



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DIEGO DOS SANTOS PENHA

**TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS HETERÓLOGOS PARA
Brycon falcatus E ANÁLISE CITOGENÉTICA EM *Oreochromis
niloticus***

DIEGO DOS SANTOS PENHA

**TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS HETERÓLOGOS PARA
Brycon falcatus E ANÁLISE CITOGENÉTICA EM *Oreochromis
niloticus***

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera Barrero.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Dias.

Londrina
2019

DIEGO DOS SANTOS PENHA

TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS HETERÓLOGOS PARA *Brycon falcatus* E ANÁLISE CITOGENÉTICA EM *Oreochromis niloticus*

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera
Barrero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Angela Rocio Poveda Parra
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ivone Yurika Mizubuti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Joana Neres da Cruz Baldissera
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas
Faculdade de Apucarana - FAP

Londrina, 27 de fevereiro de 2019.

Para todas as realizações há um momento certo; existe sempre um tempo apropriado para todo o propósito debaixo do céu.

Há o tempo de nascer e a época de morrer, tempo de plantar e o tempo de arrancar o que se plantou,

tempo de matar e tempo de curar, tempo de derrubar e tempo de edificar,
tempo de chorar e tempo de rir, tempo de lamentar e tempo de dançar,
tempo de atirar pedras e tempo de guardar as pedras; tempo de abraçar e tempo de se apartar do abraço,

tempo de buscar, e tempo de desistir, tempo de conservar e tempo de jogar fora,
tempo de rasgar, e tempo de costurar; tempo de ficar quieto e tempo de expressar o que se sente,

tempo de amar e tempo de odiar, tempo de lutar e tempo de estabelecer a paz.

Que proveito o trabalhador tira de sua fadiga diária?

Observo a tarefa que Deus deu aos seres humanos para que dela se ocupem.

Ele fez tudo apropriado ao seu tempo. Também colocou no coração do homem o desejo profundo pela eternidade; contudo, o ser humano não consegue perceber completamente o que Deus realizou.

Sendo assim compreendi que não pode haver felicidade para o homem a não ser a de alegrar-se e fazer o bem durante toda a sua vida.

E, descobri também que a própria condição de comer, beber e desfrutar das recompensas pelo seu trabalho é um presente de Deus.

Compreendi ainda que tudo o que Deus faz dura para sempre: ao que Deus criou nada se pode acrescentar, de igual modo, nada se pode subtrair. Esse é o método de Deus para fazer com que a humanidade o ame reverentemente.

Assim, tudo o que há, já havia existido; o que será já existiu antigamente; Deus pode renovar o que já passou!

Observei que debaixo do sol: No lugar da justiça prevalece a malignidade, no lugar da honestidade, domina a impiedade.

Então passei a refletir: “Ao justo e ao perverso Deus os julgará, porque aqui na terra há uma época apropriada para todo o propósito e um lugar para cada ação”!

Quanto à humanidade penso assim: “Deus prova os homens para que percebam que são tão mortais quanto os animais”!

Porquanto a sorte do ser humano e a do animal são idênticas: como morre um, assim morre o outro, e ambos têm o mesmo espírito, o mesmo fôlego de vida; de fato, o ser humano não tem vantagem alguma sobre os animais. E, assim, tudo não passa de uma grande ilusão!

Tudo e todos se dirigem para o mesmo fim: tudo vem do pó e tudo retorna ao pó.

Quem pode afirmar que o alento, o espírito humano, sobe às alturas e que o fôlego do animal desce à terra?

Considerando tudo isso, cheguei à conclusão de que não existe nada melhor para o ser humano do que ser feliz no trabalho que realiza e desfrutar dos seus resultados; afinal essa é a sua recompensa. Porquanto, quem de nós tem o poder de saber o que vai acontecer depois da nossa morte?

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, aos meus irmãos, aos meus sobrinhos, a minha avó, aos meus amigos, colegas de grupo NEPAG e LACA, aos orientadores Prof. Nelson e Profa. Ana Lúcia.

DEDICO A VOCÊS ESSA NOVA CONQUISTA EM MINHA VIDA!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me deu o dom da vida e a oportunidade de realizar mais um sonho, e por me acompanhar em todos os momentos.

Aos meus pais, Idalino Ferreira da Penha e Evanil Fátima dos Santos, pela força psicológica e financeira, confiança, segurança, exemplo, ensinamentos e amor, que me fizeram aguentar firme todos os momentos vividos durante essa jornada.

Aos meus irmãos Márcio Antônio dos Santos e Dieila dos Santos Penha, e aos meus sobrinhos João Victor da Cruz dos Santos e Juliana Cristina da Cruz dos Santos, pelos momentos de alegria nas horas de descanso que estive ao lado deles.

Aos meus grandes amigos (família que o coração escolhe) Melissa Porto, Thais Rodrigues, Adriana Alves, Fagner Lemos, Paulo Colle, Eduardo Moreira, Leandro Medeiros, Clayton Guimarães, Bruno Deniel, Nelsa Silva, Lurdes Oliveira, Marisa Almeida, Eliane Casatte, Luciene Alves, Nuno Eglío, pelas alegrias compartilhadas e pelo apoio durante o árduo percurso.

Ao meu avô (in memoria) e a minha avó Maria, tios e tias, primos e primas que nos momentos de encontro sempre me alentaram com uma palavra de ternura e força.

As minhas companheiras caninas Xuxa e Estopinha que se mantiveram fiéis ao meu lado durante as árduas horas de estudo.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal oportunidade de realização do Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Aos professores do Programa em Ciência Animal, e Genética e Biologia Molecular pela disposição em ensinar, possibilitando a conclusão deste trabalho.

Minha eterna gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Nelson Maurício Lopera Barrero, que não hesitou em momento algum em me estender a mão no momento que mais precisei durante esse árduo percurso. Obrigado pela paciência, atenção, compreensão, cobranças, conselhos e ensinamentos transmitidos durante o doutorado que sempre serão lembrados com admiração.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Ana Lucia Dias, pela atenção, paciência e ensinamentos que foi de grande importância para que este trabalho fosse realizado. E pelas palavras doces e abraços que me fizeram voltar a acreditar que a área acadêmica tem espaço para humanos de verdade, que se importa com o bem-estar do outro.

Aos meus colegas de grupo (NEPAG) Andrei, Victor, Ed, Pâmela, Felipe e Ângela pela paciência e esforço durante a realização de todo o experimento a campo e laboratorial, pois sem eles não seria possível a conclusão do mesmo. E a todos os integrantes do Grupo!

Aos funcionários da Universidade, em especial aos Técnicos do Laboratório de Nutrição Animal, Fernando Massaro e Tania, pela paciência e palavras de conforto.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal Mariana Terra, Matheus, Joana, Analiza, Jaqueline, Ana Beatriz, Fábio e Luiz por terem cedido o espaço para realização das análises e pela ajuda.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização de meus estudos e contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

BIOGRAFIA

DIEGO DOS SANTOS PENHA, filho de Idalino Ferreira da Penha e Evanil Fátima dos Santos, nasceu na cidade de Ilha Solteira, estado de São Paulo, em 05 de Janeiro de 1987.

Em fevereiro de 2007, ingressou na Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina – Fundação Educacional de Andradina (FCAA/FEA), na cidade de Andradina, no estado de São Paulo, no curso de Medicina Veterinária, colando grau no mês de janeiro de 2012.

Em julho de 2013, iniciou o programa de Pós-Graduação, em nível Mestrado, na Universidade Federal da Grande Dourados, desenvolvendo estudos na área de Produção de Ruminantes, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2015.

Em março de 2015, iniciou o programa de Pós-graduação, em nível Doutorado, na Universidade Estadual de Londrina, desenvolvendo estudos na área de Aquicultura e Genética, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2019.

PENHA, Diego dos Santos. **Transferibilidade de primers heterólogos para *Brycon falcatus* e análise citogenética em *Oreochromis niloticus***. 2019. 61 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O aumento da população humana mundial reflete diretamente na demanda por alimentos, com destaque a produção e o consumo de peixe, importante fonte de proteína de alto valor nutricional e excelente quantidade e qualidade de vitaminas e minerais. O Brasil é o maior mercado da América Latina com grande e importante potencial de exploração econômica devido a grande variedade de peixes nativos e não nativos. Por isso, potencializar a produção de peixes através de ferramentas que gerem informações relevantes deve ser buscado. Marcadores moleculares microsatélites são importantes ferramentas para a obtenção de informações genéticas, que visam analisar a variabilidade genética de populações e estoques de peixes. Marcadores citogenéticos auxiliam na identificação de espécies e melhor conhecimento cariotípico, facilitando o aprimoramento de cultivo de espécies. *Brycon falcatus* tem grande importância socioeconômica e biológica no Brasil, porém, o conhecimento genético da espécie ainda é escasso. *Oreochromis niloticus* é destaque na produção aquícola mundial e brasileira, principalmente devido ao emprego e desenvolvimento de programas de melhoramento genético. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a transferibilidade de primers heterólogos para *Brycon falcatus*, e analisar citogeneticamente *Oreochromis niloticus* variedade Tilamax. Foram avaliados 28 primers heterólogos aplicados em 22 indivíduos de *Brycon falcatus* amostrados ao longo do Rio Araguaia no Estado do Mato Grosso, a partir de fragmentos de nadadeira caudal (0,5 cm² aproximadamente). Análise de amostras de sangue de 40 indivíduos de *Oreochromis niloticus* (16 indivíduos da geração de reprodutores (G7), 10 indivíduos da geração subsequente (G8) e 14 indivíduos comerciais (plantel comercial – PC)), provenientes da Estação de Piscicultura Codapar/UEM, no estado do Paraná, também foram analisadas. Primers heterólogos de sete espécies diferentes apresentaram resultados satisfatórios de amplificação cruzada com *B. falcatus* BoM5 (*B. opalinus*); Bh8, Bh13 e Bh16 (*B. hilarii*); Borg59 (*Brycon orbignyanus*); Par80 (*Prochilodus argenteus*) e Cm1A8 (*Colossoma macropomum*). Primers com ausência de amplificação, inespecificidade ou monomorfismo, foram excluídos das análises. Os parâmetros genéticos e o PIC (Conteúdo de informação polimórfica) demonstraram a viabilidade na utilização dos primers para análises genéticas populacionais. Os resultados validaram a utilização de primers de diferentes espécies e gêneros em *B. falcatus*, o que viabilizará a realização de futuros estudos genéticos nessa espécie, colaborando para melhor entendimento de amplificação cruzada ou até o desenvolvimento de futura amplificação específica. Em *Oreochromis niloticus* os resultados revelaram que as gerações (G7 e G8) e o plantel comercial (PC) apresentaram número diplóide (2n) igual 44, as regiões organizadoras de nucléolos pela impregnação de nitrato de prata (AgRONS) foram evidenciadas em até quatro cromossomos e a hibridização fluorescente *in situ*, com sonda de DNAr 18S, detectou sinais em 5 cromossomos, localizados em posição terminal do braço curto. A heterocromatina, pela técnica de banda C, teve ampla distribuição em regiões centroméricas, ricas em pares de base CG (citosina e guanina). Os resultados do presente estudo coincidem com os dados disponíveis na literatura e não apresentaram diferenças quanto às avaliações citogenéticas. Não foram observadas alterações nas características cromossômicas das gerações e o plantel comercial analisados de *Oreochromis niloticus* (variedade Tilamax).

Palavras-chave: Amplificação cruzada. Hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Marcadores moleculares. Matrinxã.

PENHA, Diego dos Santos. **Transferability of heterologous primers for *Brycon falcatus* and cytogenetic analysis in *Oreochromis niloticus***. 2019. 61 p. Thesis (Doctoral Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The increase in the world's human population directly reflects the demand for food, especially fish production and consumption, an important source of protein with high nutritional value and excellent quantity and quality of vitamins and minerals. Brazil is the largest market in Latin America with great and important potential for economic exploitation due to the wide variety of native and non-native fish. Therefore, enhancing fish production through tools that generate relevant information should be sought. Microsatellite molecular markers are important tools for obtaining genetic information to analyze the genetic variability of fish populations and stocks. Cytogenetic markers assist in the identification of species and better karyotypic knowledge, facilitating the enhancement of species cultivation. *Brycon falcatus* has great socioeconomic and biological importance in Brazil, however, the genetic knowledge of the species is still scarce. *Oreochromis niloticus* is prominent in world and Brazilian aquaculture production, mainly due to the use and development of breeding programs. The present work aimed to evaluate the transferability of heterologous primers to *Brycon falcatus*, and to cytogenetically analyze *Oreochromis niloticus* variety Tilamax. Twenty-eight heterologous primers applied to 22 *Brycon falcatus* individuals sampled along the Araguaia River in Mato Grosso State were evaluated from caudal fin fragments (approximately 0.5 cm²). Analysis of blood samples from 40 individuals of *Oreochromis niloticus* (16 individuals from breeding generation (G7), 10 individuals from subsequent generation (G8) and 14 commercial individuals (commercial squad - PC)) from Codapar / UEM Fish Farming Station, in the state of Paraná, were also analyzed. Heterologous primers of seven different species showed satisfactory results of *B. falcatus* BoM5 (*B. opalinus*) cross amplification; Bh8, Bh13 and Bh16 (*B. hilarii*); Borg59 (*Brycon orbignyanus*); Par80 (*Prochilodus argenteus*) and Cm1A8 (*Colossoma macropomum*). Primers with no amplification, nonspecificity or monomorphism were excluded from the analysis. Genetic parameters and PIC (Polymorphic Information Content) demonstrated the feasibility of using primers for population genetic analysis. The results validated the use of primers of different species and genera in *B. falcatus*, which will enable future genetic studies in this species, contributing to a better understanding of cross amplification or even the development of future specific amplification. In *Oreochromis niloticus* the results revealed that the generations (G7 and G8) and the commercial squad (PC) presented diploid number (2n) equal to 44, the nucleolus organizing regions by silver nitrate impregnation (AgRONS) were evidenced in up to four chromosomes. and in situ fluorescent hybridization with 18S rDNA probe detected signals on 5 chromosomes, located in the terminal position of the short arm. Heterochromatin, by C band technique, was widely distributed in centromeric regions, rich in CG base pairs (cytosine and guanine). The results of the present study coincide with the data available in the literature and showed no differences regarding cytogenetic evaluations. No changes were observed in the chromosomal characteristics of the generations and the commercial squad of *Oreochromis niloticus* (Tilamax variety).

