

Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites

[Genetic characterization of six commercial stocks of tilapia (*Oreochromis spp*) using microsatellite markers]

D.C. Melo¹, D.A.A., Oliveira^{1*}, L.P. Ribeiro¹, C.S., Teixeira¹, A.B. Sousa²,
E.G.A. Coelho¹, D.V. Crepaldi¹, E.A. Teixeira¹

¹Escola de Veterinária - UFMG
Caixa Postal 567

30123-970 - Belo Horizonte, MG

²Colégio Técnico - UFMG - Belo Horizonte, MG

RESUMO

Foram caracterizados geneticamente, utilizando-se cinco locos de microssatélites, 235 indivíduos de seis plantéis de tilápia (Ceará, Chitralada, Israel, Nilótica, Taiwan e Vermelha) da região Sudeste do Brasil. Verificou-se diferença genética entre os seis plantéis, obtida pelo cálculo do índice de fixação de alelos ($F_{st}=0,3263$). De modo geral, está ocorrendo perda de heterozigose nos plantéis, segundo mostrou a estimativa do coeficiente de endogamia intrapopulacional ($F_{is}=0,0486$). Os plantéis Israel e Nilótica foram os mais semelhantes geneticamente ($I_g=0,6663$). Os plantéis Chitralada e Taiwan foram os que menos apresentaram genes em comum ($I_g=0,2463$). O plantel denominado Vermelha foi o mais distinto entre todos.

Palavras-chave: tilápia, microssatélite, distância genética.

ABSTRACT

Two hundred and thirty five individuals from six commercial stocks of tilapias (Ceará, Chitralada, Israel, Nilótica, Taiwan and Red) from the Southeastern region of the country were genetically characterized using five microsatellite loci. The results suggest large genetic difference among the stocks, estimated through the fixation allele index ($F_{st} = 0.3263$), and a considerable loss of heterozygosity occurs in most of the stocks, according to the population inbreeding coefficient ($F_{is}=0.0486$). The Israel and Nilótica stocks were genetically similar ($I_g=0.6663$), while Chitralada and Taiwan showed less genes in common ($I_g=0.2463$). The Red stock was the most distinct stock.

Keywords: tilapia, microsatellite, genetic distance

INTRODUÇÃO

Tilápia é o nome comum de aproximadamente 70 espécies de peixes taxonomicamente classificadas, da família Cichlidae, nativas da África tropical (Fitzsimmons, 2000; Hilsdorf, 2002). Essas espécies estão sendo criadas em vários países dos hemisférios norte, sul e especialmente no Oriente Médio e Ásia. No Brasil, a tilápia vem sendo criada há mais de quatro décadas, no entanto, a criação intensiva

em tanques teve início somente a partir de 1990 (Silva e Chammas, 1997). Dentre as espécies de tilápias, apenas quatro conquistaram destaque na aquicultura mundial: a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia azul de Moçambique (*Oreochromis aureus*), a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) e a tilápia de Zamzibar (*Oreochromis hornorum*). A essas espécies somam-se as suas variantes e híbridos, genericamente chamados de tilápias vermelhas (Lovshin, 1998). Atualmente, as

Recebido em 23 de abril de 2004.

Aceito em 9 de janeiro de 2006.

*Autor para correspondência (*correspondig author*)

E-mail: denise@vet.ufmg.br

tilápias são os peixes de cultivo mais importantes das regiões tropicais no mundo. São rústicos, de crescimento rápido, não requerem tecnologia sofisticada, possuem alta prolificidade, aceitam uma grande variedade de alimentos, e têm boa conversão alimentar, são resistentes a muitas doenças e desovam durante todo o ano, além de possuírem excelente sabor e textura. Sua importância como fonte de proteína animal nos países subdesenvolvidos é amplamente reconhecida (McConnell et al., 2000).

