (Goudet, 2002).

158

159

Resultados e Discussão

160

161 Foram obtidos 61 alelos a partir dos 6 *loci* microssatélites analisados, apresentando
162 diversidade alélica variável nos *locus* avaliados, sendo o *locus* PRL-MS02 o de maior número
163 de alelos. Para o *locus* UNH222 se observou o menor número de alelos, apresentando a menor
164 variabilidade alélica. Yue & Orban (2002) observaram que o *locus* PRL-MS02 é altamente
165 polimórfico, quando analisado em populações de tilapia do Nilo e tilapia Mossambica, com
166 21 e 14 alelos respectivamente, semelhante aos resultados obtidos para o mesmo *locus* por
167 esta pesquisa.

168 Os resultados para o número médio de alelos por linhagem demonstraram que não houve
169 perda significativa de alelos entre uma geração e a seguinte evidenciando-se que a
170 metodologia de seleção não interferiu negativamente no número de alelos quando
171 confrontadas a geração inicial (G_0) e filial (F_1) para as linhagens em estudo (tabela 2).
172 Resultados semelhantes foram obtidos por Rodriguez et al. (2013) na qual foram encontradas
173 variações de 3,24 alelos na (G_0) para 3,69 na (G_3). O número de alelos médios encontrados
174 em ambas as gerações são similares ao observado por Trong et al. (2013) na linhagem GIFT
175 na (G_{10}) utilizando doze *loci* microssatélites, o valor médio foi de 9 alelos nessa população.

176 Com respeito as frequências alélicas para a geração inicial, o *locus* UNH178 apresentou baixa
177 frequência alélica de 0,008 para os alelos 146, 152 e 154 na linhagem Supreme Tilápia; alelos
178 148 e 154 na linhagem Premium Aquabel e alelo 156 na linhagem Chitralada. Quando
179 analisadas as frequências alélicas para a geração filial foi encontrada baixa frequência para

180 este mesmo *locus* (UNH178) com 0,008 para os alelos 136 e 146 na linhagem Premium
181 Aquabel, para os outros *locus* avaliados em todas as linhagens não se identificaram valores de
182 frequências alélicas iguais ou menores a 0,008 na geração inicial e filial. Em *loci*
183 microssatélites a presença de baixas frequências alélicas e as diferenças entre estas
184 frequências nas gerações são explicadas segundo Romana-egui et al. (2005) como o
185 resultado da deriva genética que ocorre naturalmente nos estoques, com limitado tamanho
186 efetivo. Esta mesma autora observou que alelos de baixa frequência foram eliminados ao
187 longo das gerações reduzindo o valor médio de alelos por *locus* quando comparadas quatro
188 gerações de tilápia obtidas através de processos de seleção massal, embora este fenômeno não
189 foi evidenciado neste estudo devido ao número reduzido de gerações avaliadas, pode-se
190 relacionar a perda de alelos ao longo das gerações com a metodologia de seleção massal pela
191 eliminação de alelos de baixa frequência.

192 Nos 6 *locus* analisados foi detectada a presença de alelos privativos nas três linhagens em
193 estudo. Foram observados alelos privativos na geração inicial para a linhagem Supreme nos
194 *loci* UNH160 e UNH178 e na geração filial o *locus* UNH160. A linhagem Premium Aquabel
195 registrou alelos privativos na geração inicial para os *locus* UNH178, ISP-MS01, PRL-MS01 e
196 PRL-MS02, quando observados o número de alelos privativos para esta linhagem na geração
197 filial foi evidenciada a presença destes alelos nos *locus* UNH178, ISP-MS01, PRL-MS01 e
198 PRL-MS02. Para a linhagem Chitralada foram encontrados alelos privativos em todos os *loci*
199 avaliados nas duas gerações. Estes resultados segundo Moreira et al. (2007) permitem
200 identificar a partir da presença de alelos privativos e desconsiderando a sua frequência alélica
201 a distância genética das populações.

202 As medidas estimadas de heterozigidade observada (H_o) nas linhagens Supreme Tilápia,
203 Premium Aquabel e Chitralada para ambas gerações não apresentaram diferenças
204 significativas entre elas, apresentando valores inferiores aos valores obtidos para a

205 Heterozigosidade esperada (H_e), indicando certo grau de endogamia em G_0 e F_1 (tabela 3).
206 Estes valores observados são pouco comuns de serem encontrados e diferem do relatado por
207 vários autores os quais observaram valores maiores de heterozigosidade observada. Petersen
208 et al. (2012) em três populações de tilapia observaram valores de H_o de 0,53, 0,59 e 0,66.
209 Sukmanomon et al. (2012) encontraram valores superiores em três populações de tilápia
210 nilótica selvagens mantidas em três habitats diferentes, sendo que os valores de H_o variaram
211 de 0,610 para 0,740.

