



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA APLICADA**

GÊNISON CARNEIRO SILVA

**ANÁLISE GENÉTICA NA INVESTIGAÇÃO DE ORIGEM DA TILÁPIA
(*Oreochromis niloticus*) EM CULTIVOS COMERCIAIS**

Recife, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA APLICADA

ANÁLISE GENÉTICA NA INVESTIGAÇÃO DE ORIGEM DA TILÁPIA
(*Oreochromis niloticus*) EM CULTIVOS COMERCIAIS

Gênison Carneiro Silva

Trabalho de conclusão curso
da área de genética animal,
apresentada ao Departamento
de Pesca e Aquicultura da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco como exigência
para obtenção do título de
Bacharel em Engenheira de
Pesca.

Recife, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586a Silva, Gênison Carneiro
Análise genética na investigação de origem da tilápia
(*Oreochromis niloticus*) em cultivos comerciais/ Gênison Carneiro
Silva. – 2019.
24 f. : il.

Orientadora: Maria Raquel Moura Coimbra.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura,
Recife, BR-PE, 2019.
Inclui referências.

1. Tilápia (Peixe) 2. Melhoramento genético 3. Aqüicultura
I. Coimbra, Maria Raquel Moura, orient. II. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA APLICADA

ANÁLISE GENÉTICA NA INVESTIGAÇÃO DE ORIGEM DA TILÁPIA
(*Oreochromis niloticus*) EM CULTIVOS COMERCIAIS

Monografia apresentada ao Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, *Campus Sede*, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Moura Coimbra / DEPAq - UFRPE
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ana Patrícia Souza de Lima / UAST - UFRPE
Membro titular

Prof^a. Dr^a. Karine Kelly Cavalcanti Oliveira de Farias / CODAI - UFRPE
Membro titular

Msc. Renata da Silva Farias / DEPAq – UFRPE
Membro Suplente

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças para chegar até aqui.

Ao Departamento de Pesca e Aquicultura, pela oportunidade de realizar a graduação e estrutura de apoio à pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra pela confiança em mim depositada, orientação e amizade.

Aos meus pais, Rizomar Carneiro e Josealdo de Oliveira, meu irmão Genilson Carneiro e minha tia Maria Jose, pelo incentivo e apoio incondicional. Vocês são minha base. Amo todos vocês!

Aos amigos do Laboratório de Genética Aplicada, Renata, Bruno, Wilka e Gabriel, pelo apoio e os bons momentos vividos.

Aos meus amigos da faculdade, Tainan Araujo, Isabela Marques, Filipe Silva, Wilker Fonseca, Débora Portela, Thaíse, Adriano, Igor Henrique, Marina Alves, Bruno Bico, Paulo Victor, Hugo Rodrigo, David Bruzaca, Marcos Canedo, Victor Sacramento, Sidynei Andrade, Ícaro Freitas, Maria Carolina, Lucas Vinícios, Clebson Marçal e ao saudoso Leonísio Pereira meu eterno painho por todas os momentos vividos, as vezes loucos, mas sempre bons e laços de amizade que ficaram para o resto da vida.

A minha namorada Paloma Alves. Muito obrigado por estar sempre ao meu lado pelo apoio e torcida!

O Programa de Educação Tutorial – PET Pesca pela bolsa concedida ao longo da graduação, aos meus companheiros do grupo, vocês são dez. Ao tutor Paulo Guilherme por toda orientação, incentivo profissional e amizade ao longo de todos esses anos.

A banca examinadora, professoras Patrícia Lima e Karine Oliveira, pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram de forma positiva ao longo da minha graduação e para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