Na tentativa de identificação das espécies e subespécies de tilápias, características como hábito reprodutivo e alimentar, desenvolvimento e características morfológicas têm sido muito utilizadas. No entanto, tais caracteres têm valor restrito, devido à grande variação intrapopulacional e diferenças sutis entre plantéis (Bardakci e Skibinski, 1994). Marcadores moleculares têm permitido identificar espécies, independente do estágio de vida do animal (Fergunson, 1995). Essa avaliação é de extrema importância, pois a variabilidade genética é fundamental para a implantação de programas de criação seletiva comercial, que tenham como objetivo a produção de peixes de crescimento rápido, com melhores índices de conversão alimentar e resistentes a doenças.

Este trabalho teve como objetivos caracterizar geneticamente plantéis de tilápias criadas no sudeste do Brasil com o auxílio de marcadores microssatélites e gerar informações que possam ser empregadas em programas de melhoramento genético da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 235 peixes, de seis plantéis comerciais. Três plantéis (Ceará, Taiwan e Chitralada) foram provenientes da fazenda Água Fria, localizada em Esmeraldas-MG, dois (Nilótica e Vermelha) foram provenientes de criatório em Jundiá-SP, e um plantel (Israel) oriundo de fazenda no município de Paraíba do Sul-RJ. Os peixes foram escolhidos aleatoriamente, não importando o sexo dos mesmos. Os exemplares dos cinco primeiros plantéis foram transportados vivos para laboratório de genética da Escola de Veterinária da UFMG, onde foram colhidas as amostras de sangue, de fígado e da nadadeira caudal. As amostras dos peixes do plantel Israel foram

colhidas na própria fazenda. As de fígado e da nadadeira caudal foram conservadas em álcool absoluto e mantidas em freezer até serem processadas. As amostras de sangue, obtidas por punção cardíaca, foram conservadas em EDTA à temperatura de 4°C.

A extração de DNA dos tecidos foi feita utilizando-se o kit de extração EZ DNA¹, segundo instruções do fabricante. Depois de extraído, o DNA foi armazenado em microtubos e conservado a 4°C. As amostras de DNA foram quantificadas utilizando espectrofotômetro UV.

Para as reações de PCR, utilizaram-se: tampão PCR 10×, dNTPs 0,2mM, primers 0,2mM, 5,0U de Taq polimerase, 1,5mM de MgCl₂, DNA genômico e H₂O Milli-Q q.s.p 10µl. As amplificações foram realizadas em termociclador². O programa de amplificação padronizado consistiu das seguintes etapas: um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto à temperatura de ligação específica para cada primer de microssatélite (UNH 104 = 52°C, UNH 108 = 50,2 °C, UNH 136 = 52,4°C, UNH 160 = 50°C, UNH 169 = 50,5°C), um minuto a 72°C e o último ciclo de extensão a 72°C por cinco minutos. O material amplificado foi mantido a 4°C até a realização das análises.

Foram utilizados os seguintes primers: UNH 104 - GenBank G12257, UNH 108 - GenBank G12261, UNH 136 - GenBank G12288, UNH 160 - GenBank G12312 e UNH 169 - GenBank G12321.

Realizou-se eletroforese, em gel de poli(acrilamida a 8%, do material amplificado. Utilizaram-se 10µl de cada amostra, acrescidos de 2µl de tampão de corrida. O padrão de peso molecular p-GEM G1741³ foi incluído em cada gel. A corrida foi realizada por duas horas a 120 volts. Após a eletroforese, os géis foram corados pelo método do nitrato de prata e fotografados com câmera digital. Para análise semi-automática das bandas observadas nos géis, utilizou-se o programa Image Master - Totallab⁴ versão 1.0.

¹ Biological Industries, USA.

² MJ Research (PTC - 100™), USA

³ Promega, Madison, USA

⁴ Pharmacia, USA

Caracterização genética...

O coeficiente de endogamia dos plantéis (Fis), o coeficiente de endogamia entre os plantéis ou índice de fixação de alelos (Fst), o número de alelos observados (N), as frequências alélicas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados utilizando o programa Genepop web v. 3.1⁵. Para calcular a heterozigose observada e esperada, a distância e a identidade genética entre os plantéis e construir o dendrograma (método: UPGMA; modificado de NEIGHBOR, procedimento de PHYLIP versão 3.5) foi utilizado o programa PopGene 1,31 (Yeh et al., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trinta e nove alelos diferentes foram encontrados para os cinco locos de microssatélites (Tab. 1). Ao analisar os plantéis em conjunto, considerando-se os cinco locos, podê-se observar que esses foram diferentes entre si. Não houve diferença genética entre os plantéis, quando analisados dois a dois. Esses resultados mostram que os locos escolhidos foram informativos para diferenciar os plantéis.

