

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
LUISA SIMBINE**

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA  
TILÁPIA *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) DAS BACIAS  
DOS RIOS INCOMATI, SABIÉ, LIMPOPO E UMBELUZI EM  
MOÇAMBIQUE**

**Mogi das Cruzes, SP**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
LUISA SIMBINE**

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA  
TILÁPIA *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) DAS BACIAS  
DOS RIOS INCOMATI, SABIÉ, LIMPOPO E UMBELUZI EM  
MOÇAMBIQUE**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação da Universidade de Mogi das  
Cruzes como parte dos requisitos para  
obtenção do Título de Mestre em  
Biotecnologia.**

**Área de Concentração: Ciências Biológicas**

**Orientador: Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf**

**Mogi das Cruzes, SP**

**2010**

## FINANCIAMENTO



## FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Simbine, Luisa

Avaliação da diversidade genética de populações da tilápia *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) das bacias dos rios Incomati, Sabié, Limpopo e Umbeluzi em Moçambique / Luisa Simbine. – 2010.

92 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -  
Universidade de Mogi das Cruzes, 2010

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Alexandre Wagner S. Hilsdorf

1. *Oreochromis mossambicus* 2. Microsatélite 3.  
Tilápia – Variabilidade genética I. Hilsdorf, Alexandre  
Wagner S.

CDD 597

**ATAS**

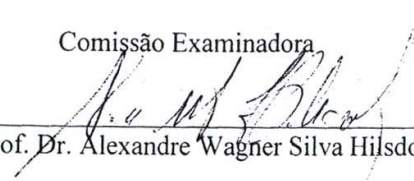
**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

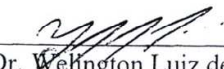
Às catorze horas do dia vinte e três de março de dois mil e dez, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Avaliação da diversidade genética de populações da tilápia *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) das bacias dos rios Incomati, Sábia, Limpopo, Umbeluzi em Moçambique" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Luisa Simbine**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Alexandre Wagner Silva Hilsdorf e Wellington Luiz de Araújo da Universidade de Mogi das Cruzes e Lurdes Foresti de Almeida Toledo da Universidade de São Paulo, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

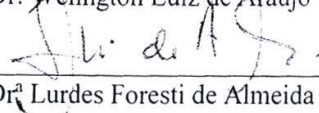
APROVADA por UNANIMIDADE  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 23 de março de 2010.

Comissão Examinadora

  
Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

  
Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo

  
Prof.ª Dr.ª Lurdes Foresti de Almeida Toledo

Julgamento

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

## DEDICATÓRIA

*Ao meu querido filho Rui Miguel Mussa, pelo amor e carinho, por toda a dedicação e encorajamento que me deu para que nunca desistisse, mesmo nos momentos mais difíceis do curso. Quando parecia impossível prosseguir por sentir falta dele e do meu netinho, por estar longe de casa e de toda a família, ele sempre me deu força para não desistir. Ao meu querido netinho Ricardo Miguel Lopes Mussa, por todo o amor nos poucos momentos em que pude estar perto dele.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pela iluminação, inspiração e amparo nos momentos mais difíceis.*

*Ao Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf por ter me recebido, acreditado em mim e pela orientação deste trabalho.*

*Ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes pela oportunidade oferecida.*

*Ao Núcleo Integrado de Biotecnologia da UMC, pelo apoio científico e facilidades concedidas.*

*Ao Ministério de Ciência e Tecnologia de Moçambique (MCT) pelo incentivo e oportunidade oferecida em vir ao Brasil realizar o curso de mestrado.*

*Ao Instituto de Investigação Pesqueira de Moçambique por todo apoio prestado.*

*Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida.*

*A WWF pelo apoio financeiro.*

*A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia que direta ou indiretamente me apoiaram neste trabalho.*

*Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aqüicultura (Lagoaa):*

*A Juliana Viana que desde o primeiro momento da minha chegada soube estar presente em todos os momentos difíceis pelos quais passei. O meu eterno agradecimento por todos os ensinamentos, paciência, preocupação e por todo carinho que recebi.*

*A Márcia por todo apoio e amizade. Apesar de ter deixado minha família na África, senti que ganhei uma nova família no Brasil.*

*A Pâmela por todo apoio, amizade e auxílio prestado.*

*A Játiane por ter me recebido em sua casa, pelo apoio e amizade.*

*A Ângela pelas valiosas sugestões.*

*Aos demais colegas do Lagoaa: Sara, Jamara, Carla, Gustavo, Fabiana e Vânia, pela convivência agradável, interação acadêmica e contribuição para o meu aprendizado.*

*Meu muito obrigado a Marie, técnica do NRB, pelo apoio e auxílio prestado.*

*A todos os colegas do NRB, em especial ao Almir, por ser tão prestativo e estar presente em todos os momentos que precisei.*

*Aos colegas do Instituto de Investigação Pesqueira (IIP), especialmente ao Osvaldo Chacate, a Rabia, ao Dr. Gove, ao Lourenço, ao Dr. Murama e a Flisa pelo apoio que me prestaram.*

*Aos amigos brasileiros Gislaine e Fliezer que viraram minha família e não me abandonaram em nenhum momento.*

*Aos meus irmãos Lolita, Lourenço, Laura, Jitita pelo apoio moral.*

*Ao amigo João Miguel.*

*Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa de minha carreira.*



“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita”