RESUMO

O desenvolvimento de linhagens de tilápias melhoradas geneticamente foi um importante passo na aquicultura mundial, considerando-se os índices de crescimento, reprodução, ganho de peso, rendimento de filé e maior rusticidade dos indivíduos selecionados. Adquirir sementes melhoradas constitui o primeiro passo para diminuir o tempo de produção, entretanto, o aquicultor deve prover condições e estrutura adequadas para obter o desempenho máximo idealizado. Em sistemas bifásicos de tilapicultura em viveiros escavados, é comum que a fase de berçário ocorra em um local diferente da fase da engorda. Neste estudo de caso, um produtor adquiriu alevinos melhorados de uma empresa de melhoramento genético de tilápias “A” e os enviou à empresa “B” para que esta conduzisse a fase de berçário. Ocorre que quando tal produtor recebeu os juvenis de tilápia de “B” e os engordou, estas não apresentaram o desempenho zootécnico esperado. O objetivo desse estudo foi detectar se as tilápias de “A” e de “B” possuíam uma mesma origem genética. Foram utilizados marcadores genéticos como microssatélites e região controle do DNA mitocondrial (D-loop). Foram coletadas 79 amostras, sendo 40 oriundas de matrizes da empresa “A” e 39 provenientes de “B”. As amostras tiveram seu DNA total extraído e foram genotipadas para os marcadores microssatélites UNH104, UNH106, UNH160 e UNH208. Em seguida, as amostras tiveram os haplótipos da região controle identificados por sequenciamento. Foi analisada a diversidade genética das microssatélites para atribuir corretamente que a origem de “B” advinda de “A”. O alinhamento e edição do D-loop também revelaram uma rede de haplótipos com participações equitativas de “A” e “B”, confirmando que os grupos pertenciam majoritariamente à linhagem GIFT. As técnicas usadas mostram que o desempenho zootécnico diferente do esperado deve estar associado a questões ligadas ao manejo adotado ou à densidade de estocagem durante a fase de berçário.

Palavras-chaves: marcadores moleculares, pedigree, GIFT.

ABSTRACT

The development of genetically improved tilapia strains was an important step in world aquaculture, considering growth, reproduction, weight gain, fillet yield and greater rusticity of the selected individuals. Acquiring improved seeds is the first step to shortening production time, however, the fish farmer should provide adequate conditions and structure to achieve optimal maximum performance. In biphasic tilapiculture systems in excavated nurseries, it is common for the nursery phase to occur in a different location than the fattening phase. In this case study, one producer purchased improved fingerlings from a tilapia breeding company "A" and sent them to company "B" to conduct the nursery phase. However, when such the producer received the "B" tilapia juveniles and fattened them, they did not show the expected zootechnical performance. The objective of this study was to detect if the tilapia of "A" and "B" had the same genetic origin. Were used genetic markers such as microsatellites and mitochondrial DNA control region (D-loop). A total of 79 samples were collected, of which 40 were from "A" and 39 from "B". The samples had their total DNA extracted and were genotyped for the UNH104, UNH106, UNH160 and UNH208 microsatellite markers. Then, the samples had the control region haplotypes identified by sequencing. The genetic diversity of microsatellites was analyzed to correctly attribute that the origin of "B" came from "A". The alignment and editing of the D-loop also revealed a haplotype network with equitable stakes of "A" and "B" confirming that the groups belonged to the GIFT lineage. The techniques used show that the different zootechnical performance should be associated with issues related to the adopted management and stocking density during the nursery phase.

Keywords: molecular markers, pedigree, GIFT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.Rede de haplótipos baseada no método de Median-Joining para exemplares de tilápia das amostras “A”e “B”. Os diferentes círculos coloridos correspondem aos grupos amostrados, os tamanhos são proporcionais às frequências dos haplótipos e os números em vermelho representam a quantidade de mutações entre os haplótipos.19

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Diversidade genética para quatro microssatélites estimados para tilápia do nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	16
Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) e F_{ST} , nas amostras “A”e “B” de tilápia do nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).	17
Tabela 3. Número de indivíduos por haplótipos encontrados do mtDNA para os grupos “A” e “B”	18

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1.	Extração do DNA	12
2.2.	Marcadores microssatélites	13
2.3.	Região controle (D-loop)	14
3.5.	Análises dos dados	14
3.5.1.	Microssatélites.....	14
3.5.2.	Região controle (D-loop)	15
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1.	Microssatélites.....	15
4.2.	<i>D-loop</i>	17
5.	CONCLUSÃO	20
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por recursos pesqueiros para consumo humano tem aumentado o crescimento no setor aquícola. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2018) foram produzidos 171 milhões de toneladas de pescados, com a aquicultura representando 47% deste total. No Brasil, segundo dados do IBGE (2017) a produção nacional de pescado cultivado foi de 485,2 mil toneladas, sendo a tilápia (*Oreochromis niloticus*) o peixe mais produzido pela piscicultura nacional, representando 58,4% de toda a produção.