Keywords: Cross-amplification. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Matrinxã. Molecular markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Produção mundial de proteína animal (milhões/t).....	16
Figura 2 – Exemplar de <i>Brycon falcatus</i> , oriundo da bacia do Araguaia	19
Figura 3 – Exemplar de <i>Oreochromis niloticus</i> (variedade Tilamax).....	20
Artigo B – Caracterização cromossômica em três gerações de tilápia da variedade Tilamax	
Figura 1 – Cariótipo com coloração convencional de Giemsa de <i>Oreochromis niloticus</i> (variedade Tilamax) mostrando $2n=44$	54
Figura 2 – Metáfases somáticas de <i>Oreochromis niloticus</i> (variedade Tilamax), submetidas à impregnação pelo nitrato de prata (AgRONS) e FISH com a sonda de DNAr 18S	55
Figure 3 – Metáfases somáticas de <i>Oreochromis niloticus</i> (variedade Tilamax) com bandamento C e coloração de DAPI (A) e CMA3 evidenciando padrão de distribuição da heterocromatina CMA3+ em regiões centroméricas e algumas terminais, provavelmente relacionadas às NORs	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Produção aquícola brasileira em toneladas (t), em 2017 e 2018	18
Artigo A – Transferibilidade de primers heterólogos em <i>Brycon falcatus</i>	
Tabela 1 –Relação de primers utilizados de <i>Brycon falcatus</i> por meio da transferibilidade de primers heterólogos	41
Tabela 2 –Caracterização dos sete primers com bons resultados de amplificação	43
Tabela 3 –Número de alelos (N_a), número de alelos efetivos (N_e), riqueza alélica (R_a), Heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), teste de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_w) e coeficiente de endogamia (F_{is}) calculados para os sete primers que apresentaram bons resultados de amplificação.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag-NOR	Regiões organizadoras de nucléolo pela impregnação por prata
AMOVA	Análise de Variância Molecular
AT	Adenina-Timina
CG	Citosina-Guanina
G7	Geração sete
G8	Geração oito
PC	Plantel comercial
FAO	Food and Agriculture Organization
Fis	Índice de fixação
He	Heterozigosidade Esperada
Ho	Heterozigosidade Observada
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Na	Número de Alelos
Ne	Número de Alelos efetivos
NOR	Regiões Organizadoras de Nucléolos
Pb	Pares de Bases
PIC	Conteúdo de Informação de Polimorfismo
TA °C	Temperatura de Anelamento
Ra	Riqueza alélica

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	AQUICULTURA MUNDIAL.....	16
2.2	PISCICULTURA NO BRASIL.....	17
2.3	<i>BRYCON FALCATUS</i>	19
2.4	TILÁPIA.....	20
2.5	PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO	21
2.6	MARCADORES MOLECULARES	23
2.7	MARCADORES CITOGENÉTICOS	24
	REFERÊNCIAS	25
3.	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4.	ARTIGO A – Transferibilidade de primers heterólogos em <i>Brycon falcatus</i>	39
6.	ARTIGO B – Análise citogenética de plantel comercial (PC) e duas gerações (G7, G8) de <i>Oreochromis niloticus</i> variedade Tilamax	50

1. INTRODUÇÃO

A população humana mundial está aumentando e esse fato reflete no aumento da demanda por alimentos, principalmente alimentos saudáveis. Resultado disso é o aumento da produção em diversos segmentos, tendo importante destaque a produção e o consumo de pescado. A carne de peixe é importante fonte de proteína e segundo SAKABE *et al.* (2013) considerável fonte de gordura insaturada, ou seja, no controle de triglicérides e colesterol. SARTORI e AMÂNCIO (2012) destacam o alto valor nutricional e a excelente quantidade e qualidade de vitaminas e minerais.

Mesmo diante de significativos benefícios o consumo *per capita* de peixes pelo brasileiro não chega a 10 kg/habitante/ano, muito inferior à média mundial de 20 kg/habitante/ano (PEIXE BR, 2019).

Diante do cenário apresentado, o mercado de pescado apresenta grande capacidade de desenvolvimento, a fim de agregar valor ao seu produto e aumentar sua oferta ao consumidor final. A história tem mostrado que a aquicultura vem elevando sua responsabilidade na produção mundial de pescado, onde no ano de 2014 forneceu mais peixe para consumo humano do que a pesca de captura, com projeção de 60% dos peixes para consumo humano até 2030 (FAO, 2018).

O Brasil com os seus mais de 200 milhões de habitantes é o maior mercado da América Latina e um dos maiores do mundo, e tem como fator de impacto positivo seu vasto território com grande capacidade na produção de grãos e ração (KUBITZA, 2013). Além disso, extensa disponibilidade hídrica, com grande e importante variedade de peixes nativos de água doce com potencial de exploração econômica, que também pode ser explorado por peixes não nativos (ROCHA *et al.*, 2013; FAO, 2008). Por isso, potencializar a produção de peixes através de ferramentas que gerem informações relevantes deve ser buscado.

Segundo GASQUES *et al.* (2013) marcadores moleculares são importantes ferramentas para a obtenção de informações genéticas, que visam detectar espécies e/ou estudos evolutivos, além de analisar a variabilidade genética de populações. DIAS e GUILIANO-CAETANO (2003) destacam a abordagem eficiente e aplicabilidade da citogenética para auxiliar na identificação de espécies e filogenia; permitindo o melhor conhecimento cariotípico e facilitando o aprimoramento de cultivo de espécies (MOLINA e JACOBINA, 2013).

Brycon falcatus é uma das espécies mais consumidas e exploradas por

ribeirinhos, devido à sua excelente qualidade de carne, além de ser bioindicador natural devido sua extrema sensibilidade a alterações no ambiente (SANCHES e GALLETI, 2007), tornando sua conservação e diversidade genéticas primordiais para a manutenção da espécie (BERT *et al.*, 2002). *Oreochromis niloticus* é a segunda espécie de peixe mais produzida e configura entre as mais consumidas no mundo (FAO, 2018). É a espécie preferida pelos programas de melhoramento genético, pois apresenta parâmetros zootécnicos (ganho de peso, conversão alimentar e rendimento de filé) imprescindíveis aos produtores (EL-SAYED, 2006), além de sua carne atender as exigências dos consumidores.

Frente a estas situações, objetivou-se avaliar a transferibilidade de primers heterólogos para *Brycon falcatus*, e analisar citogeneticamente *Oreochromis niloticus* variedade Tilamax.

2. REVISÃO LITERATURA

2.1 AQUICULTURA MUNDIAL

A aquicultura continua crescendo mais rapidamente do que outros principais setores de produção de alimentos. Segundo dados recentes da FAO (2018), em 2017 foram produzidos 172 milhões de toneladas de Pescado (peixes de cultivo e peixes de captura), bem acima da carne suína (2^a colocada), responsável por 120 milhões de toneladas, tornando o pescado a proteína animal, mais produzida no planeta (Figura 1).

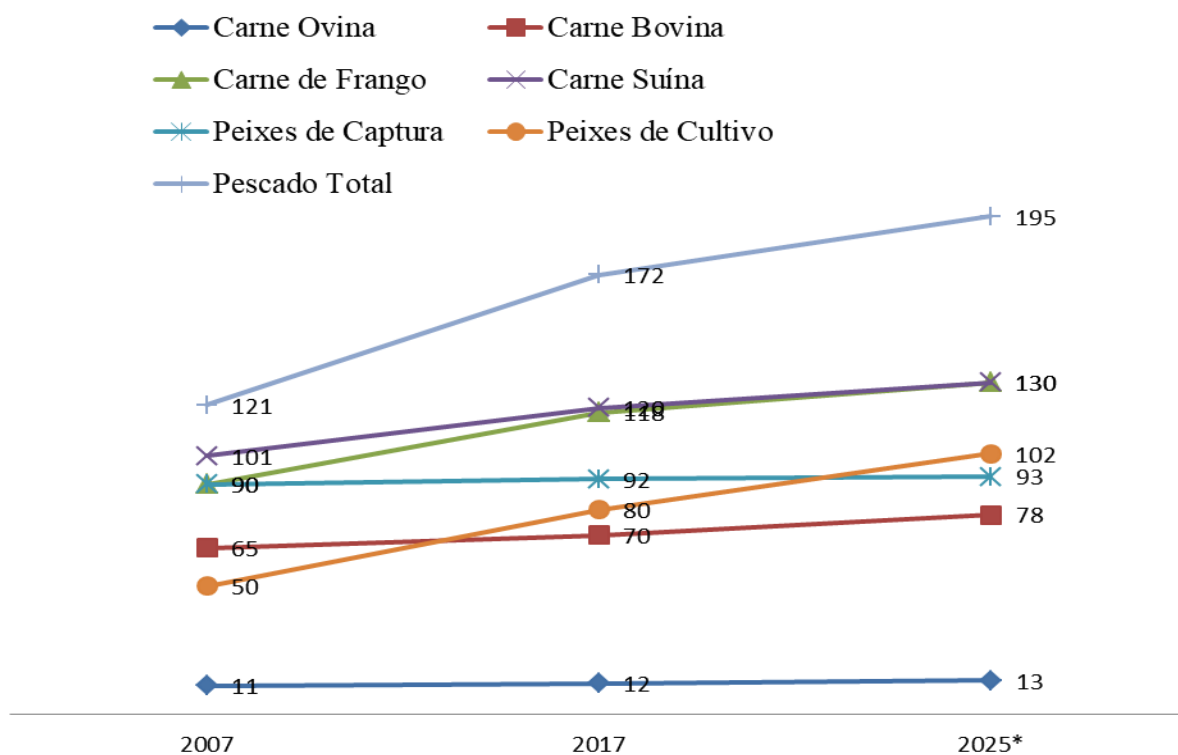


Figura 1: Produção mundial de proteína animal (milhões/t)

Fonte: FAO (2018)

Dentre os 15 maiores produtores aquícolas do mundo, apenas quatro países ocidentais (Noruega, Chile, Brasil e Estados Unidos) figuram no ranking, sendo os demais países orientais, com amplo destaque para a China (FAO, 2016). Esses dados evidenciam a boa posição do Brasil a nível mundial, porém, deixa evidente a deficiência no aproveitamento dos recursos naturais que possui e que colocam o país como um dos que apresentam maior potencial aquícola.

Aliada a essa importante fonte natural, a aquicultura agrega valores econômicos e sociais importantes, pois é fonte de proteína rica em gorduras poli-insaturadas (TACON, 2018), além de empregar milhões de pessoas (FAO, 2018).

2.2 PISCICULTURA NO BRASIL

A aquicultura continental no Brasil é essencialmente representada pela piscicultura, porém, devido à grande extensão territorial há determinada regionalização na

criação entre espécies. A tilápia é produzida em todos os estados brasileiros, porém em alguns estados da região Norte não há comercialização, mesmo assim, alcançou produção de 400.280 toneladas; seguida pelos peixes nativos (tambaqui, *Brycon ssp* e outros) produzidos em todo o país, com exceção dos estados de Ceará e Distrito Federal alcançou 287.910 toneladas e outras espécies representadas pela Carpa e Truta (34.370 toneladas) (PEIXE BR, 2019).

Dados recentes PEIXE BR (2019) identificam significativo crescimento nos últimos anos, em 2014 (578.800 toneladas), 2015 (638 mil toneladas), 2016 (640.410 toneladas), 2017 (691.700 toneladas) e 2018 (722.560), ou seja, 4,5% de crescimento entre os anos mais recentes. Com este resultado, a atividade voltou ao eixo normal de crescimento, após enfrentar inúmeras dificuldades entre os anos de 2015 e 2016 por conta, especialmente, da situação macroeconômica do Brasil (com redução dos investimentos, aumento do desemprego e queda no consumo de proteínas animais como um todo). Além disso, problemas climáticos esporádicos impactaram e continuam impactando diretamente os resultados das atividades aquícolas nas regiões Norte e Nordeste (Tabela 1).

Tabela 1. Produção aquícola brasileira em toneladas (t), em 2017 e 2018.