212 A estimativa de endogamia nas populações foi obtida através do F_{IS} sendo identificados
213 valores variáveis e significativamente diferente de zero. Tem sido observado que todos os
214 valores das linhagens dentro de geração foram positivos indicando excesso de homozigotos
215 (perda da diversidade genética). Estes resultados confirmam que existe endogamia dentro dos
216 indivíduos estudados e concorda com os resultados obtidos por Melo et al. (2006), nos quais
217 encontraram valores positivos de F_{IS} em seis plantéis comerciais de tilápia, este autor define
218 os valores positivos de F_{IS} como a presença de endogamia em essas populações. Este aumento
219 nos índices de endogamia nas linhagens pode estar relacionado a três fatores sendo um deles o
220 determinante para a condição genética das populações em estudo: Primeiro, o número de
221 famílias que formaram a geração inicial, considerando que o tamanho efetivo inicial reduzido
222 é proporcional a uma possível variabilidade genética reduzida; segundo, a metodologia de
223 seleção quando aplicada a programas de reprodução conjunta pode favorecer a formação de
224 estoques de reprodutores aparentados devido a sua superioridade genética para o critério
225 utilizado na seleção. A pouca variação entre os valores de F_{IS} das duas gerações quando
226 analisados em conjunto com os valores da heterozigosidade demonstraram que o efeito da
227 seleção massal e seu nível de intensidade não foi o determinante do estado genético destas
228 populações embora exista um efeito da metodologia de seleção sobre os índices de
229 endogamia. Os valores de F_{IS} apontam para um terceiro fator e determinante da condição

230 genética das populações em estudo, o nível de endogamia das linhagens iniciadoras do
231 programa de melhoramento genético, a qual pode ter se originado do manejo reprodutivo
232 anterior ao início do programa e que neste momento causa efeitos negativos nas três linhagens
233 avaliadas.

234 A endogamia na geração filial pode ser explicada pelos valores obtidos na população inicial
235 (G_0), considerando que os valores de endogamia são acumulativos ao longo das gerações.
236 Rodriguez et al. (2013) observou valores positivos de F_{IS} que demonstram níveis baixos de
237 heterozigotos a partir da G_0 . O mesmo autor cita que o déficit encontrado pode estar associado
238 à condição genética das famílias que iniciaram o programa de melhoramento e ao tipo de
239 seleção e cruzamento utilizados. Este tipo de acúmulos indesejados podem ser minimizados
240 aumentando o número no tamanho efetivo da população, incluindo programas de cruzamentos
241 de famílias diversas para evitar o acasalamento de indivíduos com parentesco o que exige aos
242 produtores melhorar a organização dos estoques de reprodutores e incorporação de novas
243 famílias aos sistemas de produção e o cruzamento entre linhagens para produzir populações
244 híbridas (Romana-egua et al., 2005).

245 A estimativa da diferenciação genética F_{ST} foi utilizada para medir a distância genética entre
246 populações e para sua análise foi usada a metodologia de Wright (1978), na qual valores de
247 0,00 a 0,05 indicam baixos valores de F_{ST} ; de 0,051 a 0,15 moderado; de 0,151 a 0,25 alto e
248 $>0,25$ elevado. A divergência genética entre as variedades Premium Aquabel e Supreme
249 Tilapia foi moderada e menor quando comparada com os valores de F_{ST} para as linhagens
250 Premium Aquabel e Chitralada em ambas gerações (tabela 4). Quando se analisa o
251 comportamento das linhagens isolado por geração se observa que a divergência genética entre
252 a linhagem Supreme Tilapia e Chitralada diminuiu na geração filial com respeito à geração
253 inicial isto como resultado de uma homogeneização das linhagens por efeitos da seleção. Os
254 valores de F_{ST} sugerem que a proximidade entre a linhagem Premium Aquabel e Supreme

255 Tilápia, assim como entre a linhagem Chitralada e Supreme Tilápia podem ser explicados
256 pelo fato destas linhagens terem um componente comum durante a sua formação. Estes
257 valores do coeficiente de diferenciação populacional para o caso da linhagem Chitralada e
258 Supreme Tilápia se sustenta no fato da linhagem Supreme Tilápia aparecer sobre este nome
259 após o melhoramento genético da linhagem Chitralada realizado pela empresa GENOMAR
260 (Scorvo et al., 2010). Para os valores obtidos em relação as linhagens Premium Aquabel e
261 Supreme Tilápia não se tem disponibilizados dados da origem da linhagem Premium
262 Aquabel, mas os resultados indicam que estas duas linhagens compartilharam material
263 genético em algum ponto da sua formação. Existem outros fatores que podem levar à
264 proximidade genética entre duas populações. Segundo Petersen et al. (2012) baixos valores de
265 divergência genética em duas variedades de tilapia do Nilo, podem esta relacionados à
266 mistura acidental (mistura do material genético por más condições de estocagem) de uma
267 população com outra e a introdução de genes de outras linhagens há várias gerações e fixados
268 nos planteis de reprodutores (Melo et al., 2006).