Dentre as espécies mais cultivadas mundialmente, a tilápia (*Oreochromis niloticus*) destaca-se pela sua facilidade na reprodução, altas taxas de crescimento e sobrevivência, sendo a quarta espécie mais cultivada, ficando atrás apenas das carpas capim (*Ctenopharyngodon idellus*), prata (*Hypophthalmichthys molitrix*) e comum (*Cyprinus carpio*) (FAO, 2018). Essas qualidades zootécnicas importantes para aquicultura levaram a tilápia a ser alvo de vários programas de melhoramento genético.

Um grupo de pesquisadores do International Center for Living Aquatic Resources Management (ICLARM) nas Filipinas entre os anos de 1988 e 1997 desenvolveram a linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), o resultado do cruzamento de oito linhagens, sendo quatro linhagens africanas selvagens (de Gana, Egito, Quênia e Senegal) e quatro linhagens domesticadas no Oriente Médio (de Israel) e Ásia. (Filipinas, Singapura, Taiwan e Tailândia). O melhoramento foi realizado com cruzamentos e seleções ao longo de 10 gerações (ASIAN DEVELOPMENT BANK, 2005). Com o objetivo de melhorar a taxa de crescimento, o rendimento de filé e a resistência à doenças (Oliveira et al., 2011).

Os 25 melhores desempenhos foram combinados para produzir a linhagem GIFT, que resultou em um animal 60% mais pesado ao fim do cultivo em relação ao anteriormente já cultivados na Filipinas (EKNATH et al. 1993; GUPTA e ACOSTA, 2004). A GIFT teve um ganho genético de 85%, podendo assim, alcançar mais de 800g em dez meses quando cultivada em ótimas condições (BRUMMETT, 2008).

No Brasil, a primeira introdução de tilápia ocorreu no ano de 1952 com a tilápia rendalli (*Coptodon rendalli*) (GODOY, 1959), em 1971 foi introduzida a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), principal espécie produzida no Brasil, juntamente com a tilápia de Zanzibar (*Oreochromis hornorum*), ambas pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), (SCHULTER e VIEIRA FILHO, 2017). No ano de 1996, foi a vez da tilápia

Chitralada ser importada, com alevinos provenientes da Tailândia (ZIMMERMANN, 1999) e, em 2002, a Tilapicultura Aquabel importou a Supreme – linhagem GST (GenoMar Supreme Tilápia) (CYRINO et al., 2004)

No ano de 2005, o Brasil tornou-se o primeiro país da América Latina a receber a *Genetically Improved Farmed Tilapia* (GIFT), um projeto da Estação Experimental Universidade Estadual do Maringá (UEM) em conjunto com WorldFish Center (antigo International Center for Living Aquatic Resources Management - ICLARM) - e com o apoio da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca – SEAP (JÚNIOR et al. 2008).

A aquisição de animais melhorados geneticamente é o primeiro passo para diminuir o tempo de cultivo e se obter um bom desempenho produtivo, entretanto, ter um animal melhorado geneticamente não garante o sucesso da produção. O aquicultor deve prover uma alimentação balanceada que supra as necessidades nutricionais do animal, uma qualidade de água dentro dos padrões aceitáveis para a espécie cultivada e condições sanitárias adequadas.

Na piscicultura é comum o cultivo em fases e, no caso da tilápia, isto envolve duas fases: o berçário e a engorda. Quando a área de cultivo é uma limitação, o aquicultor costuma terceirizar a fase de berçário, a fim de aumentar a quantidade de ciclos por ano.

No presente estudo de caso, um pernambucano adquiriu alevinos de alto desempenho de uma empresa de melhoramento genético de tilápias “A” e os enviou à empresa “B” para que esta coordenasse a fase de berçário. Ocorre que quando tal produtor recebeu os juvenis de tilápia de “B” e os engordou, estas não apresentaram o desempenho zootécnico esperado.