**Mahatma Gandhi**

## RESUMO

A tilápia é originária da África e é um dos peixes mais cultivados no mundo. Este trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética da tilápia *Oreochromis mossambicus* oriunda das bacias dos rios Limpopo, Incomati, Umbeluzi e do rio Sabié, em Moçambique. Marcadores microssatélites foram usados para avaliar a estrutura genética e comparar a variabilidade genética de estoques selvagens de *O. mossambicus*. Amostras de DNA de 200 espécimes foram analisadas. Os cinco *loci* (UNH104, UNH129, UNH142, UNH222 e UNH231) usados neste estudo mostraram alto polimorfismo. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,940 a 1,000 e a riqueza alélica ( $A_r$ ) de 8,937 a 15,751. A ANOVA não mostrou diferenças significativas entre as quatro populações para os parâmetros  $A$ ,  $A_r$ ,  $H_o$  e  $H_e$  ( $p < 0,05$ ). Todos os estoques apresentaram um excesso de heterozigosidade em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A ocorrência de uma redução populacional recente nas amostras do rio Limpopo mostra que esta população está passando por um efeito gargalo. A estrutura genética foi investigada por meio dos índices  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$ ,  $FCA$  e AMOVA. A maior variabilidade genética foi verificada dentro das populações e uma pequena divergência foi observada entre elas. Os valores obtidos na análise par a par de  $R_{ST}$  e  $N_M$  foram significativos ( $p < 0,05$ ). A análise bayesiana conduzida no programa *Structure* indicou a presença de uma única população, enquanto que a análise fatorial de correspondência (FCA) mostrou uma baixa estruturação. Os resultados obtidos mostraram baixo grau de estruturação genética em todos os estoques analisados, indicando que está ocorrendo um grande fluxo gênico entre as populações existentes nos rios estudados. As implicações desses resultados foram discutidas quanto ao manejo e conservação dos estoques de *O. mossambicus*.

**Palavras-chave:** *Oreochromis mossambicus*, microssatélite, tilápia, variabilidade genética.

## ABSTRACT

Tilapia is native from Africa and it is one of the most cultivated fish in the world. The goal of this research was to evaluate the genetic diversity of tilapia *Oreochromis mossambicus* from the Basins of the Limpopo, Incomati and Umbeluzi Rivers and of the Sabié River in Mozambique. Microsatellite markers have been used to assess the genetic structure and compare the genetic variability of wild populations of *O. mossambicus*. Samples of DNA from 200 specimens were analyzed. All five *loci* (UNH104, UNH129, UNH142, UNH222 and UNH231) used in this study were polymorphic with observed heterozygosity ranging from 0.940 to 1.000 and the allelic richness average ( $A_r$ ) from 8.937 to 15.751. ANOVA showed no significant differences between the four populations analyzed for the parameters  $A$ ,  $A_r$ ,  $H_o$  and  $H_e$  ( $p < 0.05$ ). All the stocks exhibited remarkably significant heterozygosity excess relative to Hardy-Weinberg Equilibrium. Evidence of genetic bottleneck was found in the population of the Limpopo River. Population genetic structure was investigated using  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$ , FCA as well as AMOVA. The most genetic variability was within populations and a slight divergence between populations was observed. The analyses of  $R_{ST}$  and  $N_m$  stepwise values were significant ( $p < 0.05$ ). Bayesian analysis performed by the software *Structure* indicated the presence of a single population, while the factorial correspondence analysis (FCA) showed a slight structure. All data showed low levels of genetic structure among populations, indicating that a great gene flow yet persists across the rivers. The implications of these findings for the management and conservation of *O. mossambicus* stocks are discussed.

**Keywords:** *Oreochromis mossambicus*, microsatellite, tilapia, genetic variability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Mapa da região sudeste da África, indicando os locais de ocorrência natural da tilápia <i>O. mossambicus</i> .....	16
<b>Figura 2.</b>	Exemplar de <i>O. mossambicus</i> .....	17
<b>Figura 3.</b>	Rio Limpopo .....	27
<b>Figura 4.</b>	Rio Incomati.....	28
<b>Figura 5.</b>	Rio Sabié.....	28
<b>Figura 6.</b>	Rio Umbeluzi .....	29
<b>Figura 7.</b>	Mapa da região de Moçambique mostrando os locais de coleta.....	32
<b>Figura 8.</b>	Imagem da eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA genômico extraído da nadadeira caudal de <i>O. mossambicus</i> pelo método fenol:clorofórmio.....	42
<b>Figura 9.</b>	Imagem da eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA genômico extraído do tecido muscular de <i>O. mossambicus</i> pelo método fenol:clorofórmio.....	42
<b>Figura 10.</b>	Imagem da eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA de <i>O. mossambicus</i> extraído com kit de extração genômico .....	43
<b>Figura 11.</b>	Gráfico com a leitura da concentração do DNA da amostra 51u, obtido a partir de kit de extração genômico .....	43
<b>Figura 12.</b>	Gráfico com a leitura da concentração do DNA da amostra C1m, extraído pelo método fenol:clorofórmio .....	44
<b>Figura 13.</b>	Gel de poliacrilamida do <i>locus</i> UNH104: as setas menores indicam bandas inespecíficas e as setas maiores, as bandas de interesse (de 130 a 135pb) .....	46
<b>Figura 14.</b>	Gel de poliacrilamida do <i>locus</i> UNH129: as setas menores indicam bandas inespecíficas e as setas maiores, bandas de interesse (por volta de 200pb). .....	47
<b>Figura 15.</b>	Gel de poliacrilamida do <i>locus</i> UNH142 as setas menores indicam bandas inespecíficas e as setas maiores, bandas de interesse (em torno de 140pb); a - indivíduo heterozigoto; b - indivíduo homozigoto .	47
<b>Figura 16.</b>	Gel de poliacrilamida do <i>locus</i> UNH222: as setas menores indicam bandas inespecíficas e as setas maiores, bandas de interesse (em torno de 160 pb).....	48
<b>Figura 17.</b>	Gel de poliacrilamida do <i>locus</i> UNH 231: as setas menores indicam bandas inespecíficas e as setas maiores, bandas de interesse (em torno de 160 pb) .....	48
<b>Figura 18.</b>	Frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> UNH104 .....	54