269 Foram analisados os valores de F_{ST} para cada linhagem dentro de cada geração (tabela 5). Os
270 resultados do coeficiente de diferenciação populacional foram baixos ($F_{ST} < 0,05$)
271 demonstrando que a variação de uma linhagem com respeito a sua próxima geração foi pouca.
272 Este resultado indica que a metodologia de seleção não teve força suficiente para causar
273 alterações nas frequências alélicas de uma geração a outra e também entre linhagens. Outra
274 explicação é que, mesmo embora esteja sendo praticada a seleção, estes *loci* estão se
275 comportando como *loci* neutros.

276

277

278

Conclusão

1. Os resultados do estudo não evidenciaram efeitos negativos da seleção massal sobre a diversidade genética nas três linhagens de tilápia estudadas dentro da geração inicial e filial, porém novos estudos devem ser realizados com populações iniciais previamente analisadas para evitar efeitos acumulativos de endogamia.
2. A metodologia de melhoramento genético baseado na reprodução conjunta pode ser usada sempre que a variabilidade genética e índices de endogamia sejam confirmados na população inicial e seguintes através de marcadores moleculares.

Agradecimentos

À equipe do Laboratório de Engenharia Genética Animal pela ajuda e fornecimento das instalações que permitiram a análise molecular desta investigação; à empresa piscicultura Aquabel pelo provisionamento dos indivíduos utilizados neste trabalho; à coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior-CAPES, pelo apoio financeiro.

Referencias

BRÍÑEZ, B.; CARABALLO, X.; SALAZAR, M. Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellites genetic markers. **Revista MVZ córdoba**, V. 6, n. 2, 2011.

- 302 FESSEHAYE, Y.; EL-BIALY, Z.; REZK, M.A.; CROOIJMANS, R.; BOVENHUIS, H.;
303 KOMEN, H. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis*
304 niloticus) in breeding hapas: a microsatellite analysis, **Aquaculture**, v.256, p.148- 158, 2006.
305
- 306 FJALESTAD, K. T. Selection methods. In GJEDREM, T.; THODESEM, J. **Selection and**
307 **breeding programs in aquaculture**. Dordrecht: Springer, 2005. p 159-170.
308
- 309 GOUDET, J. FSTAT: a computer program to calculate F-statistics (Version 2.9.3.2.). **Journal**
310 **of Heredity**, v.86, p.485-486, 2002.
311
- 312 MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P.; TEIXEIRA, C.S.; SOUSA, A.B.;
313 COELHO, E.G.A.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A. Caracterização genética de seis
314 plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites.
315 **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.87-93, 2006.
316
- 317 MELO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; SEERIG, A.; CARVALHO, D. C. Aplicações práticas
318 de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia.
319 **Revista brasileira de reprodução animal**, v.32, n.4, p.220-224, 2008.
320
- 321 MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. Variabilidade
322 genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites.
323 **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.4, p.521-526, 2007.
324
- 325 NEI, M. F-statistics and Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of**
326 **human genetics**, v. 41, p. 225, 1977.

- 327 NOGUEIRA, A.; THALES, R. **Criação de tilápias em tanques-rede**. Salvador: SEBRAE
328 Bahia, 2007. p. 23. Apostila.
- 329
- 330 OLIVEIRA, S. N.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA, N. M.; CANDIOTO, F. B.; RESENDE, E. K.;
331 LEGAT, A. P. Análise genética de três gerações de tilápia do Nilo (linhagem GIFT)
332 utilizando o marcador RAPD. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 33, n. 2, p. 207-212,
333 2011.
- 334
- 335 PETERSEN, R. L.; GARCIA, J. E.; MELLO, G.; LIEDKE, A. M. R.; SINCERO, T. C. M.;
336 GRISARD, E. C. Análise da diversidade genética de tilápias cultivadas no estado de santa
337 Catarina (brasil) utilizando marcadores microssatélites. **Boletim do instituto de pesca**, v. 38,
338 n. 4, p. 313 – 321, 2012
- 339
- 340 RODRIGUEZ, M. D.P.; BARRERO, N. M. L.; VARGAS, L.; ALBUQUERQUE, D. M.;
341 GOES, E.S. R.; PRADO, O. P. P.; RIBEIRO, R. P. Caracterização genética de gerações de
342 tilápia Gift por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48,
343 n.10, p.1385-1393, 2013.
- 344
- 345 ROMANA-EGUIA, M.R.R.; IKEDA, M.; BASIAO, Z.U.; TANIGUCHI, N. Genetic changes
346 during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by
347 microsatellites. **Aquaculture Research**, v.36, p.69-78, 2005.
- 348
- 349 ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for
350 Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106, 2008.

351 SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature**
352 **Biotechnology**, v. 18. p. 233-234, 2000.

353

354 SCORVO, J. D. F.; FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; ALVES, J. M. C.; ALVES DE SOUZA,
355 F. R. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**,
356 v.39, p.112-118, 2010.