Esse estudo teve por objetivo investigar se os animais de “A” e “B” possuem a mesma origem genética. Para este caso foram utilizados marcadores microssatélites e genotipagem da região controle do D-loop.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas para o estudo amostras de tecidos dos peixes do plantel de reprodutores da empresa fornecedora “A” e dos indivíduos da aquicultura “B” que realizou a fase de berçário, sendo 40 indivíduos da “A” e 39 de “B”. As amostras foram acondicionadas em álcool a 95% e encaminhadas ao laboratório para análise.

2.1. Extração do DNA

Para a extração de DNA, as amostras de tecido (50 mg) foram maceradas em solução tampão (100 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mM de EDTA), com

concentração final de 0,05% de SDS e 100 µg/mL de proteinase K. Em seguida, as amostras foram levadas ao banho maria para serem digeridas por duas horas a 50° C e, depois, a 37° C por doze horas. Após o período de digestão, a fase aquosa foi extraída uma vez com fenol, uma vez com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (PCI) e uma vez com clorofórmio. O DNA foi precipitado com etanol absoluto e lavado com etanol a 70%. Em todos os passos as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm e transferidos e/ou descartados os sobrenadantes. Depois de extraído, o DNA foi conservado a -20°C. As amostras foram quantificadas utilizando o NanoVue Plus™ spectrophotometer e sua qualidade e integridade analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

2.2. Marcadores microssatélites

Para a análise com microssatélite foram utilizados os seguintes primers: UNH 104 – GenBank G12257, UNH 106 - GenBank G12259, UNH 160 – GenBank G12312 e UNH 208 - G12359). Os primers receberam a inserção da cauda M13 (5'-TGTAAAACGACGCCAGT-3') na extremidade 5'. O protocolo de amplificação usado foi o de SCHUELKE (2000) modificado, com volume final de PCR de 10 µl, sendo 50 ng de DNA, 10x PCR Buffer, 2,5 mM de MgCl₂ (UNH 104, UNH 106 e UNH 160) e 3,0 mM de MgCl₂ (UNH 208), 0,8 µM do primer forward (UNH 106 e UNH 208) e 0,2 µM do primer forward (UNH 104 e UNH 160), 8 µM do primer reverse, 8 µM da sonda M13 (Fluorescências FAM, NED e VIC usadas para os quatros marcadores), 200 µM de cada dNTP e 1U de *Taq* DNA polimerase. A reações foram levadas ao termociclador nas seguintes condições de amplificação: 94° C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 72° C por 60 segundos sem a sonda M13, acrescidos de mais oito ciclos de 94° C por 30 segundos, 53° C por 45 segundos e 72° C por 45 segundos, acrescido de extensão final a 72° C por 15 minutos para os primes UNH 104 e UNH 160. Para os primers UNH 106 e UNH 208 as condições foram: 94° C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 72° C por 60 segundos e uma extensão de 72°C por 10 minutos sem sonda M13. A reação era interrompida, as amostras colocadas em um cooler acrescentada a sonda M13, dando continuidade à outra reação com 94° C por 2 minutos mais 27 ciclos de 94° C por 30 segundos, 53° C por 45 segundos e 72° C por 45 segundos, acrescido de extensão final a 72° C por 30 minutos.

Os dois grupos foram submetidos a análise da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para as quatro microssatélites, e a genotipagem ocorreu no ABI 3500 Genetic Analyzer

(Applied Biosystems) para eletroforese capilar usando o GeneScan 600 LIZ v2.0 (Applied Biosystems) como marcador de peso molecular.

2.3. Região controle (D-loop)

Os grupos “A” e “B” foram submetidas às análises da região controle do mtDNA com os primers ORMT F: 5’-CTAACTCCCAAAGCTAGGAATTCT – 3’ e ORMT R: CTTATGCAAGCGCGATGAAA – 3’, utilizados para identificação de espécies de tilápia descritos por WU e YANG (2012). A reação final teve um volume de 10 µl, contendo 50 ng de DNA, 10x PCR Buffer; 2,5 mM de MgCl₂, 0,01 mM de cada primer, 10 mM de cada dNTP e 1U de *Taq* DNA polimerase. As reações foram incubadas no termociclador a 94° C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto e 72°C por 90 segundos e extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os amplicons foram submetidos a um processo de purificação, para remoção de dNTPs e primers não incorporados, com o kit EXOSAP composto de Exonuclease I (10U/µl) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) (New England Biolabs). Os amplicons purificados foram submetidos a uma nova amplificação com um volume final de 10 µl, contendo 10 ng do produto do DNA amplificado, 0,5 µl de BigDye terminator v3.1, 1 µl do tampão Save money 5X, 3,2 pmol/µl do primer forward. A amplificação seguiu as seguintes condições: desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C, acrescidos de 40 ciclos 94° C por 10 segundos, 55°C por 10 segundos e 4 minutos a 60°C. Os produtos desta reação foram novamente purificados por meio de precipitação com NaOAC 3M pH 5,8, EDTA 125 mM pH 8 e etanol absoluto. As amostras foram sequenciadas pelo sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.5. Análises dos dados