<b>Figura 19.</b>	Frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> UNH129 .....	55
<b>Figura 20.</b>	Frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> UNH142 .....	55
<b>Figura 21.</b>	Frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> UNH222 .....	56
<b>Figura 22.</b>	Frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> UNH231 .....	57
<b>Figura 23.</b>	Dendograma com os valores de <i>bootstrap</i> obtido a partir de dados de microssatélites, por meio do método UPGMA, com base nos valores de distância genética de Nei (1978) encontrados entre populações de <i>O. mossambicus</i> dos rios Sabié (Corrumane), Limpopo, Umbeluzi e Incomati .....	59
<b>Figura 24.</b>	Gráfico com os resultados do <i>Structure</i> mostrando os valores de Ln(PD) em relação ao número de populações (k) testadas .....	62
<b>Figura 25.</b>	Gráfico que ilustra os resultados do <i>Structure</i> mostrando os valores de $\Delta k$ em relação ao número de populações (k) testadas .....	63
<b>Figura 26.</b>	Gráfico da análise da estrutura do <i>bar plot</i> . a cor vermelha representa a existência de uma única população de <i>O. mossambicus</i> .....	63
<b>Figura 27.</b>	Distribuição das populações de <i>O. mossambicus</i> de todos os locais amostrados através da análise de correspondência fatorial (FCA).....	64
<b>Figura 28.</b>	Zonas de risco de cheias em Moçambique (MICOA, 2005) .....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Coordenadas dos pontos onde foram efetuadas as coletas de <i>O. mossambicus</i> nas bacias dos rios Limpopo, Umbeluzi, Incomati e Sabié.....	32
<b>Tabela 2.</b>	<i>Loci</i> selecionados, número de acesso no genbank e seus respectivos <i>primers</i> .....	35
<b>Tabela 3.</b>	Condições de amplificação para os <i>loci</i> analisados .....	37
<b>Tabela 4.</b>	Condições de amplificação <i>touchdown</i> usada para o <i>locus</i> UNH129. .	37
<b>Tabela 5.</b>	Valores médios das análises merísticas de exemplares de <i>O. mossambicus</i> coletados em diferentes rios de Moçambique .....	41
<b>Tabela 6.</b>	Valores médios das análises morfométricas de exemplares de <i>O. mossambicus</i> coletados em diferentes rios de Moçambique .....	41
<b>Tabela 7.</b>	Características dos <i>loci</i> analisados: <i>locus</i> , tamanho em pares de bases (pb), motivo, número de repetições, número de acesso ao GenBank, sequências <i>sense</i> e <i>antisense</i> .....	45
<b>Tabela 8.</b>	Condições de amplificação para os <i>loci</i> microssatélites .....	45
<b>Tabela 9.</b>	Alelos encontrados no <i>locus</i> UNH104, sem com seus respectivos tamanhos (pb) e unidade de repetição.....	49
<b>Tabela 10.</b>	Alelos encontrados no <i>locus</i> UNH129, sem com seus respectivos tamanhos (pb) e unidade de repetição.....	50
<b>Tabela 11.</b>	Alelos encontrados no <i>locus</i> UNH142, sem com seus respectivos tamanhos (pb) e unidade de repetição.....	50
<b>Tabela 12.</b>	Alelos encontrados no <i>locus</i> UNH222, sem com seus respectivos tamanhos (pb) e unidade de repetição.....	51
<b>Tabela 13.</b>	Alelos encontrados no <i>locus</i> UNH231, sem com seus respectivos tamanhos (pb) e unidade de repetição.....	51
<b>Tabela 14.</b>	Resumo dos dados estatísticos encontrados no cálculo da diversidade genética em cinco <i>loci</i> microssatélites de amostras de <i>O. mossambicus</i> oriundas de 4 rios:.....	53
<b>Tabela 15.</b>	Resumo do teste one-way de ANOVA .....	54
<b>Tabela 16.</b>	Resumo dos valores obtidos no teste de Wilcoxon usando três modelo evolutivos de microssatélites (IAM, TPM e SMM) nas populações dos rios Sabié, Limpopo, Incomati e Umbeluzi .....	58
<b>Tabela 17.</b>	Diferenciação genética utilizando os índices $R_{ST}$ (diagonal superior) e número de migrantes (Nm) (diagonal inferior) de populações de <i>O. mossambicus</i> entre pares de populações de <i>O. mossambicus</i> para todos os <i>loci</i> estudados.....	59

<b>Tabela 18.</b>	Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o $\Phi_{ST}$ e considerando quatro diferentes agrupamentos das populações de <i>O. mossambicus</i> .....	60
<b>Tabela 19.</b>	Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o $R_{ST}$ e considerando quatro diferentes agrupamentos das populações de <i>O. mossambicus</i> .....	61
<b>Tabela 20.</b>	Diferenciação genotípica estimada pelo teste exato de Fisher entre populações de tilápia <i>O. mossambicus</i> .....	65
<b>Tabela 21.</b>	Cheias históricas nas bacias hidrográficas de Moçambique.....	72