Tabela 2. Número de peixes analisados (N), médias de heterozigidade observada (Hto) e heterozigidade esperada (Hte) em plantéis de tilápias da região Sudeste do Brasil

Plantéis	N	Hto	Hte	Fis (total)*
Ceará	40	0,3850	0,4162	0,1171
Chitralada	40	0,6200	0,6770	0,1577
Israel	40	0,8150	0,6158	-0,3448
Nilótica	40	0,5150	0,5416	0,094
Taiwan	40	0,7350	0,6932	-0,06144
Vermelha	35	0,5950	0,6708	0,2539

*Valor negativo = perda de homozigose (Weir e Cockerham, 1984)

Espécies de importância comercial requerem rigoroso manejo da exploração em relação à sua estrutura de populações. Existe evidência crescente de que muitos estoques baseados em larvicultura (Relly et al., 1999) e outros estoques estabelecidos para aumento de populações naturais (Tessier et al., 1995) foram modificados em sua estrutura e composição gênica e têm se tornado endocruzados, seja pelas práticas de larvicultura, seja pela seleção intencional. O caso de seleção intencional pode ser evidenciado no plantel Ceará, que foi fortemente selecionado

Tabela 1. Número, tamanho em pares de bases (pb) e alelos mais frequentes em seis plantéis de tilápias da região Sudeste do Brasil

Locos ¹	Nº de alelo/loco	Tamanho dos alelos (pb)	Alelos mais frequentes
UNH 104	9	121-215	145
UNH 108	6	121-165	135
UNH 136	7	148-200	164
UNH 160	11	131-233	181
UNH 169	6	122-190	130

¹Locos microssatélites

As médias estimadas de heterozigidade e homozigidade observadas e esperadas (Tab. 2) indicaram a ocorrência de endogamia nos plantéis Ceará, Chitralada, Nilótica e Vermelha o que não ocorreu nos plantéis Israel e Taiwan. No entanto, quando foram estimados o coeficiente de endogamia intrapopulacional (Fis) e o coeficiente de endogamia interpopulacional ou índice de fixação de alelos (Fst), o que foi feito para o conjunto dos plantéis, verificou-se que, de modo geral, a endogamia é alta dentro dos plantéis (Fis= 0,0486).

para coloração vermelha. Quando os peixes chegaram à Fazenda Água Fria, eram de coloração vermelha amarelada, alaranjada e cinza manchado. Atualmente, a coloração dos peixes é rosa claro, quase branca. O endocruzamento originado pelas práticas de larvicultura foi evidenciado nos plantéis Chitralada, Nilótica e Vermelha, pois os alevinos destinados à engorda eram produtos do acasalamento de pais aparentados, mantidos em um estoque existente no próprio criatório.

⁵ (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>)

A tendência de diminuição de variabilidade genética nos plantéis, mostrada pelos níveis de heterozigosidade e coeficiente de endogamia pode estar ocorrendo devido ao desbalanço no número de machos e fêmeas usados para reprodução, ou seja, poucos casais na obtenção de alevinos, também constatada por Norris et al. (1999) ao estudar o salmão do Atlântico. Isso pode ocorrer quando não há controle dos grupos de acasalamento nesses estoques, impedindo o acasalamento entre parentes. Outro agravante, para esta situação, é que não há troca de reprodutores entre as larviculturas para quebrar o ciclo de consangüinidade. Isso pode causar, a médio prazo, efeitos adicionais, tais como reduzir a capacidade que um estoque possui para se adaptar a diferentes condições ambientais como também causar a depressão por endogamia, o que limitaria, substancialmente, o potencial de ganho genético em futuros trabalhos de seleção e melhoramento. O aumento no número de alelos recessivos produz uma tendência geral de diminuir a viabilidade, a sobrevivência, o crescimento e a produção em geral, além de incrementar a taxa de anormalidades (Moreira, 1999). Assim, a escolha dos reprodutores a serem usados na formação do estoque é um ponto muito importante, pois determinará o conjunto gênico total disponível para a larvicultura, bem como o seu futuro potencial biológico. É desejável que a população fornecedora de reprodutores para a larvicultura ofereça variabilidade genética. Isso é importante, pois a existência dessa variabilidade é a condição essencial para o melhoramento genético de qualquer organismo. Além disso, o reconhecimento da variabilidade existente entre e dentro de populações influenciará as estratégias a serem empregadas nos programas de seleção e