<i>REGIÃO</i>	<i>PRODUÇÃO (t)</i>	
	2017	2018
Nordeste	111.400	134.330
Sul	178.500	198.600
Sudeste	115.300	124.120
Centro-oeste	122.000	112.490
Norte	164.500	153.020
Total	691.700	722.560

Fonte: PEIXE BR (2019)

Esses dados refletem a situação da aquicultura brasileira, e se esse crescimento continuar ascendente é provável que a produção supere a previsão da FAO (2014) de 20 milhões de toneladas ano, antes de 2030. O Estado do Paraná hoje é o maior produtor de peixes de cultivo do Brasil (129.900 t), seguido por São Paulo (73.200 t), Rondônia

(72.800 t), Mato Grosso (54.510 t) e Santa Catarina (45.700 t) (PEIXE BR, 2019).

2.3 *BRYCON FALCATUS*

O gênero *Brycon* tem ampla distribuição geográfica sendo encontrado nas bacias hidrográficas do Amazonas, Paraná, Paraguai e Tocantins-Araguaia (ANTUNES *et al.*, 2010). Pertence a família Characidae e subfamília Bryconinae, que compreende 41 espécies do gênero *Brycon* (PAES, 2011).

Trata-se de espécies de peixes de médio até grande porte (LIMA, 2003), que vivem em pequenos cardumes, apresentam hábito alimentar onívoro (LIMA e CASTRO, 2000) e realizam migrações reprodutivas bastante extensas (GODOY, 1975; GOUDING, 1980). São muito apreciados na alimentação humana e pela pesca esportiva (LIMA, 2001), já que assim como o tucunaré e o dourado, apresentam grande resistência e voracidade durante sua captura.

Entre as espécies desse gênero destaca-se o *Brycon falcatus* (figura 2) conhecida popularmente como Matrinxã miúda ou voadeira (BINI, 2012).



Figura 2: Exemplo de *Brycon falcatus*, oriundo da bacia do Araguaia

Fonte: Abreu (2014)

É uma das espécies mais consumidas e exploradas comercialmente, além de atender a uma demanda de subsistência de ribeirinhos, devido à excelente qualidade da sua carne (SANCHES e GALETTI, 2007). Segundo LIMA (2004), a espécie *Brycon falcatus* é uma espécie de médio porte, atingindo 30 cm, e que apresenta várias listras estreitas

longitudinais e listras retas ao longo do corpo, nadadeiras peitorais e pélvicas claras, distinta mancha em forma de V no pedúnculo e nadadeira caudal.

Além da espécie supracitada, algumas espécies desse gênero apresentam grande destaque, como o Matrinxã (*B. amazonicus*), a Piracanjuba (*B. orbignyanus*) a Piabanha (*B. insignis*) e a Piraputanga (*B. hilarii*).

Apesar da importância ecológica e comercial esses peixes são extremamente sensíveis a alterações no ambiente natural (SANCHES e GALETTI, 2007).

2.4 TILÁPIA

A tilápia (Figura 3) é proveniente da África, pertence à família Cichlidae e, hoje, está disseminada por vários países (CARVALHO, 2006). De forma geral, está dividida em três gêneros: *Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*, sendo este último de grande importância na aquicultura mundial (MC ANDREW, 2000).



Figura 3: Exemplar de *Oreochromis niloticus* (variedade Tilamax).

Fonte: O autor

Foi introduzida no Brasil em meados da década de 50, através do programa oficial de produção de alevinos para povoamento dos reservatórios da região nordeste, além dos estados de Minas Gerais e São Paulo (MOREIRA *et al.*, 2007). Porém, conquistou ascensão apenas no início da década de 90, devido ao sucesso e aceitação dos mercados nacionais e internacionais (TOMAZELLI JÚNIOR e PHILIPPI, 2006). Esses relatos históricos se contrapõem em alguns pontos, pois há evidências da introdução dessa espécie em anos distintos, com objetivos não relacionados à produção de alimentos.

São peixes de água doce (MOHAMMED e URAGUCHI, 2013) com alta tolerância às condições ambientais (ADEYEMI, 2009) apresentam corpo achatado lateralmente e coberto por escamas com coloração acinzentada, olhos laterais, focinho curto, boca anterior dotada de pequenos dentes e rastros braquiais curtos e grossos; de crescimento rápido pode atingir 60 cm de comprimento e peso entre 4,3 a 9,5 kg (MORO *et al.*, 2013). Outras importantes características são citadas por YASUI *et al.* (2006) onde descrevem o hábito onívoro da espécie, alimentando-se de algas, plantas aquáticas, pequenos invertebrados e detritos de matéria orgânica. Comercialmente, sua produção é pautada em sistemas semi-intensivos e intensivos, sendo mais comum em viveiros escavados e em tanques-rede (SEBRAE, 2014).

Destaca-se pelas excelentes características que apresenta, além de atender muito bem as exigências do setor aquícola. Segundo a FAO (2018) é a segunda espécie de peixe mais produzida no mundo, atrás apenas da carpa. JORY *et al.* (2000) cita a tilápia como a espécie preferida tanto para o produtor quanto para o consumidor, pois agrega características de impacto: carne branca de textura firme; sabor agradável; ausência de espinhas em Y e gordura; alta taxa de crescimento; boa adaptação ambiental; crescimento rápido, entre outros.

Apesar do aumento significativo no consumo de pescado pelos brasileiros, ainda se consome uma quantidade pequena de peixe/habitante, por isso, buscar alternativas que estimulem o consumo de pescado devem ser adotadas. Pode-se citar entre as formas de atrair o consumidor à produção de produtos melhores elaborados e apresentados, além de preparo rápido e fácil. Essas exigências do mercado agregaram no item qualidade, outros aspectos como segurança alimentar, sabor, sustentabilidade, impacto ambiental e o bem-estar animal (VAN DE VIS *et al.*, 2003).

2.5 PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DA TILÁPIA

É bem difícil pensar em alta produtividade e qualidade e não associar a um programa de melhoramento genético. Para os peixes, esses programas tiveram início na década 70 em salmões e trutas nos Estados Unidos e Noruega (HILSDORF *et al.*, 2015). Porém, na aquicultura essa dificuldade é bem visível, quando a comparamos a outras espécies. A falta de estudos em programas de melhoramento genético em espécies aquáticas é devida, principalmente, a pouca ou quase ausência de informações disponíveis sobre as características

e ciclos de reprodução nas diferentes espécies cultivadas para a produção aquícola, além da dificuldade na captura de reprodutores e matrizes em ambientes naturais (GJEDREM, 2012).

No Brasil há um longo caminho a ser percorrido, mas foi dado o passo inicial no ano de 2005, numa parceria realizada entre a Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a “Wordfish Center” (órgão não governamental da Malásia), quando a linhagem GIFT (produto do cruzamento de quatro linhagens africanas selvagens e quatro linhagens domesticadas na Ásia) foi introduzida no Brasil (RIBEIRO e LEGAT, 2008). GUPTA e ACOSTA (2004) já citavam esse programa de melhoramento genético em peixes como o mais longo em desenvolvimento. Programa que continua em pleno desenvolvimento em 2019. E como consequência dessa parceria, para atender as exigências do mercado e diferenciar-se comercialmente, surgiu a variedade Tilamax, linhagem melhorada geneticamente a partir da GIFT.

Inicialmente, devido ao baixo crescimento da Tilápia, o foco do programa foi à taxa de crescimento obtida a partir da medida do ganho em peso diário, que após diversos estudos entre e dentro da família, obteve resultados satisfatórios após cinco gerações de seleção (12 a 17% por geração) (GUPTA e ACOSTA, 2004). Baseado no sucesso inicial, outras características passaram a ser avaliadas, como, medidas corporais (largura, largura caudal, altura, altura caudal, comprimento de cabeça, padrão e total) e mortalidade à idade comercial (OLIVEIRA *et al.*, 2010; RESENDE *et al.*, 2010). OLIVEIRA *et al.* (2012) ao avaliarem quatro anos de acasalamento das tilápias do programa de melhoramento da UEM, relataram ganhos genéticos de 4% ao ano, para as características ganho em peso diário e peso vivo.

A importância da utilização de indivíduos geneticamente superiores é fundamental para maximizar a produtividade em peixes. Neste sentido, o programa de melhoramento tem centrado seus estudos nas características de crescimento, parâmetros genéticos de tamanho à maturação, resistência à doenças, e características de conformação corporal, bem como a adaptação a diversos climas (EL-SAYED, 2006). Por isso, investir num sistema de coleta de informações eficiente é de extrema relevância, pois somente através dele que se podem identificar fatores ambientais que causam variação no desempenho e nas características físicas desses animais, e que se desconsiderados, poderiam conduzir a predições viciadas dos valores genéticos, interferindo na classificação dos animais, reduzindo a resposta à seleção.

2.6 MARCADORES MOLECULARES

Vários autores (NGAN e VAZZOLER 1976; VAZZOLER e NGAN 1989) afirmam que foi na década de 70 que se deu início aos primeiros trabalhos com genética de peixes no Brasil, com espécies marinhas, usando níveis de polimorfismos em proteínas, os quais mostraram poucas evidências de diferenciação. Os trabalhos com peixes de água doce tiveram predomínio apenas na década de 90 (SEKINE *et al.* 2002; ALMEIDA *et al.* 2003).

De acordo com DIZ (2005), para que seja obtido sucesso na produção alguns aspectos devem ser levados em consideração:

- 1) Genético reprodutivo, que avalia a viabilidade, permitindo a adaptação dessas populações selecionadas a diferentes ambientes e seleção artificial;
- 2) Científico, pois o conhecimento genético permite caracterizar genes e/ou combinações gênicas;
- 3) Ecológico ambiental, gerando equilíbrio e interação entre clima, fauna e flora; e histórico-cultural, sabido que a conservação de determinadas espécies ou populações representa um patrimônio genético de uma região, com um desenvolvimento às vezes paralelo ao das populações humanas.

Dentro desse contexto, os marcadores moleculares são importantes, pois potencializam a detecção e diferenciação entre populações muito próximas e as relações entre subespécies devido à sua rápida taxa mutacional. Trata-se de importante ferramenta para obtenção de informações genéticas que tem como finalidade analisar a variabilidade genética de populações, identificação de espécies ou estudos evolutivos (GASQUES *et al.*, 2013). Além de possibilitar estimativas de endocruzamento e parentesco. Segundo BENTSEN e OLESEN (2002), um bom manejo reprodutivo aliado a um marcador molecular, pode contribuir para a redução da endogamia dentro dos programas de melhoramento genético.

Entre os marcadores moleculares mais utilizados destacam-se os microssatélites, também denominados de Sequências Simples Repetidas (SSR - Simple Sequence Repeats) que consistem em pequenas sequências com um a oito nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* (ALAM e ISLAM, 2005). Apresentam alta eficiência de detecção e baixo custo. São encontrados com relativa abundância no genoma (CASTRO, 2015), além de identificado em procariotos e eucariotos (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017). Sua praticidade em ser amplificado por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) ainda facilita sua utilização (SCHLOTTERER, 2004), facilitando análises moleculares não invasivas.

Vários estudos demonstraram a efetividade do marcador microssatélites na

avaliação de populações e estoques de peixes. Em estudo realizado por HATANAKA *et al.* (2006) na represa de Três Marias no rio São Francisco, com a espécie *Prochilodus argenteus* mostraram grande número de alelos exclusivos e boa variabilidade genética, reforçando a coexistência de diferentes unidades reprodutivas na área estudada. Já MELO *et al.* (2006), ao estudar plantéis comerciais de Tilápia do Nilo, encontraram baixa variabilidade genética. BERDUGO e BARANDICA (2014) utilizaram as sequências de microssatélites para evidenciar a estruturação genética populacional em *Prochilodus magdalenae* no rio Magdalena na Colômbia, com alto grau de polimorfismo contrastando aos baixos níveis de Heterozigosidade observada.. Outros estudos moleculares, com sequências de microssatélites em *Prochilodus* corroboram o alto grau de conservação das regiões genômicas em diferentes populações desse gênero, assim como os dados de citogenética clássica (VICARI *et al.*, 2010; HATANAKA e GALETTI, 2004).

Por isso, entender estas diferenças, além dos componentes, ambiental e manejo são fundamentais, para o melhor conhecimento da diversidade genética das populações.

2.7 MARCADORES CITOGENÉTICOS

Os peixes representam o grupo mais diversificado e um dos mais interessantes para estudos da variabilidade genética e de evolução entre os vertebrados (NELSON, 1984) e são extremamente sensíveis a alterações no ambiente natural (SANCHES e GALETTI, 2007). Sabendo disso, é primordial que o pensamento e ação para a manutenção da espécie, estejam fundamentados no manejo sustentável, com aplicação e interação da biologia molecular e da citogenética.

Podem ser utilizadas como ferramenta em estudos de reprodução de animais de companhia, espécies selvagens e de produção, relacionadas à sexagem, conservação de raças e na determinação de anormalidades cromossômicas que podem prejudicar a reprodução. Segundo LOPEZ *et al.* (2008) com a utilização da citogenética é possível analisar a evolução da espécie e determinar a viabilidade genotípica, e, conseqüentemente, melhorar a produção. Panorama que vem se difundindo de forma concreta nos últimos anos diferente do que cita SANTI-RAMPAZZO *et al.* (2008), onde na década de 70, essas informações eram muito limitadas.