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 A TILÁPIA.....	13
1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>O. mossambicus</i> .....	15
1.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICAS.....	16
1.4 IMPORTÂNCIA.....	19
1.5 DIVERSIDADE GENÉTICA DE E CONSERVAÇÃO .....	20
1.6 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	26
1.7 JUSTIFICATIVA.....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	31
<b>3 MÉTODO</b> .....	<b>32</b>
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	32
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA .....	34
3.3 ESCOLHA DOS <i>LOC</i> /MICROSSATÉLITES.....	34
3.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	35
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
3.5.1 Variabilidade genética.....	38
3.5.2 Estrutura genética.....	39
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 ANÁLISES MERISTICAS E MORFOMÉTRICAS.....	41
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL.....	42
4.3 TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES.....	44
4.4 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POPULACIONAL.....	49
4.4.1 Análise intrapopulacional.....	49
4.4.1.1 <i>Alelos encontrados em cada locus microsatélite</i> .....	49
4.4.1.2 <i>Diversidade alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg</i> .....	52
4.4.1.3 <i>Frequências alélicas</i> .....	54
4.4.1.4 <i>Efeito gargalo</i> .....	57



4.4.2 Análise interpopulacional.....	58
4.4.2.1 <i>Diferenciação genética</i> .....	58
4.4.2.2 AMOVA (ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR).....	60
4.5 ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL E FLUXO GÊNICO.....	62
4.6 ANÁLISE DE CORRESPONDÊNCIA FATORIAL.....	63
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
5.1 ANALISES MERISTICAS E MORFOMÉTRICAS.....	66
5.2 DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL.....	67
5.3 ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES.....	70
5.4 IMPLICAÇÕES DA GENÉTICA PARA O CULTIVO E A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE <i>O. mossambicus</i> .....	75
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A TILÁPIA

As tilápias são peixes de água doce originárias da África. Pertencem à família Cichlidae. Incluem-se entre os peixes mais cultivados no mundo, devido a sua rusticidade, crescimento rápido e não requerer tecnologia sofisticada para o seu cultivo. Foram introduzidas de forma acelerada nos países tropicais e subtropicais e são, atualmente, cultivadas em cerca de 100 países (CAMPO, 2006).

De acordo com Hilsdorf (1995), as tilápias exibem vantagens que as tornam um grupo de peixes de interesse mundial, como, por exemplo: alta adaptabilidade a diferentes condições do meio; vivem em ampla faixa de acidez e alcalinidade da água; são de fácil reprodução; crescem e se reproduzem em águas salobras e salgadas; toleram altas concentrações de amônia tóxica; possuem alta resistência a doenças; têm elevada produtividade; e, são geralmente herbívoros, aceitando todo tipo de alimentos, tanto naturais como artificiais (POPMA & LOVSHIN, 1994; GRAEFF & PRUNER, 2006). Segundo Campo (2006), 98% de toda a produção é realizada fora do ambiente natural da tilápia, recebendo o nome de “galinhas aquáticas” devido a sua aparente facilidade de cultivo.

O termo tilápia provém da palavra peixe do dialeto Bushman da África do Sul. Este termo surgiu da dificuldade que A. Smith (o autor do nome) tinha de pronunciar esta palavra em Bushman (TRAWERAS 1982, *apud* PULLIN & MCCONNELL, 1982).

Para seu manejo técnico e científico, as mais de 70 espécies (FITZSIMMONS, 2000) e 100 subespécies de tilápias foram agrupadas em quatro gêneros da tribo Tilapini, de acordo com os seus hábitos reprodutivos, sendo eles *Oreochromis*, *Tilapia*, *Sarotherodon* e *Danakilia* (CAMPO, 2006).

A partir de 1930 até meados dos anos 70, a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus* Peter, 1852) foi introduzida em diversos países para aquicultura, controle de ervas daninhas e de determinados insetos. Este peixe é mais cultivado na Ásia do que na África, seu local de origem. Durante a segunda guerra mundial, a tilápia foi uma fonte inestimável de alimento protéico para a população da Indonésia (COSTA-PIERCE & RAKOCY, 1997). É uma das quatro

espécies de tilápia mais cultivadas, entre as quais se incluem a tilápia do Nilo (*O. niloticus*), a tilápia azul (*O. aureus*) e a tilápia de Zanzibar (*O. urolepis hornorum*) (KUBITZA, 2000)

A tilápia de Moçambique tem contribuído com material genético para a formação de diversas linhagens. Uma das mais conhecidas é o híbrido vermelho denominado tilápia vermelha da Flórida (TVF) resultante do cruzamento entre o mutante vermelho de *O. mossambicus* e *O. urolepis hornorum*. O aparecimento de mutantes vermelhos de *O. mossambicus* possibilitou o desenvolvimento de linhagens híbridas com colorações que variam de rosa claro a amarelo-laranja até tons laranja-avermelhado. Estas linhagens permitiram a inserção da tilápia em mercados onde, originalmente, não eram bem aceitas. São genericamente conhecidas como tilápias vermelhas e recebem os mais diferentes nomes (Saint Peter e Saint Pierre, Red Koina, tilápia vermelha da Flórida, tilápia vermelha da Jamaica, tilápia vermelha de Taiwan) (WATANABE *et al.*, 1997).

Um híbrido muito usado em piscicultura é o originado a partir do cruzamento entre *O. mossambicus* e *O. niloticus* (MACARANAS *et al.*, 1986). Agresti *et al.* (2000) criaram um centro de origem artificial (ACO) para tilápias através de um programa de cruzamentos interespecíficos de cinco grupos de peixes: *Oreochromis niloticus* (On) do tipo selvagem, linhagens vermelhas de *O. niloticus* (ROn), *O. aureus* (Oa), *O. mossambicus* (Om) e *Sarotherodon galilaeus* (Sg). Um mapa genômico foi criado, por exemplo, para cada parental numa família Om x (Oa x ROn) usando marcadores microssatélites e AFLP.