desenvolvimento de linhagens (Chalmers et al., 1992 citado por Moreira, 1999).

Os plantéis Taiwan e Israel apresentaram os menores índices de endogamia, provavelmente devido à introdução de exemplares de outros plantéis. Houve um escape de peixes do plantel Ceará, na fazenda onde são criados, e esses foram misturados aos do grupo Taiwan. No plantel Israel, foram introduzidos exemplares híbridos Israel-Goiânia.

Os dados obtidos mostraram que os marcadores microssatélites podem ser utilizados para indicar aos criadores a ocorrência de redução da diversidade genética devido ao emprego de um pequeno número de pais, por meio da comparação dos níveis de variabilidade entre o material original e o derivado. Esses marcadores podem auxiliar na identificação dos estoques mais divergentes geneticamente, de forma a maximizar a recuperação da variabilidade genética via cruzamento, bem como para monitorar os níveis de endocruzamentos nos plantéis. Entretanto, nos casos em que a utilização de marcadores moleculares não for possível, a manutenção de registros e a utilização de algumas práticas de criação como: rodízio de reprodutores, igual proporção de sexos, renovação de reprodutores em períodos regulares permitiriam a conservação dos níveis de variabilidade genética existentes.

Os valores estimados de identidade genética (I_g) e de distância genética (D_g) entre os plantéis são mostrados na Tab. 3. Esses valores indicaram que os plantéis Israel e Nilótica eram os mais semelhantes geneticamente ($I_g=0,6663$), enquanto os plantéis Chitralada e Taiwan eram os mais divergentes ($I_g=0,2463$).

Tabela 3. Identidade genética (I_g) e distância genética (D_g) em plantéis de tilápias da região Sudeste do Brasil

Plantéis	Ceará	Chitralada	Israel	Nilótica	Taiwan	Vermelha
Ceará	****	0,5353	0,3769	0,3795	0,3421	0,3023
Chitralada	0,6249	****	0,5286	0,3180	0,2463	0,3245
Israel	0,9757	0,6376	****	0,6663	0,4709	0,2553
Nilótica	0,9689	1,1458	0,4060	****	0,5255	0,2700
Taiwan	1,0725	1,4013	0,7530	0,6434	****	0,4293
Vermelha	1,1964	1,1255	1,3651	1,3094	0,8456	****

Identidade genética =valores acima da diagonal, distância genética =valores abaixo da diagonal

Caracterização genética...

Os dados obtidos neste estudo permitiram a confecção de um dendrograma (Fig. 1), baseado no cálculo da distância genética de Nei (1978). O

plantel Vermelha foi identificado como o mais distante dos demais.

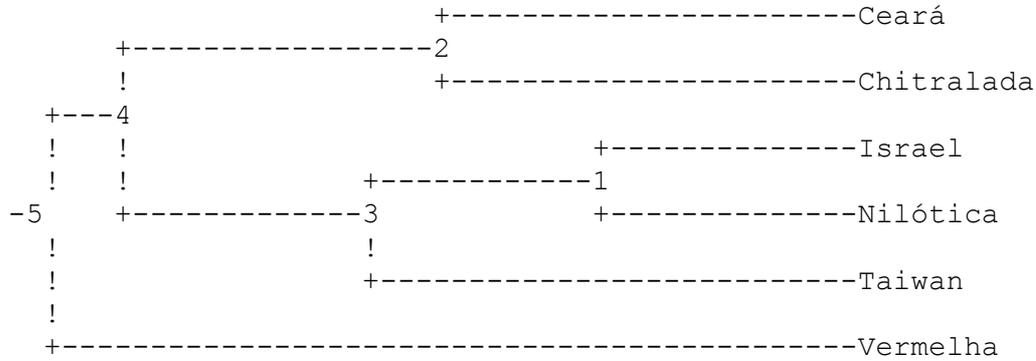


Figura 1. Distâncias genéticas entre plantéis de tilápias da região Sudeste do Brasil

