

Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia

Practical application of microsatellite markers in genetic characterization and identification of stocks of tilapia

Daniela Chemim de Melo¹, Denise A.A. Oliveira, Arno Seerig, Daniel Cardoso de Carvalho

Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

¹Correspondência: danichemim@bol.com.br.

Resumo

As tilápias estão se tornando uma importante espécie de peixe criada e utilizada em pesquisas em muitos países tropicais e subtropicais. Elas têm sido transferidas intencionalmente ou acidentalmente para vários lugares fora de seu local de origem, e isso tem levado à formação de híbridos, o que torna difícil a identificação morfológica de avaliação de estoques. A identificação de espécies é crucial para programas de conservação. É também um pré-requisito essencial para estudos de populações. Frequentemente, muitas espécies são identificadas com base em morfologia, mas este método é muito problemático. Marcadores moleculares têm permitido identificar espécies, independente do estágio de vida do animal.

Palavras-chave: tilápia, microssatélites, caracterização genética.

Abstract

Tilapias are becoming the most important specie in fish production and they are the focus of research in many tropical and subtropical countries. They have been transferred purposely or accidentally for several places around the world and it leads to hybridization, making hard the morphological identification and evaluation of stocks. The species identification is very important for conservation programs. It is also a requisite for the studies of populations. Often, many species are identified by morphological data, but this method has many problems. Molecular markers had allowed identifying species, no matter the life stage of the animal.

Keywords: tilapia, microsatellites, genetic characterization.

Introdução

Tilápia é o nome comum de aproximadamente 70 espécies de peixes taxonomicamente classificadas, da família Cichlidae, nativas de água doce da África tropical (McAndrew e Majumdar, 1986; Fitzsimmons, 2000; Hilsdorf, 2002). Recentemente, são criadas em todo o mundo, em vários países dos hemisférios Norte, Sul e, especialmente, no Oriente Médio e na Ásia.

As tilápias de importância comercial estão divididas em três principais grupos taxonômicos, distinguidos basicamente pelo comportamento reprodutivo. São eles o gênero *Tilapia* (os peixes incubam seus ovos em substratos), *Oreochromis* (incubam os ovos na boca das fêmeas) e *Sarotherodon* (incubam os ovos na boca do macho ou de ambos; Lovshin, 1998; Moreira, 1999; Fitzsimmons, 2000). Dentre as espécies de tilápias, apenas quatro conquistaram destaque na aquacultura 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 uroleps hornorum*). A essas quatro espécies somam-se os seus variantes e híbridos, com cores variando do laranja, ouro, rosa e vermelho, genericamente chamados de tilápias vermelhas (Lovshin, 1998). Hoje são os peixes de cultivo mais importantes nas regiões tropicais no mundo. São rústicos, de crescimento rápido, não requerem tecnologia sofisticada, além de possuírem excelente sabor e textura. Sua importância como fonte de proteína animal nos países subdesenvolvidos é amplamente reconhecida (McConnell *et al.*, 2000).

A tilápia foi introduzida no Brasil na década de 50, entretanto, a criação intensiva em tanques teve início somente a partir de 1990 (Silva e Chammas, 1997). Atualmente é um peixe encontrado em quase todo país, tanto em cultivos comerciais como em reservatórios e açudes. A primeira espécie do grupo tilápia introduzida no Brasil foi a *Tilapia rendalli*, no ano de 1953. Essa espécie foi obtida no Congo (África) e foi utilizada para povoamento da represa "Light", em São Paulo, e do lago Paranoá, em Brasília (Castagnolli, 1992, citado por Moreira, 1999). Segundo Moreira (1999), essa espécie veio classificada erroneamente como *Tilapia melanopleura*, devido à semelhança entre ambas. A introdução seguinte de peixes deste grupo foi feita com a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo, fitoplantófaga), em Pentecostes, estado do Ceará, no ano de

1971. Os exemplares desta espécie eram provenientes da Costa do Marfim (África). Neste mesmo ano, foi introduzida a espécie *Oreochromis hornorum* (tilápia Zanzibar, fitoplantófaga), também na estação de Pentecostes-CE, procedente da Costa do Marfim. Posteriormente, outras espécies foram introduzidas com o objetivo de hibridação, entre elas *Oreochromis mossambicus* e *Oreochromis aureus* (Moreira, 1999).