Segundo Kamal & Mair (2005), a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) domina o cultivo em água doce, mas é uma das menos tolerantes a água salgada. *O. mossambicus*, por sua vez, são mais tolerantes a altas salinidades, mas tendem a ter menores taxas de crescimento. Esses autores compararam o desempenho do cultivo das tilápias *O. niloticus*, *O. mossambicus* e seus híbridos em água com salinidades de 0, 7,5, 15, 22,5 e 30ppt. Verificaram que houve uma correlação entre o crescimento e a salinidade. De uma forma geral, os híbridos mostraram um melhor desempenho em termos de ganho de peso em relação a *O. mossambicus* em todas as salinidades testadas. Enquanto que em relação a *O. niloticus*, tiveram um crescimento maior apenas em salinidades acima de 10ppt. A sobrevivência da tilápia *O. niloticus* foi baixa em salinidades a partir de 22,5 ppt, provavelmente, devido à suscetibilidade a

doenças e ao estresse. Este trabalho mostra a importância de *O. mossambicus* para o desenvolvimento do cultivo de tilápia em água salgada.

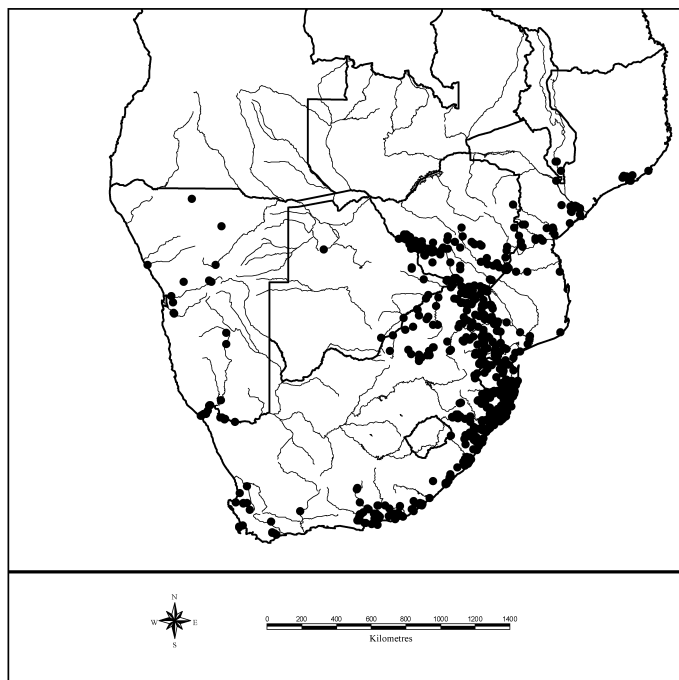
## 1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *O. mossambicus*

O primeiro trabalho sobre a distribuição de *O. mossambicus* foi realizado por Peter, em 1852, no qual o autor se refere ao habitat natural desta espécie nas regiões de Tete, Sena, Quelimane, Lumbo, Inhambane, Quirimba, situadas em Moçambique. Ocorre do baixo Zambezi até Tete, incluindo a zona costeira de Moçambique a partir de Quelimane, ao norte do delta Zambezi e próximo à zona sul do rio Limpopo. É encontrada também nos afluentes do rio Zambezi no baixo Shiré e Mazoe (TREWAVAS, 1983).

Trabalhos mais recentes indicam que esta espécie distribuiu-se em bacias hidrográficas que incluem, além de Moçambique, os países África do Sul, Zimbábue, e Suazilândia (Figura 1). Atualmente, encontra-se amplamente distribuída ao redor do mundo (SCOTT *et. al*, 2006).

*O. mossambicus* pode mover-se de um estuário para outro, principalmente durante as cheias. A distribuição original da tilápia na África foi modificada por introduções deliberadas ou não planejadas de várias espécies fora da sua área de distribuição natural (dentro da mesma bacia ou de uma bacia para outra). Esta transferência tinha diferentes objetivos: estocagem em lagos naturais nos quais as tilápias não ocorriam; introdução em um habitat natural para ocupar um nicho ecológico não ocupado por alguma das tilápias presentes, a fim de aumentar a produção pesqueira; controle biológico de vegetação aquática ou para o controle de mosquitos; e, para aqüicultura (as espécies cultivadas acidentalmente escapavam para o meio natural) (PHILIPPART & RUWET, 1982).

Introduções involuntárias ocorrem durante a introdução deliberada de outra espécie ou por causa da confusão entre espécies simpátricas. Em vários casos é impossível saber se a presença de uma dada espécie é uma ocorrência natural ou simplesmente resultado da atividade humana. Um exemplo é a presença de *O. mossambicus* no rio Thalamakane em Botsuana, em pequenos corpos de água no deserto da Namíbia e em 2 tributários do médio Zambezi em Moçambique, onde esta espécie era considerada ausente (PHILIPPART & RUWET, 1982).



**Figura 1:** Mapa da região  
*mossambicus* Fonte: Scot

il da tilápia *O.*

### 1.3 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

Morfologicamente a tilápia *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) (Figura 2) apresenta-se da seguinte forma: nadadeira dorsal com 15 a 17 espinhos, 10 a 13 raios ramificados; nadadeira anal com 3 espinhos e 9 a 12 raios ramificados; linha lateral com 30 a 32 escamas; juvenis de cor prateada, com 6 a 7 barras verticais e 3 manchas pretas; adultos de cor verde prateado e azul acinzentado escuro; nadadeira dorsal e caudal com margem vermelha; tamanho máximo de 40 cm; corpo moderadamente espesso, não muito alongado; nadadeira caudal truncada; cabeça das fêmeas e juvenis com um perfil reto, e côncavo em machos; mandíbulas com 3 a 5 fileiras de dentes delgados e bicúspides na linha externa, as mandíbulas dos machos mais velhos são ampliadas e os dentes são projetados para frente; possuem 16-20 arcos branquiais; os machos distinguem-se das fêmeas em especial, no período da desova, por possuírem cores muito mais vivas, com uma cor preta acinzentada na região dorsal e esbranquiçada na parte inferior (ventral) da cabeça; o peso máximo registrado, em ambiente natural, foi de 3,265 kg na África do Sul, 2,181 kg em Zimbábue e 0,640 kg em Malawi (SKELTON, 2001).