A citogenética é a parte da genética que estuda a função e o padrão estrutural cromossomal das espécies. Representando importante ferramenta para a

diferenciação entre as populações de peixes, pois apresenta precisão na determinação de algumas sequências de DNA em regiões específicas do cromossomo (MAISTRO *et al.*, 2000; YANO *et al.*, 2014). É dividida em clássica e molecular. A citogenética clássica tem como alicerce o processo de mitose, pela análise dos cromossomos com coloração convencional por Giemsa, análise das regiões organizadoras de nucléolo pela impregnação por prata (Ag-NOR) e análise das regiões heterocromáticas através do bandamento C (VICARI *et al.*, 2010; CIOFFI, 2013). A citogenética molecular utiliza técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para localizar sequências específicas de DNA nos cromossomos.

Estudos têm demonstrado que marcadores citogenéticos apresentam grande importância na produção animal. Apoiando trabalhos de pré-melhoramento e melhoramento PETY *et al.* (2018) ao analisarem cinco espécies de *Peckoltia* e uma espécie de *Ancistomus* da bacia amazônica observaram cariótipo aparentemente conservado ($2n = 52$), além de variações extensas no número e localização dos sítios de rDNA 18S entre as seis espécies analisadas. MANOSROI *et al.* (2003) ao analisarem os parentais e seus híbridos, oriundos do cruzamento entre *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus* observaram números diploides iguais, porém diferenças na constituição cariotípica, certificando a eficácia do uso de marcadores citogenéticos na diferenciação entre espécies.

A citogenética apesar de ser uma ciência antiga, eficiente, com metodologias relativamente simples, de baixo custo e de grande importância na produção animal, quando comparada aos estudos humanos, ainda é utilizada com pouca frequência, por isso, gerar novas informações voltadas para as ciências animais é de grande importância para despertar o interesse de profissionais da área e incentivar novos estudos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. Diversidade genética de populações naturais de *Brycon falcatus* (Muller e Troschel, 1844) nas bacias dos Rios Araguaia e Guaporé, Mato Grosso, Brasil. **Tese de Mestrado**, Universidade Estadual de Maringá, 2014.
- ADEYEMI, S. O. Food and feeding habits of some commercially important fish species in Gbedikere Lake, Bassa, Kogi State, Nigeria. **International Journal of Lake & River**. Vol. 2, p.31-36, 2009.
- ALAM, M.S.; ISLAM, M.S. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 246, n. 1-4, p. 151-160, 2005.

- ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Pisces). **Genetics and Molecular Biology**, vol. 26, p. 301-305, 2003.
- ANTUNES, R. S. P.; GOMES, V. N.; PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, R. A.; JULIOJR, H. F.; PRIOLI, L. M.; AGOSTINHO, C. S.; PRIOLI, A. J. Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.2, p.674-684, 2010.
- BENTSEN, H.B.; OLESEN, I. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. **Aquaculture**, v.204, p.349-359, 2002.
- BERDUGO, G. O. & BARANDICA, J. C. N. Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalena* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena river basin and its tributaries, Colombia. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 37, pag. 37–45, 2014.
- BERT, P. F.; JOUAN, I.; DE LABROUHE, D. T.; SERRE, F.; NICOLAS, P.; VEAR, F. **Theoretical and Applied Genetics**. Vol. 105, n. 6-7, pag. 985-993, 2002.
- BINI, E. Peixes do Brasil de rios, lagoas e Riachos. 1ª. Edição. **Homem-Passaro Publicações**, Itapema, p. 300, 2012.
- CARVALHO, E. D. Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes tributários do alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições limnológicas. **Relatório Científico - FAPESP**. v.22, n.4, p1-46, 2006.
- CASTRO, P. L. Contribuição genética e reprodutiva de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos aos sistemas de reprodução seminatural e extrusão. **Tese de Mestrado**, Universidade Estadual de Maringá, 2015.
- CIOFFI, M. B. Molecular Cytogenetics of Fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, vol. 141, n. 2-3, pag. 75-242, 2013.
- DIAS, A.L.; GIULIANO-CAETANO, L. **Citogenética de alguns grupos de peixes bacia do rio Tibagi**. In: MEDRI, E.M.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. A bacia do rio Tibagi. Universidade Estadual de Londrina, Londrina. p. 473-529, 2003.
- DIZ, A. E. Aplicación de microsátélites en estimativas de flujo génico y estructura poblacional de *Mytilus galloprovincialis*. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica, **Genética e Inmunología**, Universidade de Vigo, 2005.
- EL-SAYED, A.F. M. Tilapia culture. London: **CABI Publishing**, p. 293, 2006.
- FAO – Food and Agriculture Organization. **State of the World's Fisheries and Aquaculture**. Rome, 2008.

- FAO – Food and Agriculture Organization. The State of Food and Agriculture 2012: **Food systems for better nutrition**. Rome, 2014.
- FAO - Food and Agriculture Organization. **The State of World Fisheries and Aquaculture - Meeting the sustainable development goals**. Roma, 2018.
- FAO – Food and Agriculture Organization. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Contributing to food security and nutrition for all**. Rome, 2016.
- GASQUES, L. S.; BELONI, K. P.; OLIVEIRA, J. R. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do scielo. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 16, n. 1, p. 47-50, 2013.
- GJEDREM, T. Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: A personal opinion review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 12-22, p. 344-349. 2012.
- GODOY, M. P. Subordem Characoidei. In: Peixes do Brasil: Bacia do Rio Mogi Guassu. **Editora Franciscana**, Piracicaba, p. 539–552, 1975.
- GOULDING, M. The Fishes and The Forest: Explorations in Amazonian Natural History. **University of California Press**, Berkley, p. 280, 1980.
- GUPTA, M. V.; ACOSTA, B. O. From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. NAGA, **WorldFish Center Quarterly**, v. 27, n. 3-4, p. 4-14, 2004.
- HATANAKA, T. & GALETTI JR, P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, vol. 1829, n. 122, p. 239–244, 2004.
- HATANAKA, T.; SILVA, F.H.; GALETTI JR., P.M.. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, vol. 126, p. 153-159, 2006.
- HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; FREITAS, R. T. F. Desafios do melhoramento genético de organismos aquáticos. **Panorama da Aquicultura**, vol. 25, n. 147, p. 36-43, 2015.
- JORY, D. E.; ALCESTE, C.; CABRERA, T. R. Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norte América. **Panorama Acuicola**, Sonora, vol. 5, n. 5, p. 50-53, 2000.
- KUBITZA, F. O país do potencial travado em nome do ambiente. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, vol. 23, n. 139, p. 14-23, set./out., 2013.
- LIMA, F. C. T. Brycon gouldingi, a new species from the rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, vol. 15, p. 279-287, 2004.

- LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In Reis RE, Kullander SO, Ferraris *et al.* Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: **Edipucrs**, p. 174-181, 2003.
- LIMA, F.C.T. Revisão Taxonômica do gênero *Brycon* dos rios da América do Sul Cisandina (Pisces, Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Dissertação** (mestrado) Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, p. 296, 2001.
- LIMA, F.C.T.; CASTRO, R.M.C. *Brycon vermelha*, a New Species of Characid Fish From the Rio Mucuri, a Coastal River of Eastern Brazil (Ostariophysi, Characiformes). **Ichth Exp Fresh** vol. 11, p. 55-62, 2000.
- LOPEZ, D. D.; PALACIO, G. V.; CORTES, T. R.; ANGEL, M. O. Caracterización citogenética Del pez neotropical *Brycon henni*(Pisces, Characidae).**Rev. Biol. Trop.**, vol. 56, n.4, p.1619-1628, 2008.
- MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2000). Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. **Genetica**, vol. 108, p. 119–125, 2000.
- MANOSROI, J.; PETCHJUL, K.; MEVATEE, U.; MANOSROI, A. Karyotype analysis of the hybrid, Thai Red Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn. X *Oreochromis mossambicus* Linn.). **On Line Journal of Biological Sciences**, vol. 3, nº 7, p. 612-617, 2003.
- MC ANDREW, B. J. Evolution, phylogenetic relationship and biogeography. In: BEVERIDGE, M. C. M.; MC ANDREW, B. J. Tilapias: Biology and Exploitation. Kluwer. Boston: **Academic Publishers**, cap.1, p.1-3, 2000.
- 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.58, p.87-93, 2006.
- MOHAMMED, E. Y.; URAGUCHI, Z. B. Impacts of climate change on fisheries: implications for food security in SubSaharan Africa. In: Hanjra, M. A. (eds.) Global Food Security, **Nova Science Publishers**, p. 114-135, 2013.
- MOLINA, W.F.; JACOBINA, U.P. "Protocolos citogenéticos e perspectivas biotecnológicas voltadas à piscicultura marinha e preservação." **Biota Amazônia** vol. 3, n.2, p. 155-168, 2013.
- MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W.; da SILVA, J. V.; de SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.

- MORO, G. V.; RODRIGUES, A. P. O.; TORATI, L. S. *et al.* Anatomia e fisiologia de peixes de água doce. IN: 47 RODRIGUES, A. P. O. *et al.* Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos. 1ª Edição. Brasília, DF: **Ed. Embrapa**, p.301-336, 2013.
- n-3 and n-6. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.48, p.313-319, 2013.
- NELSON, J. S. **Fishes of the world**. John Wiley & Sons Inc. p. 523, 1984.
- NGAN, P. V.; VAZZOLER, A. E. A. Serological and biochemical studies. **Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes**, vol. 40, p. 681-682, 1976.
- OLIVEIRA, C. A. L.; RESENDE, K. E.; LEGAT, A. P.; RIBEIRO, R. P. Melhoramento genético de peixes no Brasil: Situação atual e perspectivas. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, vol. 20, p. 237-249, 2010.
- OLIVEIRA, C. A. L.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JR, D. P.; POVH, J. A.; RESENDE, E. K. Melhoramento genético de peixes. Uma realidade para a piscicultura brasileira. Panorama da Aquicultura, vol. 22, n. 139, p. 38-47, 2012.
- PAES, A. D. N. V. A. Caracterização citogenética das espécies matrinxã (*Brycon amazonicus*), piraputanga (*Brycon hilarii*) e sua geração filial, utilizados na piscicultura brasileira. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Campus de Botucatu, p. 97, 2011.
- PEIXE BR (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA). **Anuário da piscicultura 2019**. PEIXE BR, 2019.
- PETY, A. M.; CARDOSO, A. L.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J.; SOUSA, L. M.; NORONHA, R. C. R. Localização *in situ* de sítios ribossômicos em *Peckoltia* e *Ancistomus* (Loricariidae: Hypostominae) da bacia Amazônica. **Zebrafish**, Vol. 15, N. 3, 2018.
- RESENDE, E. K.; OLIVEIRA, C. A. L.; LEGAT, A. P.; RIBEIRO, R. P. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal (SBMA), vol. 8. **Anais...** Maringá, PR, 2010.
- RIBEIRO, R.P.; LEGAT, A.P. Delineamento de programas de melhoramento genético de espécies aquícolas no Brasil. **In: Documentos/Embrapa Meio-Norte**, p.25, 2008.
- ROCHA, C. M. C.; RESENDE, E. K.; ROUTLEDGE, E. A. B.; LUNDSTEDT, L. M. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, vol. 48, n. 8, p. 4-6, ago., 2013.
- SAKABE, R.; MORAES, F. R.; BELO, M. A. A.; MORAES, J. E. R.; PILARSKI, F. Kinetics of chronic inflammation in Nile tilapia supplemented with essential fatty acids n-3 and n-6. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 48, p.313-319, 2013.

- SANCHES, A., & GALETTI, P. M., Jr. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, vol. 67, n. 4, p. 889-895, 2007.
- SANTI-RAMPAZZO, A. P.; NISHIYAMA, P. B.; FERREIRA, P. E. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Intrapopulational polymorphism of nucleolus organizer regions in *Serrapinnus notomelas* (Characidae, Cheirodontinae) from the Paraná River. **J Fish Biol**, p. 72, 2008.
- SARTORI, A. G. O.; AMÂNCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, vol.19, n. 2, p.83-93, 2012.
- SCHLOTTERER, S. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? **Genetics** vol. 5, p. 63-69 , 2004.
- SEBRAE – SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. Criação de tilápias em tanques escavados. Natal: **Sebrae**, 2014.
- SEKINE, E. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; JÚLIO-JR, H. F. Genetic differentiation among population of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by Guaira falls in the Paraná River. **Acta Scientiarum**. Vol. 24, p. 507-512, 2002.
- TACON, A. G. J.; METIAN, M. Food Matters: Fish, Income, and Food Supply—A Comparative Analysis. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, vol. 26, n. 1, p. 15–28, 2018.
- TOMAZELLI JÚNIOR, O.; PHILIPPI, L. M. N. O brasileiro é consumidor de pescado. **Panorama da Aquicultura**, vol.16, n.95, p.21, 2006.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PASSAIA, G.; FREDERICO, C.; MENCK, M. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, p. 181, 2017.
- VAN DE VIS, H. KESTIN, S., ROBB, D., OEHLENSCHLAGER, J., LAMBOOIJ, B., MUNKNER, W., KUHLMANN, H., TEJADA,M., HUIDOBRO, A., OTTERA, H., ROTH, B. SORENSEN, N.K., AKSE, L., BYRNE, H. NESVADBA, P., Is humane slaughter of fish possible for industry? **Aquaculture Research**, vol. 34, 2003.
- VAZZOLER, A. E. A. M.; & NGAN, P. V. Padrões eletroforéticos de proteínas gerais do cristalino de *Micropogonias furnieri* (Desmaret, 1823) da costa sudeste-sul do Brasil: Estudo populacional. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, vol. 37, p. 21-28, 1989.
- VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes:

Methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology*, vol. 76, p. 1094–1116, 2010.