3.5.1. Microssatélites

A genotipagem do quatro marcadores microssatélites foi conduzida utilizando-se o software GeneMarker v2.6.3 para identificação dos alelos. Os genótipos foram analisados pelo software GENEPOP v4.0 (RAYMOND e ROUSSET, 1995) para o cálculo do número de alelos, heterozigosidades esperada e observada, coeficiente de consanguinidade (F_{IS}), o coeficiente de diferenciação genética (F_{ST}). A magnitude da variação devida a diferenças entre as amostras foi avaliada por uma AMOVA no programa Arlequin v3.5.22 (EXCOFFIER et al., 2005). Como método de diferenciação dos valores de F_{ST} , foi utilizada a definição de

WRIGHT (1978), em que os valores de 0,00 a 0,05; 0,051 a 0,15; 0,151 a 0,25 e >0,25 indicaram pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética.

3.5.2. Região controle (D-loop)

Os dados obtidos a partir do sequenciamento do D-loop foram alinhados e editados pelo método clustalW do MEGA v.7 (KUMAR et al., 2016), usando a sequência GU370126 do GenBank como referência. A fim de analisar a diversidade nucleotídica e haplotípica, número de haplótipos, distribuição de indivíduos por haplótipo e diferenças nucleotídicas dentre e entre amostras, foi utilizado o DnaSP v6.10.04 (ROZAS et al., 2017). No programa Arlequin v3.5.22 (EXCOFFIER et al., 2005) foram realizadas a análise de variância molecular (AMOVA), total de sítios polimórficos e frequência por grupos, além do Φ_{ST} encontrado pelo método de TAJIMA e NEI (1984), que é análogo a F_{ST} de WRIGHT (1978) e que indica a diferenciação genética entre amostras (SLATKIN, 1993). O software Network v4.6.1.1 (BANDELT e DRESS, 1992) foi usado para a construção de uma rede de haplótipos das sequências da região controle baseado no método *Median-Joining* (BANDELT et al., 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Microssatélites

Do total de 43 alelos observados, os marcadores UNH 208 e UNH 106 apresentaram o maior número de alelos, 14 e 13, respectivamente. Os marcadores UNH 104 e UNH 160 apresentaram 7 e 9 alelos. A quantidade de alelo encontrado por loci é semelhante aos encontrados por BAGGIO et al. (2016) com outro conjunto de microssatélites. Foram observados vários alelos com baixa frequência (menor que 0,1000 - 10%) em todos os *loci*.

As heterozigosidades médias observadas (H_o) e esperadas (H_e) tiveram uma pequena variação, entre 0,7536 e 0,7914 e entre 0,5536 e 0,5456, respectivamente. Esses valores se mostram semelhantes aos encontrados por BAGGIO et al. (2016) e MELO et al. (2006), realizando identificação e caracterização de plantéis de tilápias.

Quanto à consanguinidade média (F_{IS}), os grupos “A” e “B” mostraram valores médios muito próximos, 0,2791 e 0,3 (Tabela 1). PETERSEN et al. (2012) e RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al. (2013) também encontram valores semelhantes ($F_{IS} = 0,33$ e $F_{IS} = 0,41$, respectivamente) comparando a linhagem GIFT com uma vermelha e acompanhando gerações da GIFT. O cruzamento entre indivíduos aparentados, combinado à seleção, é uma estratégia amplamente usada para aumentar a resposta da característica que se

deseja melhorar em programas de melhoramento genético, como aquele desenvolvido para a GIFT.