Muitas incidências de hibridização têm sido relatadas, principalmente depois da introdução de espécies não endêmicas (McAndrew e Majumdar, 1986). Alguns híbridos têm demonstrado boa *performance* nos sistemas produtivos, especialmente em regiões tropicais. Entretanto, o manejo reprodutivo de tais espécies vem sendo feito de modo precário ou inadequado em muitos países, gerando diversos problemas. Segundo Kocher *et al.* (1998), técnicas de hibridação interespecífica, mal conduzidas, têm levado à perda de espécies puras. Elevados índices de depressão endogâmica foram relatados por Eknath e Doyle (1993), ao compararem plantéis criados nas Filipinas com outros isolados da natureza, concluindo que os últimos apresentaram melhor *performance* que os artificialmente criados. Além disso, muitas são as evidências de contaminação de estoques geneticamente melhorados pela introgressão de espécies selvagens (Macaranas *et al.*, 1986).

Na tentativa de identificação das espécies e subespécies de tilápias, características como hábito reprodutivo e alimentar, desenvolvimento e características estruturais têm sido muito utilizados. No entanto, tais caracteres têm valor restrito, por causa da grande variação intrapopulacional e de diferenças sutis entre plantéis (Bardakci e Skibinski, 1994). No caso de híbridos, essa tarefa é ainda mais complicada, pois estes geralmente têm aparência intermediária entre as espécies parentais. Outra dificuldade, ainda maior, é estabelecer o relacionamento genético ao nível de populações. Segundo Moreira (1999), isso ocorre porque registros genealógicos de populações aquáticas são notoriamente difíceis de manter, já que a maioria dos peixes produz um grande número de progênies, as quais são geralmente muito pequenas para serem marcadas. Considerando que num mesmo local estão presentes várias progênies de diversos peixes, sua identidade familiar é assim, perdida. Ainda segundo Moreira (1999), a capacidade de inferir a estrutura familiar de populações aquáticas é uma ferramenta valiosa para a genética de populações, ecologia e comportamento animal, entre outras áreas. Além disso, tem também importantes aplicações práticas no manejo de estoques de reprodutores em programas de melhoramento das espécies.

As tilápias estão se tornando uma importante espécie de peixe criada e utilizada em pesquisas em muitos países tropicais e subtropicais. Têm sido transferidas intencional ou acidentalmente para vários lugares fora de seu local de origem, e isso tem levado à formação de híbridos, o que torna a identificação morfológica dos estoques difícil.

Marcadores moleculares

A identificação de espécies é crucial para programas de conservação. É também um pré-requisito essencial para estudos de populações. Frequentemente, muitas espécies são identificadas com base em morfologia, mas este método é muito problemático. Marcadores moleculares têm permitido identificar espécies, independente do estágio de vida do animal (Fergusom *et al.*, 1995).

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (Matioli, 2001). Milach (1998) descreve que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente de acordo com as leis básicas de herança descritas por Mendel e servem para identificar um local ou uma região de um cromossomo. Um marcador genético ideal deve apresentar os seguintes atributos: a) alto nível de polimorfismo, b) estabilidade em diferentes ambientes, c) detectar grande número de locos não ligados e d) ser de herança simples (Milach, 1998; Matioli, 2001).

O uso de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento. Podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subsequentes, comprovando sua natureza genética (Milach, 1998). Também podem ser utilizados em diferentes estudos de populações de peixes e em aquicultura para estimativas do tamanho efetivo de populações, identificação de híbridos e espécies, determinação genética do impacto de introdução de populações e peixes cultivados em determinada área, estabelecimento de relações filogenéticas, identificação de populações-chave para conservação de recursos genéticos, construção de mapas genéticos e definição de estratégias de melhoramento (Ferguson *et al.*, 1995). Comportamento social e reprodutivo das espécies e padrões de acasalamento também têm sido estudados com o auxílio de marcadores moleculares (Hughes, 1999).