YANO, C. F.; POLTRONIERI, J.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F.; LIEHR, T.; DE BELLO CIOFFI, M. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. *PLoS ONE*, vol. 9, n. 3, p. 90-94, 2014.

YASUI, G. S.; SANTOS, L. C.; FILHO, O. P. R.; SHIMODA, E.; ARIAS-RODRIGUEZ, L. Cultivo monossesual de tilápias: importância e obtenção por sexagem e inversão sexual. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, vol. 51, n.1, p.37-51, 2006.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *Brycon falcatus* por meio da transferibilidade de primers heterólogos, e analisar citogeneticamente *Oreochromis niloticus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *Brycon falcatus* por meio da transferibilidade de primers heterólogos, em uma população selvagem amostrada ao longo do Rio Araguaia, no município de Nova Mutum, no Estado do Mato Grosso, Brasil.
- Analisar *Oreochromis niloticus*, quanto à posição de marcadores citogenéticos, o número e a morfologia cromossômica em uma geração reprodutora (geração 7 – G7), uma geração parental (geração 8 – G8) e um plantel comercial (PC), provenientes da Estação de Piscicultura Codapar/UEM localizada no distrito de Floriano, Maringá, Paraná, Brasil.

ARTIGO A

Transferibilidade de primers heterólogos em *Brycon falcatus*

Resumo - O gênero *Brycon* compreende um grupo de espécies de peixes de grande importância socioeconômica e biológica no Brasil, entretanto, o conhecimento genético dessas espécies é escasso, principalmente no caso do *Brycon falcatus*. Diante disso, objetivou-se verificar a transferibilidade de 28 primers heterólogos em *B. falcatus*. Foram avaliados primers heterólogos provenientes das espécies *B. opalinus*, *B. hilarii*, *B. insignis*, *B. orbignyana*, *Prochilodus argenteus*, *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus* e *Colossoma macropomum*. Os primers com melhor reprodutibilidade foram aplicados a uma amostra de 22 indivíduos e os parâmetros genéticos foram calculados. Sete primers apresentaram resultados satisfatórios de amplificação cruzada com *B. falcatus*: BoM5 (*B. opalinus*), Bh8, Bh13 e Bh16 (*B. hilarii*); Borg59 (*Brycon orbignyana*); Par80 (*Prochilodus argenteus*) e Cm1A8 (*Colossoma macropomum*). Os primers das outras espécies apresentaram ausência de amplificação, inespecificidade ou monomorfismo, sendo excluídos das análises. Os parâmetros genéticos e o PIC (Conteúdo de informação polimórfica) demonstraram a viabilidade na utilização dos primers para análises genéticas populacionais. Os resultados revelaram a possibilidade da utilização de primers de diferentes espécies e gêneros em *B. falcatus*, o que viabilizará a realização de estudos genéticos nessa espécie.

Termos para indexação: amplificação cruzada, conservação genética, marcadores moleculares, Matrxã

Transferability of heterologous primers in *Brycon falcatus*

Abstract - The *Brycon* genus comprises of a group of fish species of great socioeconomic and biological importance in Brazil, however, the genetic knowledge of these species is scarce, especially in the case of *Brycon falcatus*. Therefore, the objective was to verify the transferability of 28 heterologous primers in *B. falcatus*. Heterologous primers from *B. opalinus*, *B. hilarii*, *B. insignis*, *B. orbignyana*, *Prochilodus argenteus*, *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus* and *Colossoma macropomum* species were evaluated. The best reproducible primers were applied to a sample of 22 individuals and the genetic parameters were calculated. Seven primers showed satisfactory results of *B. falcatus* cross amplification: BoM5 (*B. opalinus*), Bh8, Bh13 and Bh16 (*B. hilarii*); Borg59 (*Brycon orbignyana*); Par80 (*Prochilodus argenteus*) and Cm1A8 (*Colossoma macropomum*). Primers of other species showed no amplification, nonspecificity or monomorphism, being excluded from the analysis. Genetic parameters and PIC (Polymorphic Information Content) demonstrated the feasibility of using primers for population genetic analysis. The results revealed the possibility of using primers of different species and genera in *B. falcatus*, which will allow the accomplishment of genetic studies in this species.

Index terms: cross-amplification, genetic conservation, Matrxã, molecular markers

Introdução

O Brasil possui 12% da reserva de água doce disponível do planeta, bem como 25 mil rios em todo o país (Saint-Paul, 2017). Segundo Latini *et al.* (2016) o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta, concentrando entre 15 e 20% de todas as espécies descritas em âmbito mundial. Queiroz *et al.* (2013) relatam a rica e diversa biodiversidade na bacia amazônica, estimando-se que em seus rios existam três mil espécies diferentes de peixes. Porém, toda essa potencialidade, em particular da bacia Amazônica ainda é pouco conhecida e explorada.

Brycon falcatus conhecida popularmente como Matrinxã miúda ou voadeira (Bini, 2012) está presente no rio Araguaia, que juntamente com os rios Tocantins e das Mortes, formam a bacia Tocantins-Araguaia. É uma das espécies mais consumidas e exploradas por ribeirinhos, devido à sua excelente qualidade de carne, além de ser bioindicador natural devido sua extrema sensibilidade a alterações no ambiente (Sanches e Galletti, 2007), tornando sua conservação e diversidade genéticas primordiais para a manutenção da espécie (Bert *et al.*, 2002). Segundo Rossini *et al.* (2010) aspectos biológicos, ecológicos, biogeográficos e genéticos, em peixes, ainda são escassos e pouco expressivos, dificultando adequada e clara elucidação da espécie.

E para melhor conhecimento genético da espécie, faz-se necessário uso de marcadores moleculares, com destaque aos microssatélites; importante ferramenta de utilização para a obtenção de informações genéticas (Gasques, *et al.*, 2013). Para tanto, é primordial que alelos presentes em diferentes locus de microssatélites, obedeçam a um padrão genotípico específico. Segundo Beebee e Rowe (2004) é necessário à construção de marcadores moleculares que possuam a diversidade necessária para a avaliação da estruturação genética da espécie, ou através da utilização de primers heterólogos, ou seja, primers desenvolvidos para outras espécies, mas que possam ser utilizados em espécies geneticamente relacionadas.

O presente estudo teve como objetivo avaliar indivíduos selvagens de *Brycon falcatus*, por meio da transferibilidade de *B. opalinus*, *B. hilarii*, *B. insignis*, *B. orbignyanus*, *Prochilodus argenteus*, *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus* e *Colossoma macropomum*.

Material e métodos

Fragmentos de nadadeira caudal (0,5 cm² aproximadamente) foram coletados de 22 indivíduos selvagens de *Brycon falcatus* amostrados ao longo do Rio

Araguaia no Município de Nova Mutum/MT, cidade localizada nas coordenadas latitude 13°49'44"S e longitude 56°04'56"W (IBGE, 2014). As amostras foram conservadas em álcool 70% para posterior análise em laboratório. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA-UEL nº 21383.2017.93).

A extração de DNA foi realizada conforme a metodologia descrita por Lopera Barrero *et al.* (2008). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose a 1%, corada com SYBR Safe™ DNA (Invitrogen). A eletroforese foi realizada em tampão TBE 0,5 X (Tris-HCl 250 mM, ácido bórico 30 mM e EDTA 41,5 mM) durante (1) uma hora, a 70 V. O gel foi observado com auxílio de um trans-iluminador UV e a imagem foi capturada pelo sistema de foto-documentação.

Foram testados 28 primers, que foram selecionados seguindo critério de disponibilidade e de resultados obtidos em experimentos anteriores (Tabela1).

Tabela 1. Relação de primers utilizados de *Brycon falcatus* por meio da transferibilidade de primers heterólogos.

Primers	Espécie	Descrito	Gênero
BoM5 e BoM13	<i>B. opalinus</i>	Barroso (2003)	<i>Brycon</i>
Bh5, Bh6, Bh8, Bh13 e Bh16	<i>B. hilarii</i>	Sanches e Galetti (2006)	
Bc48-10	<i>B. insignis</i>	Matsumoto e Hilsdorf (2009)	
Borg13 e Borg59	<i>B. orbignyanus</i>	Souza <i>et al.</i> (2018)	
Par12, Par14, Par15, Par21, Par43, Par80 e Par82	<i>P. argenteus</i>	Barbosa (2006) e Barbosa (2008)	<i>Prochilodus</i>
Pli30	<i>P. lineatus</i>	Yazbeck e Kalapothakis (2007)	
Pme2, Pme4, Pme5, Pme20 e Pme28	<i>P. mesopotamicus</i>	Calcagnotto (2001)	<i>Piaractus</i>
Cm1A8, Cm1A11, Cm1C8, Cm1D1 e Cm1E3	<i>C. macropomum</i>	Santos <i>et al.</i> (2009)	<i>Colossoma</i>

O DNA foi amplificado em volume de reação de 15 μL , com 1X tampão Tris-KCl, 2,0 mmol L^{-1} de MgCl_2 , 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada primer (*Foward e Reverse*), 0,2 mmol L^{-1} de dNTP, 1U de Platinum Taq DNA Polimerase e 30 ng de DNA-alvo. A PCR foi realizada nas seguintes condições: 4 minutos de desnaturação a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos para desnaturação inicial a 94°C, 30 segundos a temperatura específica de anelamento para cada primer e uma extensão de 1 minuto a 72°C. Posteriormente, foi realizada uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (acrilamida: bisacrilamida – 29:1), ureia 6M, em tampão TBE 0,5X com 180 V e 250 mA por oito horas. Para a coloração do gel foi utilizada a metodologia proposta por Bassam *et al* (1991) com modificações. O gel foi submetido à solução de fixação (10% de etanol e 0,5% de ácido acético) durante 20 minutos e uma solução de 6 mM de nitrato de prata durante 30 minutos. A revelação do material ocorreu em solução com 0,75 M de NaOH e 0,22% de formaldeído a 40% sendo fotografado para posterior análise.

Os primers que apresentaram bons resultados de transferibilidade foram amplificados para 22 espécimes de *B. falcatus* seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, sendo calculados parâmetros genéticos. O número de alelos (N_a), número efetivo de alelos (N_e), Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e) e o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_w) foram calculados para cada locus, pelo programa GenAlex versão 6.5 conforme Peakall e Smouse (2012). O coeficiente de endogamia (F_{is}), a riqueza alélica (R_a) e a frequência alélica foram calculados para cada locus através do programa FSTAT (Goudet, 2005). A Informação de conteúdo polimórfico (PIC) foi analisada através do software Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007). A classificação do PIC foi realizada segundo Botstein *et al.* (1980) sendo marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 considerados muito informativos, entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. A presença de alelos nulos foi verificada por meio do programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Osoterhout *et al.*, 2004).

Resultados e discussão

Dos 28 primers testados, sete apresentaram bons resultados de amplificação cruzada: um para *B. opalinus* (BoM5); três para *B. hilarii* (Bh8, Bh13 e Bh16), um para *B. orbignyanus* (Borg59); um para *P. argenteus* (Par80); e um para *Colossoma macropomum* (Cm1A8). Com exceção do Par80 e Cm1A8, todos os primers oriundos de peixes do gênero

Prochilodus e da espécie *Colossoma macropomum*, além de todos os primers de *P. mesopotamicus*, apresentaram ausência de amplificação, inespecificidade ou monomorfismo, sendo excluídos das análises (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização dos sete primers com bons resultados de amplificação.

Primers	Temperatura anelamento °C	Espécie	Tamanho do fragmento - pb	PIC
			(Frequência)	
Bh8	56	<i>B. hilarii</i>	190 (0,182); 200 (0,318); 215 (0,500)	0,542
Bh13	56	<i>B. hilarii</i>	150 (0,250); 165 (0,750)	0,305
Bh16	56	<i>B. hilarii</i>	145 (0,182); 160 (0,818)	0,253
BoM5	53	<i>B. opalinus</i>	106 (0,159); 110 (0,114); 115 (0,682); 150 (0,045)	0,457
Borg59	53	<i>B. orbignyanus</i>	225 (0,050); 230 (0,950)	0,090
Par80	52	<i>P. argenteus</i>	190 (0,154); 195 (0,462); 200 (0,385)	0,535
Cm1A8	65	<i>C. macropomum</i>	170 (0,045); 180 (0,955)	0,083

bp: pares de base / PIC: conteúdo de informação polimórfica

O gênero *Brycon* foi o que apresentou maior sucesso de transferibilidade, com cinco primers com resultados satisfatórios e reproduzíveis. Não há estudos prévios que avaliaram detalhadamente a transferibilidade de primers heterólogos em *B. falcatus*, no entanto, a amplificação cruzada entre espécies do gênero *Brycon* tem se mostrado possível e aplicável em pesquisas atuais. Carmo (2015) e mais recentemente Castro (2017) demonstram que primers de *B. opalinus* e *B. hilarii* podem ser transferidos para *B. orbignyanus*. O primeiro autor, inclusive, encontrou possibilidade de amplificação cruzada de primers oriundos de duas espécies de peixes do gênero *Salminus* (*S. brasiliensis* e *S. franciscanus*) em *B. orbignyanus*, e o segundo autor constatou que *P. argenteus* (Par80) também pode ser

utilizado nessa espécie. Esses resultados comprovam a plasticidade de amplificação cruzada de algumas sequências, mesmo que envolvam gêneros distintos, corroborando com os resultados do presente estudo, pois, os primers *P. argenteus* (Par80) e *C. macropomum* (Cm1A8) demonstraram amplificações satisfatórias em *B. falcatus*. No entanto, vale ressaltar que a maioria dos primers validados pertence ao gênero *Brycon*, o que é esperado devido a maior proximidade genética entre indivíduos do mesmo gênero.

Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) obteve classificação satisfatoriamente e medianamente informativa para cinco dos sete primers heterólogos testados (Bh8, Par80, Bh13, Bh16, BoM5). Onde marcadores com PIC superior a 0,5 são satisfatórios em conteúdo informativo, valores entre 0,25 e 0,50 medianamente informativos e valores inferiores a 0,25 pouco informativos (Botstein *et al.*, 1980). Segundo Preczenhak (2013), quanto maior o valor de informação, maior é a capacidade de o primer detectar a variabilidade entre os indivíduos, validando as informações dos resultados do presente estudo.

O tamanho dos alelos variou entre 106 pb (Bom5) e 230 pb (Borg59). Os primers que apresentaram o maior número de alelos foram BoM5 (4 alelos), Bh8 e Par80 (3 alelos cada), e Bh13, Bh16, Borg59 e Cm1A8 (2 alelos cada) (Tabela 3).

Tabela 3. Número de alelos (Na), número de alelos efetivos (Ne), riqueza alélica (Ra), Heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), teste de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Hw) e coeficiente de endogamia (Fis) calculados para os sete primers que apresentaram bons resultados de amplificação.

Locus	Na	Ne	Ra	Ho	He	Hw (P valor)	Fis
Bh8	3,0	2,602	3,000	0,182	0,616	0,000*	0,716*
Bh13	2,0	1,600	2,000	0,227	0,375	0,065	0,413*
Bh16	2,0	1,424	2,000	0,273	0,298	0,696	0,106*
BoM5	4,0	1,980	3,830	0,182	0,495	0,000*	0,646*
Borg59	2,0	1,105	1,883	0,100	0,095	0,814	-0,027
Par80	3,0	2,600	3,000	0,154	0,615	0,002*	0,767*
Cm1A8	2,0	1,095	1,838	0,091	0,087	0,823	-0,024
Média	2,571	1,772	2,507	0,173	0,369	0,343	0,371

*: significativo $p < 0,05$

O número de alelos por locus na maioria dos primers são semelhantes aos resultados encontrados por Castro (2017) em amplificação cruzada de marcadores microssatélites de *B. hilarii* e *B. opalinus* em *B. orbignyanus*.

O tamanho dos alelos produzidos estão próximos aos valores relatados por Bignardi (2016) para *B. hilarii*, no entanto, os mesmos autores constataram maior quantidade de alelos por locus, possivelmente devido aos primers utilizados serem espécie-específicos para a espécie em questão. Resultados semelhantes ocorreram para os primers Par80 e Cm1A8, onde o número de alelos foi baixo e inferior ao encontrado na literatura (Barbosa, 2008; Santos *et al.*, 2009; Lopera-Barrero *et al.*, 2016).

O número médio de alelos efetivos foi 1,772 com variação entre 1,095 (Cm1A8) a 2,602 (Bh8), sendo menor que o número médio de alelos (2,571). Essa diferença sugere a presença de alelos raros ou com baixa frequência. Os resultados da frequência alélica demonstram esta situação ao verificar três alelos de baixa frequência – menor de 0,100 (BoM5: 150; Borg59: 225; Cm1A8: 170) e cinco alelos entre de 0,100 e 0,200 (Bh8: 190; Bh16: 145 ; BoM5: 106 e 110; e Par80: 190). Apesar disso, os valores da riqueza alélica foram altos e variaram entre 3,830 (BoM5) a 1,838 (Cm1A8), demonstrando que os alelos caracterizados através dos primers heterólogos foram informativos.

Em cinco (Bh8, Bh13, Bh16, BoM5 e Par80) dos sete primers, a heterozigosidade esperada (H_e) apresentou valores superiores aos da heterozigosidade observada (H_o), caracterizando um déficit de heterozigotos que culminou na média positiva do coeficiente de endogamia (F_{is}). O menor e maior valor de H_o foi encontrado nos primers Cm1A8 (0,091) e Bh16 (0,273). O teste de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_w) ($P < 0,05$) foi observado em três primers (Bh8, BoM5 e Par80), possivelmente influenciado pela presença de alelos nulos nos mesmos, que foi confirmada através da análise pelo software Micro-Checker 2.2.3. Corroborando, Ashikaga *et al.* (2015) relataram amplificações polimórficas em diferentes estoques de *Brycon orbignyanus*, detectando alelos nulos em alguns locos. Sugerindo que desvios de (H_w) são possivelmente causados por práticas de desova, número limitado de matrizes e subsequentes gargalos populacionais que levam à fixação de alelos em alguns estoques (Povh *et al.*, 2011).

O sucesso da amplificação cruzada está diretamente relacionado com a distância evolutiva das espécies alvos. Segundo Primmer *et al.* (1996), espécies próximas tem maiores chances de amplificação, e conseqüentemente maior polimorfismo do que espécies filogeneticamente distantes, tornando o conhecimento da filogenia importante para o sucesso de amplificações heterólogas. Hilsdorf *et al.* (2011) e Oliveira *et al.* (2011), mesmo utilizando

genes distintos, revelaram relação estreita da espécie *B. orbignyanus* com *B. hilarii*, sendo que essas duas espécies foram distante de *Brycon opalinus*. O uso de primers heterólogos, no entanto, requer extremo cuidado, pois a distância evolutiva pode implicar na perda da informação original, resultando no aparecimento de alelos nulos (Wang *et al.*, 2012).

A análise atual mostrou que a amplificação cruzada de diferentes espécies e gêneros em *B. falcatus* são possíveis; e podem auxiliar programas de repovoamento, a fim de manter a variabilidade genética de uma espécie a médio e longo prazo.

Os resultados auxiliarão futuros estudos genéticos nessa espécie, tendo em vista a escassez de conhecimento, colaborando para melhor entendimento de amplificação cruzada ou até o desenvolvimento de futura amplificação específica.

Conclusão

A transferibilidade de marcadores microssatélites de *B. opalinus* (BoM5), *B. hilarii* (Bh8, Bh13 e Bh16), *B. orbignyanus* (Borg59), *Prochilodus argenteus* (Par 80) e *Colossoma macropomum* (Cm1A8) são validados para *B. falcatus*.

Referências bibliográficas

- ASHIKAGA, FY; ORSI, ML; OLIVEIRA, C; SENHORINI, JA; FORESTI, F. A espécie ameaçada *Brycon orbignyanus*: análise genética e definição de áreas prioritárias para conservação. **Biologia Ambiental dos Peixes**, vol.98, p.1845-1855, 2015.
- BARBOSA, A.C.D.R. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and crossamplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. **Genetics and Molecular Biology**, vol.31, p.357-360. 2008.
- BARBOSA, A.C.D.R. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Molecular Ecology Resources**, vol.6, p. 936-938, 2006.
- BARROSO, R.M. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia). **Molecular Ecology Notes**, vol. 3, p. 297-298, 2003.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anais. Biochem.** vol.196, p. 80-83, 1991.

- BEEBEE, T. J.; ROWE G. An introduction to Molecular Ecology. **Oxford University Press**. 2004.
- BERT, P. F.; JOUAN, I.; DE LABROUHE, D. T.; SERRE, F.; NICOLAS, P.; VEAR, F. **Theoretical and Applied Genetics**. Vol. 105, n. 6-7, pag. 985-993, 2002.
- BIGNARDI, A.B. Variabilidade genética de *Brycon hiliarii* em um programa de repovoamento. **Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia**, vol.59, p.1-9, 2016.
- BINI, E. Peixes do Brasil de rios, lagoas e Riachos. 1ª. Edição. **Homem-Passaro Publicações**, Itapema, p. 300, 2012.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, vol.32, p.314-331, 1980.
- CALCAGNOTTO, D. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, vol.1, p.245-247, 2001.
- CARMO, F.M.S. Optimization of heterologous microsatellites in Piracanjuba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.50, p.1236-1239, 2015.
- CASTRO, P.L. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. **Ciencia. Rural**, vol.47, n.12, 2017.
- GASQUES, L. S.; BELONI, K. P.; OLIVEIRA, J. R. de. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do scielo. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**. UNIPAR, Umuarama, vol. 16, n. 1, p. 47-50, jan./jun. 2013.
- GOUDET, J. **FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices** (version 2.9.3.2), 2005.
- HILSDORF, A. W. S.; OLIVEIRA, C.; LIMA, F. C. T.; MATSUMOTO, C. K. A phylogenetic analysis of *Brycon* and *Henochilus* (Characiformes, Characidae, Bryconinae) based on the mitochondrial gene 18S Rrna. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 31, n. 1, p. 366-371, 2011.
- IBGE- **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** (2014).
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, vol. 16, p. 1099-1106, 2007.

- LATINI, A.O.; RESENDE, D.C.; POMBO, V.B.; CORADIN, L. (Org.). Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. Brasília, **Série Biodiversidade**, vol. 39, p. 791, 2016.
- LOPERA-BARRERO, N.M. *et al.* Monitoring and conservation genetics of *Prochilodus lineatus* wild populations of Pardo, Mogi Guaçu and Tiete rivers, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.68, p.1621-1628, 2016.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. *et al.* Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). **Ciencia e investigación agraria**, vol.35, p.77-86, 2008.
- MATSUMOTO, C.K.; HILSDORF A.W.S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. **Neotropical Ichthyology**, vol.7, p.395-402, 2009.
- OLIVEIRA, C.; AVELINO, G.; ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTI, G.; VARI, R. P.; CASTRO, R. M. C. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, vol. 11, n. 275, p. 25, 2011.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, vol. 28, p. 2537-2539, 2012.
- POVH, JA; RIBEIRO, RP; LOPERA-BARRERO, NM; JACOMETO, CB; VARGAS, L; GOMES, PC; LOPES, T. da S. Análise de microssatélites de estoques de reprodutores de pacu utilizados no programa de estocagem do rio Paranapanema, Brasil. **Scientia Agricola**, vol.68, p.308-313, 2011.
- PRECZENHAK, A. P. Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini tomates. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.
- PRIMMER, R.; MULLER, P.; ELLEGREN, H. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. **Mol. Ecol.**, p. 5365-378, 1996.
- QUEIROZ, L. J.; TORRENTE-VILARA, G.; OHARA, W. M.; PIRES, T. H. S.; ZUANON, J. Peixes do Rio Madeira. Vol. 3. São Paulo: **Santo Antônio Energia**, 2013.
- ROSSINI, B.C.; NUNES, A.G.; FREITAS, P.D.; GALETTI Jr, P.M. Isolation and characterization of microsatellite loci of the freshwater fish *Salminus franciscanus*. **Molecular Ecology Resources**. 2010.

- SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, vol. 5, n. 1, p. 1–9, 2017.
- SANCHES, A.; GALETTI JR, P.M. Microsatellites loci isolated in the fresh water fish *Brycon hilarii*. **Molecular Ecology Notes**, vol.6, p.1045-1046, 2006.
- SANCHES, A., & GALETTI, P. M., Jr. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, vol. 67, n. 4, p. 889-895, 2007.
- SANTOS, M.C.F. *et al.* Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. **Molecular Ecology Resources**, vol.9, p.874-876, 2009.
- SOUZA, F.P. *et al.* Novel microsatellite markers for the endangered neotropical fish *Brycon orbignyanus* and cross-amplification in related species. **Italian Journal of Animal Science**, p.1-5, 2018.
- VAN OSOTERHOUT, C., HUTCHINSON, W.F., WILLS, D.P.M., SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes** vol.4, p. 535–538, 2004.
- WANG, C.; SCHROEDER, K. B.; ROSENBERG, N. A maximum likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes. **Genetics**, vol. 192, p. 651-669, 2012.
- YAZBECK, G.A.; KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). **Genetics and Molecular Research**, vol.6, p.1026-1034, 2007.

ARTIGO B

Análise citogenética de plantel comercial (PC) e duas gerações (G7, G8) de *Oreochromis niloticus* variedade Tilamax

Resumo - A produção de peixes se destaca na cadeia alimentícia, principalmente pelo aumento de consumo e exigência dos consumidores no quesito alimento saudável. A tilápia é destaque, sendo a espécie mais produzida no Brasil, levando o país ao quarto lugar na produção mundial, tornando-a espécie alvo de programas de melhoramento genético que visam a seleção de indivíduos superiores, possível através do emprego de técnicas que auxiliem e facilitem a identificação, conhecimento e conservação das espécies, como é o caso da citogenética. O presente estudo teve por objetivo analisar citogeneticamente indivíduos da geração de reprodutores (G7), indivíduos da geração subsequente (G8) e indivíduos comerciais (plantel comercial – PC) de *Oreochromis niloticus* (variedade Tilamax), por meio de análise convencional e bandamentos cromossômicos. Amostras de sangue de 40 indivíduos de *O. niloticus* foram coletadas na Estação de Piscicultura Codapar/UEM e transportadas para o Laboratório de Citogenética Animal (LACA), da Universidade Estadual de Londrina (UEL) onde foram analisadas. Os espécimes de *O. niloticus* de todas as gerações avaliadas apresentaram número diplóide ($2n$) igual 44, as regiões organizadoras de nucléolos pela impregnação de nitrato de prata (AgRONS) foram evidenciadas em até quatro cromossomos e a hibridização fluorescente *in situ*, com sonda de DNAr 18S, detectou sinais em 5 cromossomos, localizados em posição terminal do braço curto. A heterocromatina, pela técnica de banda C, teve ampla distribuição em regiões centroméricas, ricas em pares de base CG (citosina e guanina). Os resultados do presente estudo coincidem com os dados disponíveis na literatura e não foram observadas evidências que comprovassem alterações nas características cromossômicas entre as gerações e o plantel comercial analisados de *Oreochromis niloticus* (variedade Tilamax).