357

358 SONG, H. M.; BAI, J. J.; QUAN, Y. C.; LI, S. Identification and structure analysis of three
359 tilapia species using microsatellite markers. **Chinese Journal of Agricultural**
360 **Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 119-125, 2009.

361

362 SUKMANOMON, S.; SENANAN, W.; KAPUSCINSKI, A. R.; NAKORN, U. Genetic
363 Diversity of Feral Populations of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand and
364 Evidence of Genetic Introgression. **Kasetsart Journal: Natural Science**, v. 46, p. 200-216,
365 2012.

366

367 TENÓRIO, I. V.; SOARES, M. C. F.; LOPES, J. P. Desempenho comparativo em tanques-
368 rede de três linhagens da tilápia do Nilo – *Oreochromis niloticus*: comum, Chitralada e
369 mestiço. **Revista Biotemas**, v. 25, n.1, p. 65-72, 2012.

370

371 TRỌNG, T. Q.; BERS, N. V.; CROOIJMANS, R.; DIBBITS, B.; KOMEN, H. A comparison
372 of microsatellites and SNPs in parental assignment in the GIFT strain of Nile tilapia
373 (*Oreochromis niloticus*): The power of exclusion. **Aquaculture**, v. 388-391, p. 14-23, 2013.

- 374 TURRA, E.M.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, E.A.; LUZ, R. K.; PRADO, S.A.; MELO,
375 D.C.; SOUSA, A.B. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por
376 meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista brasileira de reprodução animal**,
377 v.34, n.1, p.21-28, 2010.
- 378
- 379 WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of population
380 Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.
- 381
- 382 WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: The University of
383 Chicago Press, 1978. v. 4.
- 384
- 385 YUE, G.H.; ORBAN, L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related
386 *Oreochromis* species. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.99-100, 2002.

Tabela 1. Loci microssatélites de tilápia do nilo, *primers* e acesso no GenBank. Sublinhado a cauda M13 adicionada aos *primers* para cada *locus*.

Locus	GenBank	Motivo	Primers sequência 5' - 3'
UNH160	G12312	(CA) ₃₅	F - ATTTAGCCATTGGCTCTTACATCT R - <u>TGTA</u> AAAACGACGGCCAGTATTTCTGTAGTTATGGCTGCCTG
UNH178	G12330	(CA) ₂₁	F - <u>TGTA</u> AAAACGACGGCCAGTCCGTCACACCTCCATCATC R - CAGTTGTTGGTCGTGTAAGTGA
UNH222	G12373	(CA) ₁₇	F - <u>TGTA</u> AAAACGACGGCCAGTCCATCTCTCTCTCTAGCACACG R - CAAAAGGCTGATGTGTGTGGTC
ISP-MS01	AF038123	(CA) ₁₇	F - <u>TGTA</u> AAAACGACGGCCAGTTGAGCTGAGCAGATGGAGCAGAAG R - ATGAACAGCCCTGTGAAGAGATGG
PRL-MS01	X92380	(TG) ₁₃	F - AGACGAAACCAACAAGGATCA R - <u>TGTA</u> AAAACGACGGCCAGTACCTTGCTCGTCACACCTG
PRL-MS02	X92380	(CA) ₃₄	F - <u>TGTA</u> AAAACGACGGCCAGTTCGTGTCTTGTGGGAAACC R - GAGGGGCTTTGAATGGATGC

Tabela 2. Marcadores moleculares, tamanho em pares de bases (pb), número de alelos (Na), alelos mais frequentes e frequência alélica (entre parêntese), número de alelos por linhagem dentro de geração, número de alelos privativos por *locus* (entre parêntesis) nas linhagens Supreme tilapia, Premium Aquabel e Chitralada.

Locus	Tamanho dos alelos (pb)	Na	Alelos mais frequentes	Supreme Tilápia		Premium Aquabel		Chitralada	
				Geração inicial	Geração Filial	Geração inicial	Geração Filial	Geração inicial	Geração Filial
UNH160	190 - 214	10	194(0,86)	7(1)	8(1)	4(0)	5(0)	7(2)	8(2)
UNH178	136 - 158	12	142(0,59)	10(2)	8(0)	7(1)	8(1)	8(2)	8(1)
UNH222	159 - 175	7	175(0,80)	2(0)	4(0)	3(0)	4(0)	6(3)	6(3)
ISP-MS01	224 - 242	8	232(0,65)	6(0)	5(0)	6(1)	6(2)	6(1)	6(1)
PRL-MS01	342 - 382	11	364(0,86)	2(0)	4(2)	5(1)	5(1)	7(3)	8(4)
PRL-MS02	244 - 276	13	270(0,67)	2(0)	4(0)	6(1)	7(3)	9(5)	10(5)
Média				4,83	5,50	5,16	5,8	7,2	7,6

Tabela 3. Heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) nas gerações inicial (G_0) e filial (F_1) de tilápia do nilo, das linhagens Supreme Tilápia (SP), Premium Aquabel (PA) e Chitralada (CHI). Pvalue do Equilíbrio de Hardy Weinberg.