Os microssatélites, também conhecidos como STR – (Repetições curtas em *tandem* “*Short Tandem Repeats*”), são elementos repetitivos, formados por arranjos de repetições em *tandem*, de dois a seis nucleotídeos de comprimento e estão entre os locos mais polimórficos dos genomas (Ferguson *et al.*, 1995; Milach, 1998; Matioli, 2001). O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do número dos elementos repetidos, provavelmente devido aos erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA (Stuart, 2001). A repetição dinucleotídica [CA]_n é uma das mais abundantes famílias de microssatélites

nos genomas de vertebrados, ocorrendo a uma média de 15 a 30 kb (kilobases; Lee e Kocher, 1996; Moreira, 1999). Os microssatélites predominantes em peixes compreendem, até agora, repetições de duas bases, usualmente (GT/CA)_n ou (CT/CA)_n (Lee e Kocher, 1996; Carleton *et al.*, 2002). Lee e Kocher, (1996) isolaram 133 locos [CA]_n e 7 locos [AAC]_n de microssatélites para *Oreochromis niloticus* e estabeleceram os *primers* para as sequências flanqueadoras.

Comparando-se microssatélites com outros marcadores moleculares, constata-se que estes apresentam uma série de vantagens sobre os demais: são abundantes, cobrem extensivamente o genoma, possuem natureza multialélica, necessitam de 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 (Lima, 1998; Moreira, 1999). Têm sido aplicados em diversos estudos na área animal, entre eles: estimativas de distâncias genéticas; monitoramento de linhagens endocruzadas; testes de paternidade em diversas espécies animais; comparações de composição genética de amostras recentes e antigas e análise da diversidade genética. Podem, inclusive, indicar aos criadores a ocorrência da redução da diversidade genética devido ao emprego de um pequeno número de pais, por meio da comparação dos níveis de variabilidade entre a origem e o material derivado. Também auxiliam 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. Como exemplo destaca-se o trabalho de caracterização genética de plantéis de tilápias criadas no sudeste do Brasil com o auxílio de microssatélites, gerando, assim, informações que possam ser empregadas na condução de futuros programas de melhoramento genético da espécie (Melo, 2004). Neste estudo, ao estimar as médias de heterozigosidade e homozigosidade observadas e esperadas em cada plantel, notou-se a ocorrência de endogamia em quatro dos seis plantéis. No entanto, quando foram estimados o coeficiente de endogamia intrapopulacional (Fis) e o coeficiente de endogamia interpopulacional (Fst), verificou-se que, de modo geral, a endogamia é alta dentro dos plantéis (Fis = 0,0486). Ou seja, os plantéis estão tornando-se mais homogêneos dentro de si e mais distintos entre si (Fst = 0.3263). O dendograma a seguir permite melhor visualização da posição de cada plantel quanto às distâncias genéticas existentes entre eles (Fig. 1), mostrando que alguns plantéis considerados puros podem, na realidade, não ser.

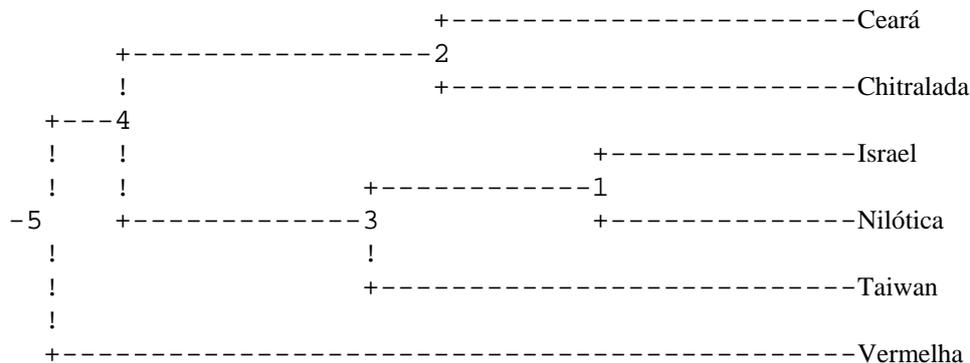


Figura 1. Dendrograma mostrando as distâncias genéticas entre os seis plantéis de tilápias (Melo, 2004).