Termos para indexação: bandamento cromossômico, cariótipo, DNAr 18S, programa de melhoramento genético

Cytogenetic analysis of commercial squash (PC) and two generations (G7, G8) of *Oreochromis niloticus* variety Tilamax

Abstract - Fish production stands out in the food chain, mainly due to the increase in consumption and consumer demand for healthy food. Tilapia is the highlight, being the most produced species in Brazil, leading the country to fourth place in world production, making it the target species of breeding programs aimed at the selection of superior individuals, possible through the use of techniques that help and facilitate the identification, knowledge and conservation of species, such as cytogenetics. The aim of the present study was to analyze cytogenetically breeding individuals (G7), subsequent generation individuals (G8) and commercial individuals (commercial squad - PC) of *Oreochromis niloticus* (Tilamax variety) by conventional analysis and chromosomal banding. Blood samples from 40 individuals of *O. niloticus* were collected at Codapar / UEM Fish Farming Station and transported to the Animal Cytogenetics Laboratory (LACA) of the State University of Londrina (UEL) where they were analyzed. *O. niloticus* specimens from all generations evaluated showed diploid number ($2n$) equal to 44, the nucleolus organizing regions by silver nitrate impregnation (AgRONS) were evidenced in up to four chromosomes

and fluorescence in situ hybridization with a probe. 18S rDNA detected signals on 5 chromosomes located in the terminal position of the short arm. Heterochromatin, by C band technique, was widely distributed in centromeric regions, rich in CG base pairs (cytosine and guanine). The results of the present study coincide with data available in the literature and no evidence was found to prove changes in chromosomal characteristics between generations and the commercial squad of *Oreochromis niloticus* (Tilamax variety).

Index terms: chromosomal banding, genetic breeding program, karyotype, 18S rDNA

Introdução

O cultivo de organismos aquáticos continua sendo um dos setores que mais crescem na produção de alimentos, com importante evidência para a carne de peixes, cujo consumo apresenta crescimento gradativo elogiável, principalmente pela procura de alimentos saudáveis. Segundo Associação Brasileira da Piscicultura (2018), o consumo de carne de peixe pelo brasileiro alcançou 9,5 kg/habitante/ano.

A tilápia apresenta grande destaque com produção superior a 350 mil toneladas no ano de 2017, colocando o Brasil como quarto maior produtor mundial da espécie (Associação Brasileira da Piscicultura, 2018). Esse potencial de crescimento aliado ao aumento de consumo, torna a *Oreochromis niloticus* alvo de programas de melhoramento genético (Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2013), com objetivos de seleção voltados para as características de maior interesse comercial, como ganho de peso (Kunita *et al.*, 2013), peso (Reis Neto *et al.*, 2014) e rendimento de filé (Gjerde *et al.*, 2012). Por isso, focar no desenvolvimento de programas de melhoramento genético para a obtenção de novas gerações é importante alternativa de fomento, já que o controle proporcionará animais que respondem bem às condições ambientais específicas, levando em consideração sua produtividade e sobrevivência por unidade de área.

Para melhor conhecimento genético da espécie, pode-se fazer uso da citogenética, ferramenta que tem como objetivo possibilitar a identificação e compreensão dos cromossomos das espécies (Guerra, 1988). Segundo David *et al.* (2014), dentro da ciência animal a citogenética pode ser utilizada tanto no diagnóstico de doenças quanto em estudos de reprodução (animais de companhia ou produção), sejam relacionados à sexagem, conservação de raças ou mesmo na determinação de anormalidades que prejudiquem a reprodução. Por

essa razão, a caracterização citogenética em peixes é de suma importância para o melhoramento genético, manejo e conservação de espécies.

O presente estudo teve por objetivo analisar citogeneticamente plantel comercial (PC) e duas gerações (G7, G8) de *Oreochromis niloticus* (variedade Tilamax), por meio de análise convencional e bandamentos cromossômicos.

Material e métodos

Foram analisados 40 exemplares de *Oreochromis niloticus* variedade Tilamax, que se apresentavam em fase de crescimento, com peso aproximado variando entre 30 e 60 gramas, sendo 16 indivíduos da geração de reprodutores (G7), 10 indivíduos da geração subsequente (G8) e 14 indivíduos comerciais (plantel comercial – PC). Os animais utilizados para o desenvolvimento deste trabalho são provenientes da Estação de Piscicultura Codapar/UEM, localizada no distrito de Floriano, Maringá - PR, piscicultura localizada nas coordenadas latitude 23°30'57"S e longitude 52°2'23"W (IBGE, 2014). Os animais são resultado de um programa de melhoramento genético firmado entre a Universidade Estadual de Maringá e a “Wordfish” (órgão não governamental da Malásia).

Os animais foram escolhidos aleatoriamente, independentes do sexo, por ser de praxe na piscicultura o trabalho com animais invertidos, onde fêmeas são masculinizadas com uso do andrógeno 17 α -metiltestosterona, com o objetivo de gerar animais com taxas de crescimento mais elevadas, por isso o sexo não foi levado em consideração em nenhuma das gerações estudadas. As amostras de sangue foram coletadas na piscicultura e transportadas para o Laboratório de Citogenética Animal (LACA), da Universidade Estadual de Londrina (UEL), onde foram processadas para a obtenção de cromossomos mitóticos segundo a técnica de cultura de linfócitos de Fenocchio *et al.* (1991). E, para a análise deste material, as lâminas foram preparadas por gotejamento e coradas com solução de Giemsa 5% por 8 minutos, com posterior montagem do cariótipo com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS6.

Para a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo ativas (Ag-RONs) foi aplicada a técnica de impregnação por nitrato de prata, proposta por Howell e Black (1980). Para a determinação do padrão de distribuição da heterocromatina foi realizada a técnica de bandamento C, e posterior coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4'-6-diamidino-2 fenilindol (DAPI), para identificação das regiões ricas em pares de bases GC e AT, respectivamente, a partir da técnica de Schweizer (1980). A técnica de

hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada de acordo com Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000), com algumas modificações, utilizando a sonda de DNAr 18S (aproximadamente 1800 pb) isolada de *Prochilodus argenteus* Spix e Agassiz, 1829 (Hatanaka e Galetti 2004). O perfil das reações de PCR para a geração dos fragmentos do DNAr 18S foi composto por uma etapa de desnaturação inicial de 2 min a 94°C seguido por 35 ciclos de 94°C por 45 seg, anelamento a 60°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, seguido por uma etapa final de extensão de 5 minutos a 72°C. A sonda de DNAr 18S foi marcada com biotina-14-dATP por nick translation e detectada com avidina-FITC, e os cromossomos metafásicos foram corados com DAPI. Para a análise das lâminas foi utilizado um microscópio de epifluorescência (Leica DM2000) acoplado a uma câmera digital (MoticamPro 282B) e, por meio do software Motic Images Advanced, versão 3.2, as imagens foram capturadas.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA-UEL nº 25418.2016.34).

Resultados e discussão

Todos os espécimes de *Oreochromis niloticus* avaliados apresentaram número diplóide igual a 44 ($2n=44$) (Figura 1), corroborando com os dados disponíveis na literatura para essa espécie, já analisada por Oliveira *et al* (1998), Martins *et al.* (2004), Valente *et al.* (2009), entre outros. De acordo com Majumdar *et al.* (1986) as tilápias apresentam padrão cariotípico composto por um par (o maior) de subtelocêntrico (st), alguns cromossomos meta/submetacêntricos (m/sm) e vários cromossomos subtelo-acrocêntricos (st/a). Esse padrão não é de fácil identificação, pois a espécie apresenta cromossomos com tamanho e morfologia similares. Em nosso estudo identificamos 8 pares (st) subtelocêntricos (1 ao 8), 8 pares (m/sm) meta/submetacêntricos (9 ao 16) e 6 pares (st/a) subtelo-acrocêntricos (17 ao 22) (Figura 1).

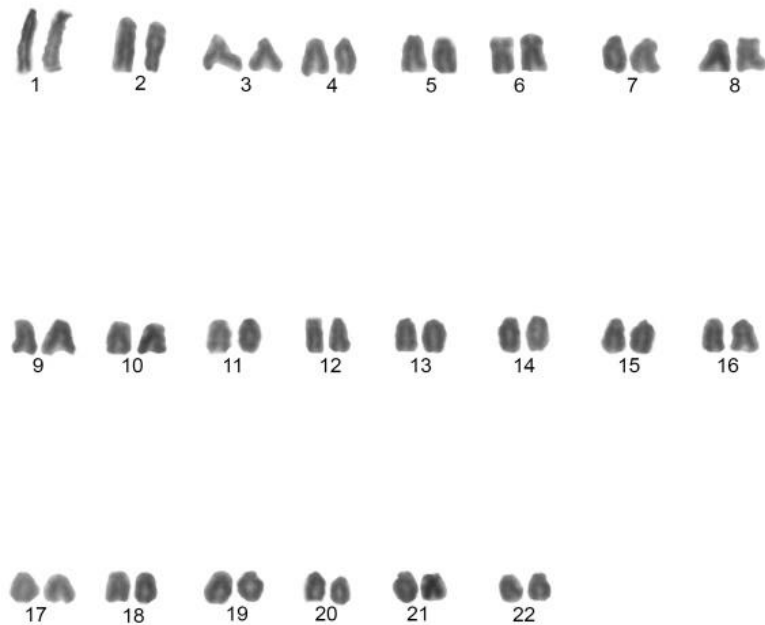


Figura 1. Cariótipo com coloração convencional de Giemsa de *Oreochromis niloticus* (variedade Tilamax) mostrando $2n=44$.

As AgRONS foram detectadas em posição terminal do braço curto, em dois, três e quatro cromossomos (Figura 2A, B e C, respectivamente). Essa variação foi identificada tanto nos reprodutores (G7) como na geração subsequente (G8) e no plantel comercial (PC), o que parece ser normal da espécie, sendo relatada com frequência. Martins *et al.* (2004) observaram três AgRONS, Leonhardt *et al.* (2006) até quatro AgRONS, Nakajima *et al.* (2012) e Cabral-de-Mello *et al.* (2012) relataram dois cromossomos com marcações de nitrato de prata. Porém, vale ressaltar, que só é possível à confirmação exata do número de RONS pela técnica de hibridização *in situ* (FISH), pois a coloração com nitrato de prata revela apenas as proteínas associadas com o DNAr (Pendas *et al.*, 1993). De acordo com Kasahara (2009) o nitrato de prata irá detectar apenas RONS que estiveram em atividade de transcrição até o momento que o material foi fixado, pois a técnica AgRON marca apenas proteínas acídicas associadas ao RNA ribossômico.

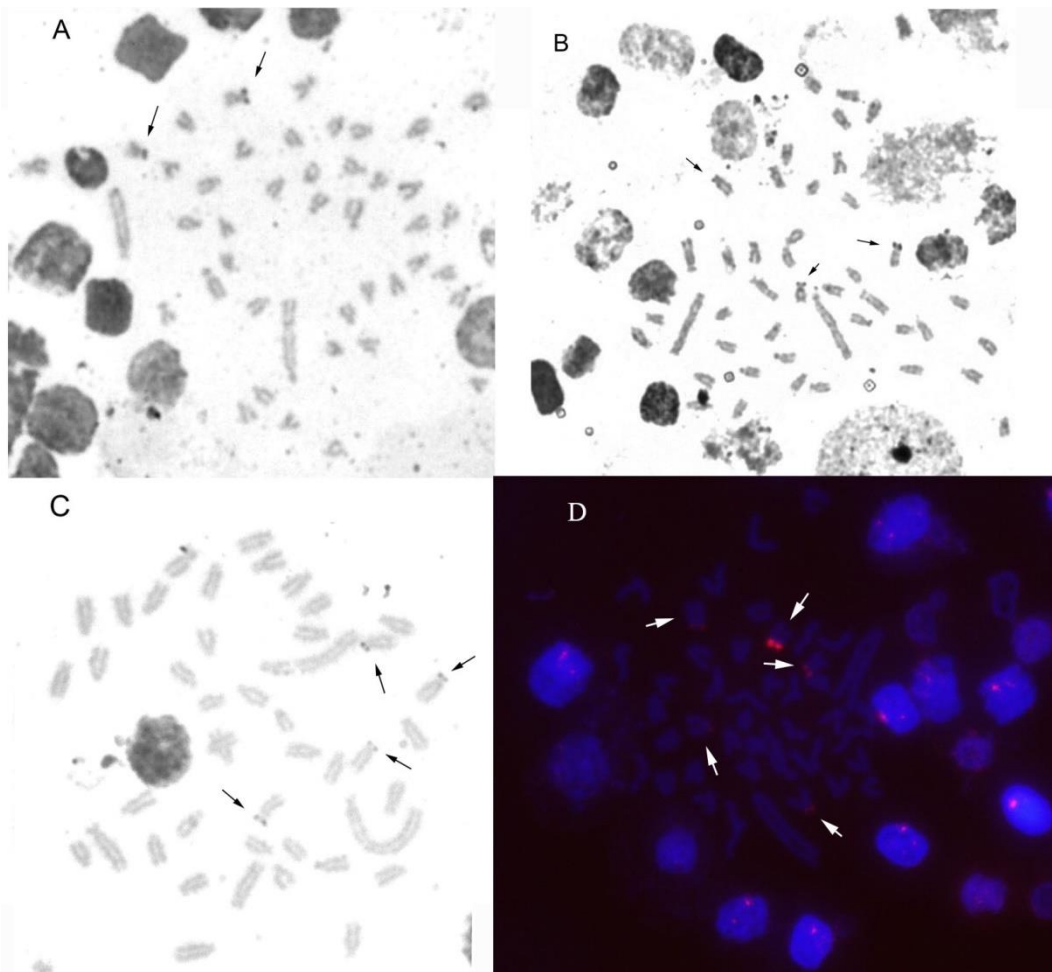


Figura 2. Metáfases somáticas de *Oreochromis niloticus* (variedade Tilamax), submetidas à impregnação pelo nitrato de prata (AgRONS) e FISH com a sonda de DNAr 18S. As setas indicam as marcações. Em (A) dois cromossomos AgRONS; em (B) três cromossomos AgRONS; em (C) quatro cromossomos AgRONS; em (D) cinco cromossomos com DNAr 18S. Todas as marcações em posição terminal do braço curto.