**Figura 2:** Exemplar de *O. mossambicus*. Fonte: Scott *et al.*(2006)

*O. mossambicus* ocorre em águas de fluxo lento, proliferando-se em águas paradas (PHILIPPART & RUWET, 1982). O período de reprodução de *O. mossambicus* inicia-se em setembro (20 – 26°C) e prolonga-se até março, mas a máxima atividade concentra-se entre setembro e dezembro. Um ciclo completo de reprodução leva cerca de 7 semanas. As fêmeas têm múltiplas desovas a cada 3 ou 4 semanas durante uma estação. Os machos constroem os ninhos em forma de pires sobre fundos arenosos. As fêmeas incubam os ovos e protegem as larvas e os alevinos na boca. Os juvenis formam cardumes nas águas rasas. Crescem rapidamente, podendo amadurecer e desovar dentro de um ano. Seu desenvolvimento é comprometido em condições adversas (BRUTON & BOLT, 1975).

*O. mossambicus* é incapaz de adaptar-se a elevações de pressão que ocorre com o aumento da profundidade da água, sobrevive até uma profundidade máxima de 20 metros a uma temperatura de 30°C e 7 metros a 15°C (CAULTON & HILL, 1975).

As tilápias são peixes tropicais que apresentam, em geral, um conforto térmico entre 27 e 32°C. Temperaturas abaixo ou acima desta variação reduzem o apetite e o crescimento. Abaixo de 20°C, o apetite fica extremamente reduzido e aumenta os riscos a doenças. Em temperaturas abaixo de 18°C, o sistema imunológico das tilápias é suprimido. Assim, o manuseio e o transporte destes peixes nos meses de inverno e início da primavera resultam em grandes mortalidades devido a infecções bacterianas e fúngicas. Temperaturas na faixa de 8 a 14°C, geralmente, são letais (GRAEFF & PRUNER, 2006). Por sua vez, *O. mossambicus* é uma espécie euritérmica que tolera uma ampla variação de

temperatura (8 a 42°C), porém a temperatura ótima para seu desenvolvimento varia de 17 a 35°C.

As tilápias toleram baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água. A concentração crítica de oxigênio para *O. niloticus* e híbridos desta espécie com *O. mossambicus* situa-se entre 20 e 10% de saturação (1,6 a 0,7 mg/L), em temperaturas de 26 a 35°C (BECKER & FISHELSON, 1986).

As tilápias apresentam baixa sobrevivência em águas com pH abaixo de 4,0. Em águas com pH 2,0, a tilápia não sobrevive por mais de 12 horas. Quando expostas a pH baixo, mostram sinais de asfixia (movimentos operculares acelerados e boquejamento na superfície). Exposições a águas ácidas causam aumento na secreção de muco, irritação e inchaço nas brânquias, culminando com a destruição do tecido branquial. Os peixes morrem com a boca aberta e apresentam olhos saltados. O pH da água no cultivo de tilápias deve ser mantido entre 6 e 8,5. Abaixo de 4,5 e acima de 10,5 a mortalidade é significativa (GRAEFF & PRUNER, 2006).

A amônia existente na água provém da excreção nitrogenada dos próprios peixes e de outros organismos aquáticos, bem como da decomposição microbiana de resíduos orgânicos que pode prejudicar o desempenho, aumentar a incidência de doenças e, até mesmo, causar a morte direta dos peixes por intoxicação. Está presente na água sob forma de amônia ( $\text{NH}_3$ ) e na forma iônica amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Para saber quanto da amônia total está na forma tóxica, é preciso medir o pH da água. Quanto maior for o pH, maior será a porcentagem de amônia tóxica. Assim, uma água com 2 mg/L de amônia total pode conter apenas 0,00014 mg de  $\text{NH}_3$ /L a pH 7 (0,7%) ou níveis tóxicos maiores que 1 mg/L em água com pH acima de 9,3. Concentrações de amônia abaixo de 0,24 mg/L são consideradas adequadas para as tilápias (REDNER & STICKNEY, 1979).

*O. mossambicus* é uma das espécies de tilápia mais tolerantes à salinidade. Sobrevive bem a concentrações de sal de até 70ppt e tolera concentrações próximas a 120ppt quando adaptada gradualmente. Consegue se reproduzir em águas com salinidade próxima a 50ppt (TREWAVAS, 1983). Nas lagoas e lagos costeiros, as conexões irregulares com o mar levam a uma seqüência de altas e baixas salinidades. As populações de *O. mossambicus* que ocorrem nestes locais têm, portanto, tolerância a uma variação muito ampla de salinidade (WHITFIELD & BLABER, 1979; WATANABE *et al.*, 1997).

As tilápias, entre as quais se inclui *O. mossambicus*, têm um regime alimentar variado, com um componente vegetal dominante (algas, fitoplâncton, detritos vegetais, sedimentos finos ricos em diatomáceas e bactérias) e um componente animal (zooplâncton e organismos bênticos, tais como larvas de insetos, crustáceos e moluscos). Além disso, *O. mossambicus* pode alimentar-se também de insetos terrestres que flutuam na superfície da água. Sua alimentação ocorre durante o dia, com maior intensidade entre 12:00h e 15:00h (PHILIPPART & RUWET, 1982).