Tabela 1 - Diversidade genética para quatro microssatélites estimados para tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*).

Grupos	UNH 160	UNH 104	UNH 208	UNH 106	Médias
“A”					
N	31	31	33	29	31
N_a	9	7	14	13	10,75
He	0,8418	0,7329	0,7314	0,7084	0,7536
Ho	0,6774	0,3870	0,3939	0,7241	0,5456
Fis	0,1980	0,4760	0,4653	-0,0226	0,2791
HWE	ns	*	*	ns	-
“B”					
N	31	34	38	37	35
N_a	9	7	13	8	9,25
He	0,8244	0,7985	0,8663	0,6767	0,7914
Ho	0,4516	0,3529	0,8157	0,5945	0,5536
Fis	0,4563	0,5617	0,0591	0,1229	0,3
WHE	*	*	ns	*	-

N número de indivíduos, N_a número de alelos, He heterozigosidade esperada, Ho heterozigosidade observada; FIS, coeficiente de endogamia, HWE desvio do equilíbrio de Hardy–Weinberg, ns não significativo, * p <0,05, ajustado pela correção de Bonferroni, k = 8

A distância genética (F_{ST}) calculada entre os dois grupos, usando-se as microssatélites, mostrou-se significativa (0,029). Contudo, a AMOVA mostrou que a maior parte da variação observada é explicada pela variação existente dentro das amostras (97%) mais do que entre

elas (3%). Ou seja, o compartilhamento das frequências genotípicas e alélicas entre os dois grupos indicam uma proximidade genética, típica de uma mesma linhagem. MCKINNA et al (2010) confrontaram duas linhagens GIFTs introduzidas nas ilhas Fiji e observaram que a distância genética entre elas estimada por marcadores microssatélites foi de $F_{ST} = 0,02704$. RODRIGUES-RODRIGUES et al. (2013) em seu estudo de caracterização de gerações da GIFT encontrou um valor de $F_{ST} = 0,03$ entre as gerações G_0 e G_1 , semelhantes ao deste trabalho.

Quando distintas linhagens são comparadas, o valor do F_{ST} calculado aumenta sensivelmente. Seis populações de tilápia vermelha híbridas foram investigadas quanto à diversidade genética para um programa de melhoramento na Colômbia por meio de microssatélites e o F_{ST} calculado para elas variou de 0,105 a 0,239 (BRINEZ et al. 2011). BAGGIO et al (2016), comparando cinco linhagens de tilápia introduzidas no Brasil, encontraram diferenças entre 0,063 e 0,496 entre a GIFT e as demais.

Tabela 2 - Análise de variância molecular (AMOVA) e F_{ST} , nas amostras “A” e “B” de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Componentes de variância	Percentagem de variação	F_{ST}
Entre os grupos	4.608	0.04707	2.95195	
Dentro dos grupos	201.079	1.54739	97.04805	0.02952*
Total	205.688	1.59446		

*Nível de significância de $p = 0,05$.

4.2. D-loop

O DNA mitocondrial (mtDNA) possui herança exclusivamente materna, portanto, a árvore filogenética construída a partir dele pode refletir diretamente a origem de ancestrais maternos (CANN, STONEKING & WILSON, 1994). Com o sequenciamento da região D-loop do mtDNA, 10 haplótipos foram encontrados, os haplótipos H2, H4 e H5 englobaram 93% e 83% dos grupos “A” e “B”, respectivamente (Tabela 3). Esses percentuais altos, bem como a rede haplotípica (Figura 1) gerada pelo método *median-joining* ressaltam a enorme

semelhança entre as amostras, e suportam, mais uma vez, a provável origem comum entre elas.

Na tabela 3, é possível observar que seis haplótipos constam no grupo “B”, mas não em “A”. É possível especular que alguma “adição” (em torno de 17%) de exemplares de outra origem, que não a GIFT, fizeram parte do grupo “B”, o que pode ter ocorrido em função de algum erro no manejo.