A hibridização fluorescente *in situ*, com sonda de DNAr 18S, detectou sinais localizados em posição terminal do braço curto em 5 cromossomos, observados nas duas gerações (G7 e G8) e no plantel comercial (PC), sendo que duas marcações são bem mais evidentes que as demais (Figura 2D). Estudos com populações naturais de *Oreochromis niloticus* mantidas em cativeiro com finalidade de reprodução, no qual foi utilizada a mesma sonda, Martins *et al* (2004) confirmaram a ocorrência em três pares cromossômicos, em posição terminal do braço longo e Leonhardt *et al.* (2006) em 2 pares em posição terminal do braço curto, como no presente estudo. Tais variações podem ocorrer devido características citogenéticas próprias de cada população analisada. Além disso, a ausência de sítios de DNAr 18S em um dos homólogos em *O. niloticus*, pode ser devida ao pequeno tamanho deste sítio

sendo difícil sua detecção. E também, como essas marcações estão localizadas na posição terminal do braço, curto ou longo, a transferência de material genético pode estar ocorrendo, de um cromossomo homólogo para outro, devido à proximidade com o núcleo interfásico, de acordo com o modelo de Rabl (Cowan *et al.* 2001), como relatado por Santos *et al.* (2017) e Usso *et al.* (2018), em outras espécies de peixes.

Apesar das diferenças no número de RONS aqui relatadas, em relação a outros estudos, os resultados em *O. niloticus* indicam que a espécie se comporta de forma semelhante tanto em populações naturais, quanto em populações oriundas de programas de melhoramento genético, não sendo possível atribuir essa variação a erros no emprego da técnica.

Os resultados do bandamento C com fluorocromos permitiram observar ampla distribuição de heterocromatina com bandas brilhantes CMA_3^+ , principalmente em regiões centroméricas, evidenciando regiões ricas em CG (citosina e guanina) e pobres em AT (adenina e timina) (Figura 3). Além disso, foi possível observar a estreita relação entre as RONS evidenciadas pelo nitrato de prata e as regiões heterocromáticas CMA_3 positivas nos cromossomos dos peixes em G7, G8 e PC, em posição terminal do braço curto. Resultados semelhantes foram descritos em outras espécies de peixes, como em Santos *et al.* (2012), da Silva *et al.* (2016), entre outros. Segundo Salvador *et al.* (1995), as regiões organizadoras de nucléolos estão intimamente ligadas ao DNA repetitivo, rico em CG, respaldando os resultados do presente estudo.

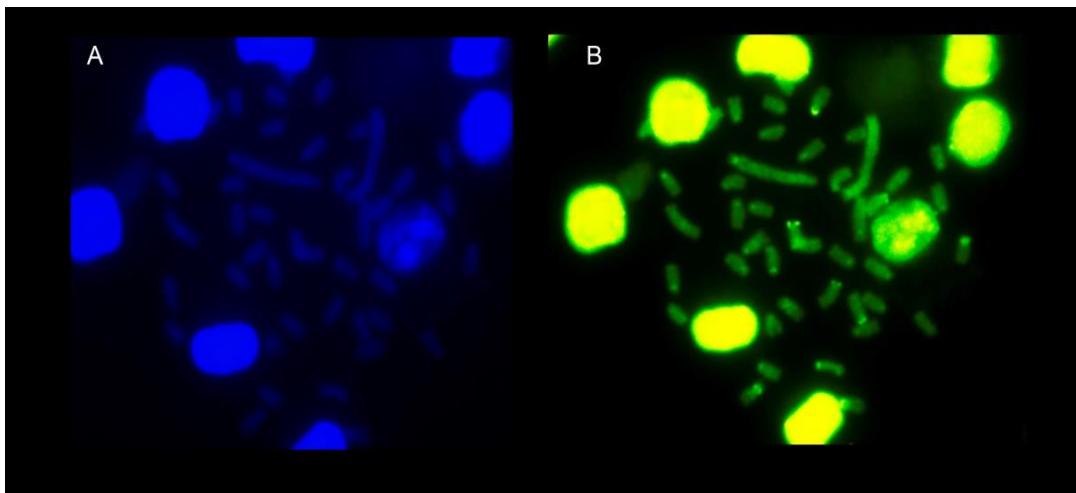


Figura 3: Metáfases somáticas de *Oreochromis niloticus* (variedade Tilamax) com bandamento C corado com fluorocromos DAPI (A) e CMA₃(B) evidenciando padrão de distribuição da heterocromatina CMA₃⁺ em regiões centroméricas e algumas terminais, provavelmente relacionadas às RONS.

Os resultados do presente estudo reforçam a importância da citogenética no estudo evolutivo dos peixes, como ferramenta para conhecer o número, morfologia e a estrutura cromossômica dentro de um programa de melhoramento genético. Segundo Basrur *et al.* (2004) anormalidades cromossômicas causadas a partir de erros na mitose, meiose ou na fertilização apresentam efeito direto sobre a fertilidade do indivíduo, gerando perda embrionária e anomalias congênitas, principalmente quando há consanguinidade entre os indivíduos, ocasionando prejuízos econômicos para a produção, e que podem ser eliminadas por meio de um diagnóstico precoce e da seleção de cruzamentos dentro do plantel disponível. Essas anormalidades não foram observadas nos resultados expostos, diante dos marcadores citogenéticos utilizados.

Turra *et al.* (2010) relataram alguns problemas em relação ao peso de maturidade sexual da tilápia, que alcança essa maturidade sexual com 40g, abaixo do peso de comercialização que é de 50g, maturação precoce que pode provocar superpopulação dos tanques de criação, aumento do tempo de engorda e a variação de peso do lote, gerando maior custo e perda de qualidade no produto final. E uma alternativa para minimizar estes problemas na produção é por meio da manipulação cromossômica para formação de indivíduos que apresentem boa conversão alimentar, e conseqüentemente, animais com maior ganho de peso. Assim sendo, estudos cromossômicos no grupo de peixes e a determinação do cariótipo

contribuem não somente para o melhoramento genético, como também para o manejo e conservação das espécies.

A realização de um manejo adequado através de uma boa seleção, em programas de melhoramento genético, promove sucesso na transferência de genes para os descendentes (herdabilidade), permitindo excelentes ganhos genéticos por geração, sendo a característica de crescimento a de maior relevância econômica (Oliveira *et al.* 2015).

Conclusão

As gerações analisadas (G7 e G8) e o plantel comercial (PC) de *Oreochromis niloticus* (variedade Tilamax) não apresentaram diferenças quanto às avaliações citogenéticas.

Não houve diferenciação entre a espécie cultivada e a natural de *Oreochromis niloticus* com relação ao número diplóide e morfologia cromossômica.

Referências bibliográficas

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. **Anuário da piscicultura 2018**. PEIXE BR, p.11, 2018.
- BASRUR P. K., BASRUR V. R. Genes in genital malformations and male reproductive health. **Animal Reproduction Science**, vol.1, p.64-85, 2004.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; VALENTE, G. T.; NAKAJIMA, R. T.; MARTINS, C. Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Research** vol. 20, p. 279-292, 2012.
- CARRASCO, L. A. P.; PENMAN, D. J.; BROMAGE, N. Evidences for the presence of Sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. **Aquaculture**, Amsterdam, vol.173, p.207-218, 1999.
- COWAN, C. R.; CARLTON, P. M.; CANDE, W. Z. The polar arrangement of telomeres in interphase and meiosis. Rabl organization and the bouquet. **Plant Physiology**, vol. 125, p. 532–538, 2001.
- DA SILVA, L. L. L.; DOS SANTOS, A. R.; GIULIANO-CAETANO; DIAS, A. L. Chromosomal characterization in two species of an *Astyanax bimaculatus* complex (Characidae, Characiformes) using different techniques of chromosome banding. **Cytotechnology**, vol. 68, p. 1277–1286, 2016.

DAVID, J. A. O.; AGUIAR, L. L.; MAINARDI, V. F. Capítulo 21 - **Aplicações da citogenética em ciência animal**. p. 222, 2014.

FENOCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, vol.11, n.4, p.847-852, 1988.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. FAO, p.243, 2014.

GUERRA, M. S. Introdução à citogenética geral. **Guanabara Koogan**, 1988.

GUPTA, M. V.; ACOSTA, B. O. From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. *NAGA, WorldFish Center Quarterly*, vol. 27, n. 3 - 4, p. 4-14, 2004.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, Basel, vol.36, p.1014-1015, 1980.

IBGE- **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** (2014).

KASAHARA, S. Introdução à pesquisa citogenética em vertebrados. 1ª ed. - **Sociedade Brasileira de Genética**. p. 160. Ribeirão Preto, SP, 2009.

LEONHARDT, C. M. R.; GIULIANO-CAETANO, L.; FENOCCHIO, A.; CAETANO FILHO, ALBERTO.; LEONHARDT, JÚLIO. Caracterização cariotípica de um estoque de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, da Universidade Estadual de Londrina, mediante diversas técnicas de bandamento cromossômico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, vol. 27, n. 4, p. 679-684, out./dez. 2006.

MAJUMDAR, K. C.; McANDREW, K. C. Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera, Tilapia, Sarotherodon, and Oreochromis of the tribe Tilapiini (Pisces, Cichlidae). **Genetica** vol. 68, p. 175–188, 1986.

MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; WASKO, A. P.; WRIGHT, J. M. Physical mapping of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes – a review. **Aquaculture**, Amsterdam, vol. 231, p.37-49, 2004.

MESTRINER, C. A.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI Jr., P. M. Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): Analysis of a sex system. **Chromosome Research**, vol. 3, p. 440-443, 1995.

NAKAJIMA, R. T.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; VALENTE, G. T.; VENERE, P. C.; MARTINS, C. Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. **Evolutionary Biology**, vol. 12, p. 198, 2012

- OLIVEIRA, C. A. L.; YOSHIDA, G. M.; OLIVEIRA, S. N.; KUNITA, N. M.; SANTOS, A. I.; ALEXANDRE FILHO, L.; RIBEIRO, R. P. Avaliação genética de tilápias-do-nilo durante cinco anos de seleção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, vol.50, n.10, p.871-877, 2015.
- OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosome Research**, vol. 6, p. 205-211, 1998.
- PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin in Brown Trout. **Chromosome Research**, Oxford, vol.1, p.63-67, 1993.
- SALVADORI, S.; DEINA, A. M.; COLOCCIA, E.; ROSSI, E.; ZUFARDI, O. Localization of (TTAGGG) telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic cels. **Chromosome Research**, Oxford, vol.3, p.54-58, 1995.
- SANTOS, A. R.; RUBERT, M.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. **Hereditas**, vol. 149, p. 24–33, 2012.
- SANTOS, A. R.; USSO, M. C.; GOUVEIA, J. G.; ARAYA-JAIME, C.; FRANTINE-SILVA, W.; GIULIANO-CAETANO, L.; FORESTI, F.; DIAS, A. L. Chromosomal Mapping of Repetitive DNA Sequences in the Genus *Bryconamericus* (Characidae) and DNA Barcoding to Differentiate Populations. **Zebrafish**, 2017.
- SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bandas) in human chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research** vol. 27, n. 2-3, p. 190-193, 1980.
- TURRA, E. M. Oliveira, D. A. A. TEIXEIRA, E. A. Luz, R. K. PRADO, S. A. MELO, D. C. FARIA, P. M. C. SOUSA, A. B. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol.34, n.1, p.21-28, 2010.
- USSO, M. C.; MORTATI, A. F.; MORALES-BLANCO, A. G.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Molecular cytogenetics in diferente populations of *Oligosarcus paranensis* (Characidae): comparative analysis of the genus with 5S and 18S rDNA probes. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 2018.

VALENTE, G. T.; SCHNEIDER, C. H.; GROSS, M. C.; FELDBERG, E.; MARTINS, C. Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Research**, vol. 17, p. 791-799, 2009.