## 1.4 IMPORTÂNCIA

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), por volta de 2020, a população mundial deverá ultrapassar nove bilhões de habitantes. A população atual de Moçambique é estimada em cerca de 20,5 milhões de habitantes com taxa de crescimento de 2,5%. Estima-se que no ano 2025, a população será de 35 milhões de habitantes (HOGUANE, 2007). Em 2004-2006, o número de pessoas subnutridas em Moçambique era de 7,5 milhões de habitantes, ou seja, 37% da população total (ONU, 2009). Esses índices apontam para a necessidade de se equacionar uma produção de alimentos que esteja em congruência com as pressões geradas pelo aumento populacional e pela subnutrição, através do desenvolvimento sustentável dos recursos naturais (MOREIRA, 2003).

Estimativas recentes feitas pela ONU indicam que o suprimento de produtos oriundos do mar deverá aumentar sete vezes até o ano 2020 para suprir a demanda mundial. Em vista do rápido declínio nos estoques pesqueiros, causado principalmente pela pesca e captura predatória, esta demanda só poderá ser suprida pela aquicultura (MOREIRA, 1999).

Dados da Organização de Agricultura e Alimentação (FAO, 2009) mostram que em 2007 a produção mundial de pescado alcançou 140 milhões de toneladas. Enquanto a produção oriunda da captura estacionou ao redor de 90 milhões de toneladas desde 2001, a aquicultura continuou a mostrar um forte crescimento, com uma taxa anual média de 6,5%, passando de 36,8 milhões em 2002 para 50,3 milhões de toneladas em 2007. Entre as espécies mais cultivadas no mundo, incluem-se carpas, tilápias, salmões, camarões e moluscos (ostras, mexilhões, mariscos e vieiras).



Em 2005, o consumo per capita global de pescado foi estimado em 16,4 kg, contabilizando 15,6 % da ingestão da população global de proteínas animais e 6,0% de todas as proteínas consumidas. Estimativas preliminares para 2007 indicam um aumento do consumo per capita para 17,0 kg (FAO, 2009).

O desenvolvimento da aquicultura em Moçambique e em vários países do mundo tem um papel importante no desenvolvimento sócio-econômico, uma vez que garante proteínas de baixo custo, melhoria da dieta da população, geração de empregos, promoção do desenvolvimento regional e redução da pobreza.

Em Moçambique, a aquicultura é uma atividade relativamente nova. O país contribui somente com 907 t da produção mundial de pescado oriundo da aquicultura (FAO, 2007). O cultivo de espécies de água doce, como a tilápia, já existe a várias décadas (desde 1950) de maneira artesanal. As potencialidades para o desenvolvimento da aquicultura em Moçambique são enormes, com a existência de condições propícias para investimentos devido a: clima favorável (tropical e subtropical); ambiente livre de poluição; baixa pressão populacional; disponibilidade de terra para a aquicultura costeira; e, existência de espécies nativas com grande potencial como, por exemplo, *Penaeus monodon* (camarão tigre), *Penaeus indicus* (camarão branco) e *Oreochromis mossambicus* (tilápia) (FAO, 2003).

## 1.5 DIVERSIDADE GENÉTICA E CONSERVAÇÃO

A aplicação da genética em aquicultura na África é restringida pela pesquisa científica deficitária, decorrente da falta de recursos financeiros e de incentivo por parte dos órgãos governamentais. O desenvolvimento da pesquisa em genética depende da comunidade doadora, uma vez que os governos não possuem condições financeiras para suportar os custos de pesquisa, além de não darem prioridade a essa área (CHANGADEYA *et al.*, 2003). Apesar de existirem fundos para a investigação em aquicultura, apenas um valor muito limitado é reservado para a pesquisa em genética (YAPI-GNAORÉ, 2002).

A caracterização genética é de grande importância na piscicultura, uma vez que garante o conhecimento da base genética dos plantéis em cultivo e estes determinarão o sucesso do produto final. Com este conhecimento é possível dar assistência aos criadores, de modo a orientá-los quanto ao manejo adequado dos reprodutores e a obterem o retorno financeiro desejado (MELO *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de marcadores moleculares de DNA trouxe um grande impulso aos estudos de genética. As técnicas de análise de genomas e a criação de mapas genéticos de alta resolução estão se desenvolvendo em grande velocidade graças ao uso desses marcadores. Tal relevância deve-se ao seu elevado número e à facilidade de análises por reações em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKO *et al.*, 1988). Os marcadores moleculares são utilizados em estudos de taxonomia molecular, estrutura populacional, graus de parentesco, biodiversidade molecular, evolução, identificação de regiões do genoma associadas a caracteres de interesse, construção de mapas genéticos, entre outros (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores moleculares são rotineiramente utilizados para a investigação da estrutura genética de populações naturais (BALLOUX, 2002). Eles permitem identificar espécies independentemente do seu estágio de vida (FERGUNSON, 1995).

Dentro do campo da genética da conservação, os marcadores moleculares são ferramentas de suma importância que permitem elucidar temas como: os efeitos deletérios da endogamia sobre a reprodução e a sobrevivência; perda da diversidade genética e da habilidade de evoluir em resposta a mudanças ambientais; fragmentação das populações e redução do fluxo gênico; manejo genético de populações em cativeiro e efeitos adversos da adaptação ao meio ambiente (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Os principais marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BOTSTEIN *et al.*, 1980) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (JEFFREYS *et al.*, 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS *et al.*, 1990); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*) (PARAN & MICHELMORE, 1993); microssatélites (LITT & LUTTY, 1989); e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS *et al.*, 1995). Outro tipo de marcador são as aloenzimas que são denominadas de marcadores bioquímicos.