		G_0			F_1		
		SP	PA	CHI	SP	PA	CHI
UNH160	H_o	0,177	0,094	0,128	0,175	0,118	0,152
	H_e	0,750	0,260	0,746	0,758	0,272	0,792
	F_{IS}	0,765	0,640	0,828	0,769	0,568	0,808
	P value	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
UNH178	H_o	0,288	0,433	0,509	0,298	0,436	0,516
	H_e	0,620	0,626	0,776	0,676	0,650	0,759
	F_{IS}	0,535	0,308	0,345	0,559	0,330	0,320
	P value	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
UNH222	H_o	0,000	0,000	0,259	0,000	0,000	0,214
	H_e	0,356	0,379	0,660	0,691	0,463	0,605
	F_{IS}	1,000	1,000	0,607	1,000	1,000	0,646
	P value	0,009**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
ISP-MS01	H_o	0,080	0,025	0,179	0,074	0,053	0,177
	H_e	0,733	0,762	0,541	0,713	0,634	0,604
	F_{IS}	0,891	0,967	0,670	0,896	0,917	0,708
	P value	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
PRL-MS01	H_o	0,000	0,000	0,226	0,000	0,000	0,255
	H_e	0,290	0,549	0,566	0,267	0,405	0,449
	F_{IS}	1,000	1,000	0,600	1,000	1,000	0,432
	P value	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,006**
PRL-MS02	H_o	0,000	0,053	0,158	0,000	0,053	0,105
	H_e	0,667	0,623	0,847	0,700	0,734	0,890
	F_{IS}	1,000	0,916	0,814	1,000	0,928	0,882
	P value	0,200 ^{ns}	0,000**	0,000**	0,016**	0,000**	0,000**
Média dos grupos	H_o	0,161	0,162	0,265	0,155	0,176	0,269
	H_e	0,660	0,556	0,668	0,635	0,544	0,666
	F_{IS}	0,7309	0,7097	0,6037	0,756	0,676	0,597
	P value	0,003**	0,003**	0,003**	0,003**	0,003**	0,003**

Nível de significância 99% (Pvalue < 0,01)

Tabela 4. Análise da diferenciação populacional F_{ST} entre as linhagens Supreme Tilapia, Premium Aquabel e Chitralada dentro de cada geração

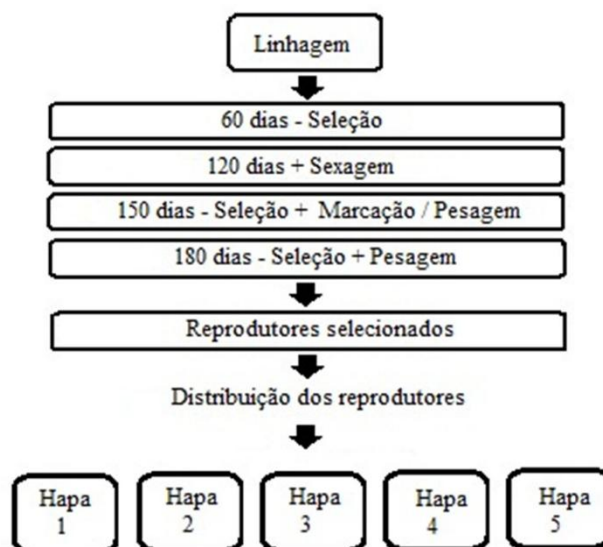
Diferenciação populacional entre linhagens da geração Inicial		
Linhagem	Supreme	Premium Aquabel
Premium Aquabel	0.1029	-
Chitralada	0.1213	0.1661
Diferenciação populacional entre linhagens da geração filial		
Linhagem	Supreme	Premium Aquabel
Premium Aquabel	0.1132	-
Chitralada	0.1004	0.1538

- valores inexistentes

Tabela 5. Análise da diferenciação população (F_{ST}) das linhagens Supreme Tilápia, Premium Aquabel e Chitralada dentro da geração inicial (G_0) e filial (F_1)

Linhagem / Geração	Linhagem / F_1
Supreme Tilápia / G_0	0,0128
Premium Aquabel / G_0	0,0259
Chitralada / G_0	0,0052

Figura 1. Processo de seleção das linhagens Supreme Tilápia, Premium Aquabel e Chitralada



6. Conclusão

Os resultados do estudo evidenciaram que as variações genéticas das populações é acumulativa e pode interferir negativamente nas gerações seguintes. Os efeitos da seleção massal sobre as frequências alélicas e variáveis da genética de populações não foi evidente, porém novos estudos devem ser realizados com populações iniciais previamente analisadas para evitar efeitos acumulativos de endogamia. A metodologia de melhoramento genético baseado na reprodução conjunta (desovas coletivas) pode ser usada sempre que a variabilidade genética e índices de endogamia sejam confirmados na população de reprodutores inicial, caso contrário nenhuma metodologia será exitosa. O monitoramento constante através de marcadores poderá ser utilizado como ferramenta para orientar os grupos de acasalamentos e evitar o acúmulo de consanguinidade ao longo das gerações.