Segundo Lovshin (2000), há relatos de três cruzamentos conhecidos que deram origem a híbridos de tilápia vermelha: o primeiro entre uma fêmea mutante laranja-avermelhada de *Oreochromis mossambicus* e um macho normal (cinza) de *Oreochromis niloticus*, o segundo entre uma fêmea normal (cinza) de *Oreochromis hornorum* e um macho de *Oreochromis mossambicus* dourado-avermelhado e o terceiro entre *Oreochromis niloticus* vermelha com um tipo selvagem de *Oreochromis aureus*. Outros híbridos de tilápia vermelha provavelmente foram desenvolvidos, mas informações de suas origens são desconhecidas. Os resultados sugeriram que tal diversidade genética se mantém nesse plantel. Como não foi possível obter informações referentes à origem de seus estoques, tornou-se difícil ampliar os comentários sobre o assunto.

Verificou-se pela matriz de distância genética que os plantéis Ceará e Chitralada estavam mais próximos entre si ($D_g=0,6249$), quando foram comparados aos demais plantéis. Segundo Lahav e Haanan (1997), o plantel Ceará originou-se do cruzamento entre *O. niloticus* e *O. hornorum* x *O. mossambicus* e, segundo Aplleyard et al., (2003) a origem do Chitralada seria de *O. niloticus*. Então, é possível que o plantel Chitralada também não fosse puro apresentando genes de *O. hornorum* e/ou *O. mossambicus*. Outro fato a ser considerado na formação dos plantéis Nilótica e Chitralada é que ambos seriam *O. niloticus*. No entanto, a distância entre os dois, mostrada no dendrograma (Fig. 1), pode ser um indicativo de que os dois plantéis se distanciaram devido à endogamia intrapopulacional, que pode tê-los diferenciado geneticamente.

Os plantéis Israel e Nilótica foram os mais semelhantes entre si (Tab.3). Segundo Watanabe et al. (2002), o plantel Israel originou-se do cruzamento entre *O. niloticus* rosado e *O. aureus* normal (cinza), e segundo Lahav e Haanan (1997), a sua origem seria do cruzamento entre *O. niloticus*, *O. aureus* e *O. mossambicus*. Como o plantel Nilótica estava mais próximo do Israel (Fig. 1), é provável que o plantel Nilótica não fosse mais um estoque puro, como preconizado; genes de outra espécie podem ter sido introduzidos há várias gerações e fixados no plantel.

O plantel Taiwan teria se originado do cruzamento de Nilótica com Ceará (*O. niloticus*, *O. hornorum* x *O. Mossambicus*) (Lahav e Haanan, 1997). De acordo com a análise desse dado, mais o resultado obtido pelo dendrograma e a matriz de distância genética, percebe-se mais uma contradição, pois o plantel Taiwan deveria estar mais próximo do plantel Ceará quando se considera a sua origem. Novamente o manejo dos criatórios pode ter levado à tal distinção entre plantéis.

Em função do alto custo da importação de matrizes no mercado internacional, da ordem de

US\$ 25,00 a unidade, é importante a condução de trabalhos que visem à avaliação das linhagens disponíveis no Brasil. Faz-se necessário conhecer as linhagens dos principais sistemas de produção adotados no país, para, assim, poder avaliar a sua variabilidade genética e verificar a possibilidade de se iniciar um programa de melhoramento nos plantéis. (Peixoto, 2003). Com os resultados deste trabalho, foi possível obter um perfil dos plantéis comerciais de tilápia, caracterizando-os geneticamente. Essa caracterização é de grande importância na piscicultura, uma vez que a base genética dos plantéis é que vai determinar o sucesso do produto final. Deve-se, também, considerar a necessidade de mais assistência aos criadores, para orientá-los quanto ao manejo adequado dos reprodutores, de acordo com seus objetivos, de modo a obterem o retorno financeiro desejado.