Reilly *et al.* (1999), ao utilizarem microssatélites em *Salmo salar*, uma espécie de salmão, com o intuito de diferenciar estoques na Tasmânia, relataram que a perda de heterozigose em peixes cultivados pode ser mais facilmente revelada por estes marcadores, se comparados a marcadores de isoenzimas e de DNA mitocondrial (mt).

Essa tendência a uma baixa de variabilidade genética nos plantéis pode ter como origem o desbalanço no número de machos e fêmeas usados para reprodução, ou seja, poucos casais na obtenção de alevinos (Melo, 2004). Essa observação também foi constatada por Norris *et al.* (1999) ao estudarem o salmão do Atlântico. Isso certamente ocorre quando não há controle dos grupos de acasalamento nesses estoques que impeça o acasalamento entre parentes. Outro agravante, para esta situação, é que não há troca de reprodutores entre as larviculturas para quebrar o ciclo de consanguinidade. 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 deste peixe. A depressão é resultado de um aumento da homozigose e, conseqüentemente, do pareamento de alelos recessivos, que assim passam a expressar a característica indesejável que a eles estiver condicionada, como por exemplo aquelas que influenciam a diminuição da viabilidade, da sobrevivência, o crescimento e a produção em geral, além de incrementar a taxa de anormalidades genéticas (Moreira, 1999).

Moreira (1999) utilizou este método na análise de estoques de reprodutores de Tilápia do Nilo a fim de verificar a origem dos mesmos e determinar métodos que visem a manutenção da variabilidade genética dos



estoques cultivados no país. Este autor relatou alta taxa de endogamia em estoques cultivados, mostrando que, principalmente na região Sul do Brasil, as linhagens mantidas para larvicultura não possuem a variação genética adequada para realização de programas de melhoramento

Tessier *et al.* (1995) identificaram alto grau de diferenciação genética em populações de salmão do Atlântico com marcadores de microssatélites, em que análises de isoenzimas e de DNAm_t haviam falhado em revelar tal estruturação em salmão do Atlântico Norte. Reprodutores de carpa comum na Hungria foram analisados geneticamente utilizando microssatélites e RAPDs (Bártifai, *et al.*, 2003). Os autores chegaram à conclusão de que as análises feitas por marcadores microssatélites revelaram informações mais detalhadas sobre a diversidade genética dos animais do que os marcadores RAPD.

É possível subagrupar animais mais homogêneos geneticamente e avaliar similaridades genéticas entre e dentro de raças, utilizando genótipos multilocus de microssatélites (Ciampolini *et al.*, 1995). Agnese *et al.* (1999) conseguiram por meio de marcadores microssatélites, identificar uma população pura da espécie *Oreochromis esculentus*, ameaçada de extinção, e preconizaram que estes marcadores serão úteis para identificar novas populações desta espécie e também para determinar o grau de introgressão genética de outras espécies sobre *O. esculentus*.

Conclusões

Os polimorfismos de microssatélites de DNA são ferramentas valiosas na genética animal, não apenas na identificação individual e determinação de relações familiares, mas também como fonte de marcadores genéticos informativos que podem ser associados a características quantitativas e serem empregados em programas de melhoramento animal.

A caracterização genética é de grande importância na piscicultura, uma vez que a base genética dos plantéis é que vai determinar o sucesso do produto final, nesse caso, o peixe. Também se pode considerar a necessidade de mais assistência aos criadores, de modo a orientá-los quanto ao manejo adequado dos reprodutores, de acordo com seus objetivos, de modo a obterem o retorno financeiro desejado.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos produtores de tilápia que colaboraram com essa pesquisa e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro (projeto CBB 243-04).