7. Referencias

ALMEIDA, D. B.; PALDEˆS DA COSTA, M. A.; BASSINI, L. N.; MOREIRA, C. G. A.; NUNES, M. D. R.; PEREZ. H.J.G.; TAVARES, R. A.; VARELA, A, S.; MOREIRA. H. L. M. Reproductive performance in female strains of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture International**, p 1-10. 2013.

ANDERSEN, I; HAYES, B. Population Genetics. In GJEDREM, T.; THODESEM, J. **Selection and breeding programs in aquaculture**. 2005. p 23-33.

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, v. 70, p. 117–123, 1994.

BARNES, M. R. Genetic Variation Analysis for Biomedical Researchers: A Primer. In: BARNES. M. R.; BREEN. G. **Genetic Variation Methods and Protocols**. New York: Springer, 2010. p. 1-21.

BEAUMONT, A.; BOUDRY, P.; HOARE, K. **Biotechnology and genetics in fisheries and Aquaculture**. Oxford: John Wiley & Sons. 222 p.

BENTSEN, H.B.; OLESEN, I. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. **Aquaculture**, v. 204, p. 349-359, 2002.

BONISLAWSKA, M.; FORMICKI, K.; KORZELECKA-ORKISZ, A.; WINNICKI, A. Fish egg size variability: biological significance. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 4, n. 2, p. 1-15, 2001.

BORGES, A. M.; MORETTI, J. O. C.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A.S. Produçˆo de populaçˆes monossexo macho de tilˆpia-do-nilo da linhagem Chitralada. **Pesquisa agropecuˆria brasileira**, v.40, n.2, p.153-159, 2005.

BRASIL, Ministério da pesca e aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília, 2011. 60 p.

BRASIL, Ministério da pesca e aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília, 2012. 129 p.

BRASIL, Ministério da pesca e aquicultura. **Censo Aquícola Nacional. Ano 2008**. Brasília, 2013. 336 p.

BRIÑEZ, B.; CARABALLO, X.; SALAZAR, M. Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellites genetic markers. **Revista MVZ Córdoba**, v. 6, n. 2, 2011.

CARLSSON, J. Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. **Journal of Heredity**, v. 6, n. 99, p. 616-623, 2008.

COLEMAN, R. M.; GALVANI, A. P. Egg size determines offspring size in neotropical cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae). **American Society of Ichthyologists and Herpetologists**, v. 1, p. 209-213, 1998.

DA COSTA, R. B.; RESENDE, M. D. V.; DE ARAUJO, A. J.; GONÇALVES, P. S.; BORTOLLETO, N. Seleção combinada univariada e multivariada aplicada ao melhoramento genético da seringueira. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 35, n. 2, p. 381-388, 2000.

DOS SANTOS, V. B; FIRETTI, R; SALES, D. S. As Tilápias não todas são iguais. **Instituto FNP. ANUALPEC**, n.11, p. 284-286. 2006.

EARTH POLICY INSTITUTE. **Farmed Fish Production Overtakes Beef**. Disponível em: <http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2013/update114>. Acessado em: 2013

EGUIARTE, L. E.; PLANTER, E. A.; SCHEINVAR, E.; GONZÁLEZ, A. G.; SOUZA, V. **Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicana**, 2010. Disponível em: <<http://www.ecotips.com.mx/Bioconservacion/EguarteFlujogeneti.co.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2013.

EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia Culture**. Wallingford: CABI Publishing, 2006. 293p.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p. 47-50, 2005.

FESSEHAYE, Y.; EL-BIALY, Z.; REZK, M.A.; CROOIJMANS, R.; BOVENHUIS, H.; KOMEN, H. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. **Aquaculture**, v.256, p.148- 158, 2006.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21 century. In: FITZSIMMONS, K.; CARVALHO FILHO, J. **Proceedings from the fifth international symposium on tilapia aquaculture**. Rio de Janeiro: Panorama da aquicultura Magazine, 2000. p.3-8.

FJALESTAD, K. T. Selection methods. In GJEDREM, T.; THODESEM, J. **Selection and breeding programs in aquaculture**. 2005. p 159-170.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Culture Aquatic species information programme: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en>. Acesso em: 2014.

GISBERT, E.; WILLIOT, P.; CASTELLÓ-ORVAY, F. Influence of egg size on growth and survival of early stages of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) under small-scale hatchery conditions. **Aquaculture**, v. 183, p. 83-94, 2000.

GJEDREM, Trygve. **Selection and Breeding Programs in Aquaculture**. Norway: Springer, 2005. 361p.