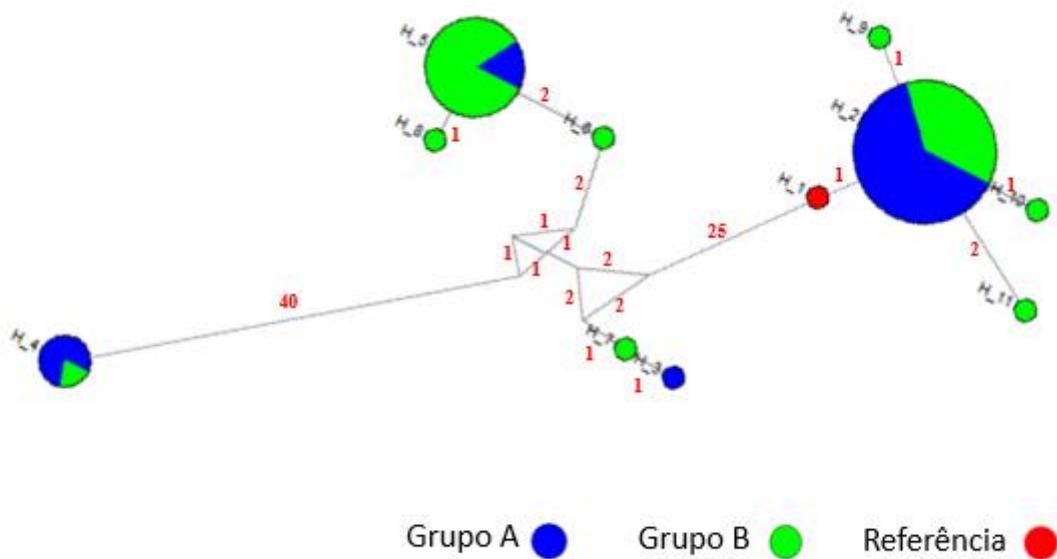
Tabela 3 - Número de indivíduos por haplótipos encontrados do mtDNA para os grupos “A” e “B”.

Haplótipos	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11
A	RE	24	1	4	3	-	-	-	-	-	-
B	RE	14	-	1	15	1	1	1	1	1	1

RE Sequencia de referência, H haplótipos.

A distância genética (Φ_{ST}) encontrada de -1,10989 ($P<0,05$) indicou que a variação genética entre as amostras não é significativa, corroborando com os valores da AMOVA do F_{ST} encontrado.

Figura 1 - Rede de haplótipos baseada no método de *Median-Joining* para exemplares de tilápia dos grupos “A” e “B”.



Fonte: Autoral. Os diferentes círculos coloridos correspondem aos grupos amostrados, os tamanhos são proporcionais às frequências dos haplótipos e os números em vermelho representam a quantidade de mutações entre os haplótipos.

Uma das possíveis explicações para o baixo desempenho dos animais adquiridos pelo aquicultor (amostra B) é a interação genética versus ambiente (G x E), relatada por BRUMMETT (2008), que em sua abordagem conclui que genótipos melhorados em sistemas de cultivos diferentes sob os quais foram criados não apresentam seu máximo desempenho. Outra explicação para a baixa performance dos haplótipos restritos a alguns animais encontrados nas amostras de “B” é a “adição” de cerca de 17% de tilápia de outra origem durante a fase de berçário. Entretanto, de um modo geral, podemos dizer que mais de 83% da amostra “B” advém de “A”.