Referências

- Agnese JF, Adepo-Gourene B, Owino J, Pouyaud L, Aman R.** Genetic characterization of a pure relict population of *Oreochromis esculentus*, an endangered tilapia. *J Fish Biol*, v.54, p.1119-1123, 1999.
- Bardacki F, Skibinski POF.** Applications of the RAPD techniques in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, v.37, p.117-123, 1994.
- Bártifai R, Egedi S, Yue GH, Kovacs B, Urbanyi B, Tamas G, Horvath L, Orban L.** Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, v.219, p.157-167, 2003.
- Carleton KL, Streehman JT, Lee BY, Garnhart N, Kidd M, Kocher TD.** Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Anim Genet*, v.33, p.140-144, 2002.
- Ciampolini R, Moazami-Goudarzi K, Vaiman D, Dillmann C, Mazzanti E, Foulley JL, Leveziel H, Cianci D.** Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphism to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *J Anim Sci*, v.73, p.3259-3268, 1995.
- Eknath AE, Doyle R.** Effective population size and rate of inbreeding in aquaculture of Indian major carps. *Aquaculture*, v.85, p.293-305, 1993.
- Ferguson A, Taggart JB, Prodhon A, McMeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P, Hynes RA.** 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 (Ed.). *Proceedings from the fifth international symposium on tilapia aquaculture*. Rio de Janeiro: Panorama da aquacultura Magazine, 2000. p.3-8.
- Hilsdorf AWS.** 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: 03 abr. 2002.
- Hughes C.** Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: A revolution results. *Ecology*, v.79, p.383-399, 1999.
- Kocher TD, Lee WJ, Sobelwaska H, Penmam D, McAndrew BJ.** A genetic linkage map of cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, v.148, p.1225-1232, 1998.



- Lee WJ, Kocher TD.** Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *J Fish Biol*, v. 49, p. 169-171, 1996.
- Lima RMG.** *Polimorfismos de microssatélites em DNA de equínos e seu uso na determinação de parentesco em animais da raça mangalarga machador*. 1998, 91p. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.
- Lovshin LL.** Red tilápia or Nile tilápia: which is the best culture fish? In: Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Peixes, 2, Piracicaba, SP, 1998. *Anais...* Piracicaba: 1998, p. 79-198.
- Macaranas JM, Taniguchi N, Pante JR, Capili JB, Pullin RSV.** Electrophoretic evidence for extensive hybrid gene introgression into commercial *Oreochromis niloticus* stocks in the Philippines. *Aquacult Fish Man*, v.17, p.249-258, 1986.
- Matioli SR.** Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucleicos. In: Matioli SR (Ed.). *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202p.
- McAndrew BJ, Majumdar KC.** Tilápia stock identification using electrophoretic markers. *Aquaculture*, v.30, p.249-261, 1986
- McConnell SKJ, Beynon C, Leamon J, Skibinski DO.** Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. *Anim Genet*, v.31, p.214-218, 2000.
- Melo DC.** *Caracterização genética de seis plantéis comercial de tilápia (Oreochromis) utilizando marcadores microssatélite*. 2004, 34f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Milach SCK.** Marcadores de DNA. *Biotechnol Ciênc Des*, n.5, p.14-17, 1998.
- Moreira HLM.** *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, Porto Alegre, 1999.
- Norris AT, Bradley DG, Cunningham EP.** Microsatellite genetic variation between cultured and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) population. *Aquaculture*, v.180, p.247-264, 1999.
- Reilly A, Elliot NG, Grewe PM, Clabby C, Powell R, Ward RD.** 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 ALN, Chammas MA.** *Current status of tilapia culture in Brazil*. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 1997. p.350-351.
- Studart MT.** *Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP*. 2001. 73f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.
- Tessier N, Bernatchez L, Presa P, Angers B.** Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon. *J Fish Biol*, v.47, suppl. A, p.156-163, 1995.
-