GJEDREM, T.; BARANSKI, M. Selection Methods. In: GJEDREM, T.; BARANSKI, M. **Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction. Reviews: Methods and Technologies in Fish Biology and Fisheries**. 2009. p 93-1013.

GJEDREM, T.; BARANSKI, M. Structure of breeding programs. In: GJEDREM, T.; BARANSKI, M. **Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction. Reviews: Methods and Technologies in Fish Biology and Fisheries**, 2009. p. 131-141.

GOUDET, J. FSTAT: a computer program to calculate F-statistics (Version 2.9.3.2.). **Journal of Heredity**, v.86, p.485-486, 2002.

GUNASEKERA, R. M.; SHIM, K. F.; LAM, T. J. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 146, p. 121-134, 1996.

HILSDORF, A.W.S.; DERGAM, J.A. Depressão por endogamia: somente uma terminologia genética ou um fato na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, v.9, p.34-36, 1999.

ITALIA. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. **EL ESTADO MUNDIAL DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA**. Roma, 2012. 251 p.

ITALIA. Organização das nações unidas para agricultura e alimentação. **FAO NO Brasil, Memoria de cooperação técnica**. Toscana, 2010. 43 p.

KJORSVIK, E.; MANGOR-JENSEN A.; HOLMEFJORD I. Egg quality in fishes. **Advances in Marine Biology**, v. 26, p. 71-113, 1990.

KUBITZA, F. Tilápia: Um bom planejamento gera alta rentabilidade. **Panorama da aquicultura**, v. 10, n. 59, p.43-53, 2000.

KUBITZA, F. Panorama da Piscicultura no Brasil Estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. **Panorama da aquicultura**, v. 22, n. 132, p.14-25, 2012.

LUPCHINSKI, E.; VARGAS, L.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; MANGOLIN, C. A.; BARRERO, N. M. L. Avaliação da variabilidade das gerações G0 e F1 da linhagem GIFT de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 2, p. 233-240, 2008.

MASSAGO, H.; RIBEIRO, R. P.; BARRERO, N. M. L.; POVH, J. A.; CASTAGNOLLI, N.; GOMES, P. C. DIVERSIDADE GENÉTICA DE QUATRO LINHAGENS DE *Oreochromis niloticus* UTILIZANDO O MARCADOR RAPD. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 4, p. 150-159, 2009.

MASSAGO, H.; CASTAGNOLLI, N.; MALHEIROS, E. B.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; DOS SANTOS, M. A.; RIBEIRO, R. P. Crescimento de quatro linhagens de tilápia *Oreochromis niloticus*. **Ciências Agrárias e Ambientais**, v.8, n. 4, p. 397-403, 2010.

MCMANUS, C.; PAIVA, S.; CORRÊA, P. S.; SEIXAS, L.; MELO, C. B. **Estatísticas para descrever genética de populações**. Brasília: Informação Genético-Sanitária da pecuária Brasileira Distrito Federal, 2011. p. 50. Apostila

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P.; TEIXEIRA, C.S.; SOUSA, A.B.; COELHO, E.G.A.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.87-93, 2006.

MELO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; SEERIG, A.; CARVALHO, D. C. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.4, p.220-224, 2008.

MENEZES, M. P. C. Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, ibéricas e canárias. **Revista Científica de Produção Animal**, v.7, n. 1, 2005.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microsatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.4, p.521-526, 2007.

MOREIRA, H. L. M.; HILSDORF, A. W.S.; PEREZ, H.J.G.; FREITAS, R. T. F. Seleção genética de caracteres qualitativos e quantitativos. **Panorama da aquicultura**, v. 23, n. 139, p. 47-53, 2013.

MUNIZ, J. A.; CAMARGO, M. S.; FERREIRA, D. F.; VEIGA, R. D. Métodos de estimação do coeficiente de endogamia em uma população diploide com alelos múltiplos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 93-102, 2008.

NEGREIROS, J. R. S. **Seleção combinada, massal e entre e dentro, análise de trilha e repetibilidade em progênies de meios-irmãos de maracujazeiro (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em ciências). Programa de pós graduação em genética e melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

NEI, M. F-statistics and Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annual of Human Genetics**, v. 41, p. 225, 1977.

NOGUEIRA, A.; THALES, R. **Criação de tilápias em tanques-rede**. Salvador: SEBRAE Bahia, 2007. p. 23. Apostila.

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

OLIVEIRA, E. G.; SANTOS, F, J. S.; PEREIRA, A, M, L.; LIMA, C, B. **Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria**. Teresina: EMBRAPA PiauÍ, 2007. p. 12. Apostila

OLIVEIRA, S. N.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA, N. M.; CANDIOTO, F. B.; RESENDE, E. K.; LEGAT, A. P. Análise genética de três gerações de tilápia do Nilo (linhagem GIFT) utilizando o marcador RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n. 2, p. 207-212, 2011.