CONCLUSÕES

Há diferença genética entre os seis plantéis estudados, sendo que entre alguns, os quais por seu histórico de formação deveriam ser mais semelhantes, evidenciou-se grande distanciamento genético, possivelmente ocasionado pelo manejo reprodutivo dos estoques. A redução da variabilidade genética nos plantéis Ceará, Chitralada, Nilótica e Vermelha pode estar relacionada ao uso de poucos reprodutores para obtenção de alevinos.

AGRADECIMENTOS

Aos produtores de tilápia que colaboraram com esta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPLEYARD, S.A.; RENWICK, J.M.; MATHER, P.B. Individual heterozygosity levels and relative growth performance in *Oreochromis niloticus* (L) cultured under Fijian conditions. *Aquac. Res.*, v.32, p.287-296, 2003.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, P. O. F. Applications of the RAPD techniques in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, v.37, p.117-123, 1994.
- FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODHOL, A. et al. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. *J. Fish Biol.*, v.47, suppl. A, p.103-126, 1995.
- FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21 century. In: FITZSIMMONS, K.; CARVALHO FILHO, J. (Eds.) *Proceedings from the fifth international symposium on tilapia aquaculture*. Rio de Janeiro: Panorama da aquacultura Magazine, 2000 p.3-8.
- HILSDORF, A.W.S. *Avaliação genética e zootécnica de duas variedades de tilápias nilóticas (O. niloticus var. Red sterling e O. niloticus, var. Chitralada) para o estabelecimento de um programa de produção massal de um híbrido de peixes e seus subprodutos*. Disponível em: <<http://Watson.fapesp.Br/PIPEM/pipe10/engpesc1.htm>>. Acessado em: 3/04/2002.
- LAHAV, E.; RAANAN, Z. Salinity tolerance of genetically produced tilapia hybrids. *Isr. J. Aquac.*, v.49, p.160-165, 1997.
- LOVSHIN, L.L. Criteria for selecting Nile tilapia and red tilapia for culture. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5, 2000, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: [s.n.], 2000, p.49-57.
- LOVSHIN, L.L. Red tilapia or Nile tilapia: Which is the best culture fish? In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., 1998, Piracicaba, SP. *Anais...* Piracicaba: [s.n.], 1998. p.179-198.
- McCONNELL, S. K. J. BEYNON, C., LEAMON, J. et al. Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. *Anim. Gen.*, v.31, p.214-218, 2000.
- MOREIRA, H.L.M. *Análise da estrutura de plantéis e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) estimadas por microssatélites*. 1999, 112f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Caracterização genética...

NORRIS, A.T.; BRADLEY, D.G.; CUNNINGHAM, E.P. Microsatellite genetic variation between cultured and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) population. *Aquaculture*, v.180, p.247-264, 1999.

PEIXOTO, M.T.D. *Avaliação zootécnica de cinco linhagens de tilápias (Oreochromis spp.) em sistema de recirculação*. 2003. 26f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

REILLY, A.; ELLIOT, N.G.; GREWE, P.M. et al. Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their ancestral Canadian population: comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation. *Aquaculture*, v.173, p.459-469, 1999.

SILVA, A.L.N.; CHAMMAS, M.A. Current status of tilapia culture in Brazil. *World Aquac. Soc.*, p. 350-351, 1997.

TESSIER, N.; BERNATCHEZ, L.; PRESA, P. et al. Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon. *J. Fish Biol.*, v.47, suppl. A, p. 156-163, 1995.

WATANABE, O.W.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K. et al. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends and challenges. *Rev. Fish. Sci.*, v.10, p.465-498, 2002.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. Popgene Version 1.31: Microsoft Windows based freeware for population genetic analysis: Quick user guide. [s.l.]: University of Alberta, Centre for International Forestry Research, 1999.