5. CONCLUSÃO

Os marcadores microssatélites e a região controle do mtDNA mostraram-se eficientes para dirimir as dúvidas sobre a procedência genética neste estudo de caso, revelando que 83% dos animais do grupo “B” advém do grupo “A”. O estudo também evidenciou que o desempenho zootécnico diferente do esperado, a despeito de “B” e “A” compartilharem a mesma origem genética, deve-se a questões ligadas ao manejo como alimentação, qualidade de água e densidade de estocagem durante a fase de berçário e também aos 17% dos peixes que não advém do grupo “A”, logo não poderiam ter o mesmo desempenho dos demais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASIAN DEVELOPMENT BANK. **An impact evaluation of the development of genetically improved farmed tilapia: and their dissemination in selected countries.** Mandaluyong: Asian Development Bank, 2005.
- BRUMMETT R.E. 2008. **Genetic quality of culture tilapia stocks in Africa.** World Aquaculture 39, 46-49.
- BANDELT, H.J.; DRESS, A.W.M. Split decomposition: **A new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data.** Molecular Phylogenetics and Evolution, v.1, p.242–252, 1992.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A. **Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.** Molecular Biology and Evolution, v.16, p.37–48, 1999.
- BAGGIO, R. A.; RIBEIRO R. O.; BOEGER, W. A. **Identifying Nile tilapia strains and their hybrids farmed in Brazil using microsatellite markers.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.51, n.10, p.1744-1750, out. 2016.
- BORIS BRIÑEZ, B. R.; CARABALLO X. O.; SALAZAR, M. V. **Diversidad genética en seis poblaciones de tilapia roja, usando microsatélites como marcadores genéticos.** Rev. MVZ Córdoba 16(2):2491-2498, 2011.
- CANN RL, STONEKING M, WILSON AC. 1994. **Mitochondrial DNA and human evolution.** Journal of bioenergetics and biomembranes 26(3):251–259 doi 10.1007/bf00763097.
- CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** São Paulo: TecArt, 2004.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: **An integrated software package for population genetics data analysis.** Evolutionary ioinformatics, v.1, p.47–50, 2005.
- EKNATH A.E., TAYAMEN M.M., PALADA-DE VERA M.S., DANTING J.C., REYES R.A., DIONISIO E.E., CAPILI J.B., BOLIVAR H.L., ABELLA T.A., CIRCA A.V., BENTSEN H.B., GJERDE B., GJEDREM T. e PULLIN R.S.V. (1993) **Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of Oreochromis niloticus tested in different farm environments.** Aquaculture 111,171-188.
- GODOY, M. P. **Criação de peixe.** Pirassununga: Estação Experimental Biology. Piscicultura, 1959, 24 p.
- GUPTA M.V. e ACOSTA B.O. 2004. **From drawing board to dining table: the success story of the GIFT project.** NAGA 27, 4-14.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 1-8, 2017.

JÚNIOR, E. L.; 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 Sci. Anim. Sci. Maringá, v. 30, n. 2, p. 233-240, 2008.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. **MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets.** Molecular Biology and Evolution, v.33, p.1870-1874, 2016.

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.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, n.1, p.87-93, 2006.

MCKINNA, E. M.; NANDLAL, S.; MATHER, P. B.; HURWOOD, D. A. **An investigation of the possible causes for the loss of productivity in genetically improved farmed tilapia strain in Fiji: inbreeding versus wild stock introgression.** Aquaculture Research, 2010, 41, e730-e742 doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02539.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura.** Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. p. 17-23, 2018.

OLIVEIRA, S.N.; RIBEIRO, R.P.; LOPERA, N.M.; CANDIOTO, F.B.; RESENDE, E.K. de; LEGAT, A.P. **Análise genética de três gerações de tilápia do Nilo (linhagem GIFT) utilizando o marcador RAPD.** Acta Scientiarum. Animal Sciences, v.33, p.207-212, 2011. DOI: 10.4025/actascianimsci.v33i2.9202.

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.** Bol. Inst. Pesca, São Paulo, 38(4): 313 – 321, 2012.

ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS S.E.; SÁNCHEZ-GRACIA, A. **DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets.** Molecular Biology and Evolution, v.34, p.3299-3302, 2017.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. **GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism.** Journal of Heredity, v.86, p.248–249, 1995.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; 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 Microssatélites.** Pesq. agropec. bras. Brasília, v.48, n.10, p.1385-1393, out. 2013. DOI: 10.1590/S0100-204X2013001000010.

SLATKIN, M. **Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations.** Evolution, v.47, p.264–279, 1993.

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

SCHULTER E. P.; VIEIRA FILHO J. E. R. **Evolução da piscicultura no brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia.** Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA. Brasília: Rio de Janeiro, 2017. P. 42.

TAJIMA, F. e NEI, M. 1984. **Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences.** Mol. Biol. Evol. 1:269-285.

ZIMMERMANN, S. **Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores.** Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 15-21, 1999.

WU, L. YANG, J. **Identifications of Captive and Wild Tilapia Species Existing in Hawaii by Mitochondrial DNA Control Region Sequence.** PLoS ONE 7(12): e51731. doi:10.1371/journal.pone.0051731, 2012.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations.** Chicago: The University of Chicago, 1978. v.4, 580p.