PETERSEN, R. L.; GARCIA, J. E.; MELLO, G.; LIEDKE, A. M. R.; SINCERO, T. C. M.; GRISARD, E. C. Análise da diversidade genética de tilápias cultivadas no estado de Santa Catarina (brasil) utilizando marcadores microssatélites. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, n. 4, p. 313 – 321, 2012

PEREIRA, A, B.; ALMEIDA, N, F. **Genética, Biotecnologia E Agricultura**. Lisboa: Principia, Publicações Universitárias e Científicas. 2005. 1-96 p.

PITCHER, T. E.; MAYS, H.L. An introduction to genetic quality in the context of sexual selection. **Genetica**, v. 134, p. 1-4, 2008.

PONZONI, R, W. Genetic improvement and effective dissemination: Keys to prosperous and sustainable industries aquaculture. In: ACOSTA, B. O; PONNIAH, A. G. P. **Development of Aquatic Animal Genetic Improvement and Dissemination Programs: Current: Status and Action Plans**. 2006. p. 1-6.

PONZONI R W.; KHAW H. L.; NGUYEN, H. N.; HAMZAH. A. Inbreeding and effective population size in the Malaysian nucleus of the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 302, p. 42-48, 2010.

RESENDE, E.K.; RIBEIRO, R.P.; LEGAT, A.P.; BENITES, C. Genetic improvement in fish-an aquacultural revolution in Brazil. Boletim SBI, **Sociedade Brasileira de Ictiologia**, v.12, p.5-6, 2009.

RITLAND, K. Estimator for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. **Genetics research**, vol. 67, p. 175-185, 1996.

RODRIGUEZ, M. D.P.; BARRERO, N. M. L.; VARGAS, L.; ALBUQUERQUE, D. M.; GOES, E.S. R.; PRADO, O. P. P.; RIBEIRO, R. P. Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microsatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48, n.10, p.1385-1393, 2013.

ROMANA-EGUIA, M.R.R.; IKEDA, M.; BASIAO, Z.U.; TANIGUCHI, N. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. **Aquaculture Research**, v.36, p.69-78, 2005.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106, 2008.

SCORVO, J. D.; SCORVO, C. M. D. F.; ALVES, J. M. C.; SOUZA, F. R. A. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.112-118, 2010.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18. p 2, 2000.

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. **Revista Árvore**, v.29, n.1, p.1-7, 2005.

STICKNEY, R.R. Status of research on tilápia In: COSTA–PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. **Tilapia aquaculture in the America**. Louisiana: World Aquaculture Society, 2000. p.21-33.

SONG, H. M.; BAI, J. J.; QUAN, Y. C.; LI, S. Identification and structure analysis of three tilapia species using microsatellite markers. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 119-125, 2009.

SUKMANOMON, S.; SENANAN, W.; KAPUSCINSKI, A. R.; NAKORN, U. Genetic Diversity of Feral Populations of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand and Evidence of Genetic Introgression. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, v. 46, p. 200-216, 2012.

TENÓRIO, I. V.; SOARES, M. C. F.; LOPES, J. P. Desempenho comparativo em tanques-rede de três linhagens da tilápia do Nilo – *Oreochromis niloticus*: comum, chitralada e mestiço. **Revista Biotemas**, v. 25, n.1, p. 65-72, 2012.

TRỌNG, T. Q.; BERS, N. V.; CROOIJMANS, R.; DIBBITS, B.; KOMEN, H. A comparison of microsatellites and SNPs in parental assignment in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): The power of exclusion. **Aquaculture**, v. 388-391, p. 14-23, 2013.

TSANG, H. S.; QUINTANILLA, M. **Manual sobre reproducción y cultivo de Tilapia**. Salvador: CENDEPESCA, 2008. 68 p.

TURRA, E.M.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, E.A.; LUZ, R. K.; PRADO, S.A.; MELO, D.C.; SOUSA, A.B. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.1, p.21-28, 2010.

TURRA, E.M.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, E.A.; PRADO, S.A.; MELO, D.C.; SOUSA, A.B. Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Rev. Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.1, p.29-36, 2010.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; DANILE DE LIRA, A.; ROCHA DE ALMEIDA, T.; SANTOS, G. B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.

WAHLUND, Sten. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. **Hereditas**, v. 11, n. 1, p. 65-106, 1928.

WALLACE J. C.; AASJORD, D. An investigation of the consequences of egg size for the culture of Arctic char, *Salvelinus alpinus* L. **Journal Fish Biology**, v. 24, p. 427-435, 1984.

WALMSLEY, Sandra. Identificação de estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de marcadores moleculares. 2004. 113f.

Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of population Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of population**: variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 590p.

YAÑEZ, J.M; MARTINES, A; ARO, L; CABREJOS, M. Aplicación de herramientas moleculares en el mejoramiento genético de peces cultivos: Evaluación de la condición genética de reproductores. **Revista versión diferente**, v. 16, p. 48 – 51, 2012.

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