Destes marcadores, os microssatélites apresentam numerosas vantagens quando comparados aos demais, devido às características que apresentam (LITT &

LUTY, 1989). São também conhecidos como “*simple sequences repeats*” (SSR) ou “*short tandem repeats*” (STR) (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Os microssatélites são pequenas sequências de DNA que se repetem (de 1 a 6 nucleotídeos). Distribuem-se ao acaso por todo o genoma, no qual ocorrem em abundância. Apresentam grande polimorfismo, o que os torna bastante informativos. São de fácil identificação e têm sido utilizados em mapas de ligação, para identificação individual em testes de paternidade e caracterização genética de populações (JACOB *et al.*, 1991; MENEZES *et al.*, 2006).

As diferentes repetições de microssatélites são divididas em: (a) repetições perfeitas (quando não apresentam nenhuma interrupção); (b) repetições imperfeitas (quando são interrompidas por bases não repetidas); (c) repetições compostas (quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes). As repetições compostas podem ser perfeitas ou imperfeitas (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Os microssatélites são flanqueados por sequências únicas que são geralmente conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie. Este fato permite a seleção de iniciadores (*primers*) específicos que amplificam fragmentos contendo DNA repetitivo por meio da PCR. Por basearem-se em PCR para sua análise, necessitam apenas de pequenas quantidades de DNA. Os microssatélites possuem características co-dominantes, o que lhes permite discriminar os heterozigotos dos homozigotos. São altamente polimórficos, devido ao número de repetições das bases (HANCOCK, 1999) que pode ser variável entre os indivíduos de uma mesma espécie. São de herança mendeliana e multialélicos (STRASSMAN *et al.*, 1996). Encontram-se distribuídos aleatoriamente pela região eucromática do genoma de diversos organismos, o que permite uma cobertura completa dos cromossomos de uma dada espécie (LITT e LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; LOVE *et al.*, 1990; CHISTIYAKOV *et al.*, 2005). Podem estar presentes tanto em regiões codificadoras como não codificadoras (ZANE *et al.*, 2002).

Os marcadores microssatélites são aplicados em estudos populacionais. É possível revelar a estrutura e a diferenciação genética e geográfica das populações em estudo através da análise das frequências alélicas, cálculo de heterozigosidade e distância genética (ZHANG *et al.*, 2006).

Vários mecanismos são sugeridos para explicar a alta taxa de mutação de microssatélites, incluindo erros durante a recombinação, *crossing-over* desigual e

“escorregões” da DNA-polimerase durante a replicação ou reparação (STRAND *et al.*, 1993).

Os modelos mutacionais são utilizados para obter o número esperado de alelos em uma população a partir da heterozigiosidade observada e também na análise estatística da variabilidade genética. Dentre esses modelos, pode-se citar: o modelo de alelos infinitos (IAM); o modelo de mutação passo a passo (SMM); e, o modelo de mutação de duas fases (TPM) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O modelo dos alelos infinitos (IAM) rejeita eventos de homoplasia, sugerindo que cada mutação é resultado da criação aleatória de um novo alelo (KIMURA & CROW, 1964). Alelos idênticos compartilham o mesmo ancestral e são idênticos por descendência (BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002). Ao aplicar este modelo em *loci* microssatélites, as mutações alteram o número de repetições, no entanto a proximidade em termos do número de repetições não indica uma maior relação filogenética. Trata-se do modelo clássico de Wright (1931) que utiliza a estatística F (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O modelo de mutação passo a passo (SMM) assume que todo evento mutacional envolve uma mudança numa única repetição (KIMURA & OHTA, 1978; BELL & JURKA, 1997). Cada mutação cria um novo alelo quer por adição ou por deleção de uma única unidade repetitiva. Isto implica que dois alelos que diferem por um único motivo estão mais relacionados (ou seja, possuem um ancestral comum mais recente) em relação a alelos que diferem por várias repetições. Slatkin (1995) propôs uma medida de diferenciação genética ( $R_{ST}$ ) semelhante à de Wright (1951) ( $F_{ST}$ ) e à de Nei (1973) ( $G_{ST}$ ), mas baseada no modelo SMM. Este modelo é usado, normalmente, para estimar relações entre indivíduos e estrutura da população, exceto na presença de homoplasia (quando dois alelos são idênticos por estado e não por descendência). O modelo descrito por Slatkin (1995) baseia-se em características com distribuição contínua, número de pares de bases ou número de repetições, e grupos de indivíduos de acordo com o número de repetições.

Di Rienzo *et al.* (1994) introduziu o modelo de duas fases (TPM) como uma extensão do modelo SMM para estudos com microssatélites. Este modelo leva em conta uma grande proporção de eventos mutacionais que envolvem a adição ou deleção de várias unidades de repetição.

A escolha do modelo teórico a ser aplicado em análises de microssatélites depende dos pressupostos subjacentes a cada modelo (ZHANG *et al.*, 2006).

Dentre as vantagens do uso de microssatélites na análise de variabilidade genética inclui-se a detecção de *loci* únicos, utilizando-se condições altamente estritas (temperaturas de anelamento altas: 55°C a 60°C). Temperaturas de anelamento mais altas possibilitam a análise de um *locus* específico (HOSHINO *et al.*, 2002). Outra grande vantagem dos microssatélites é a possibilidade de utilização de *primers*, desenvolvidos para uma determinada espécie, em espécies relacionadas para a detecção de *loci* SSR. A este processo denomina-se de *transferibilidade* ou *amplificação cruzada*, que permite que uma outra espécie seja avaliada com marcadores potentes, sem a necessidade de gastos com o desenvolvimento de *primers* (HOSHINO *et al.*, 2002).

Os microssatélites predominantes em peixes compreendem repetições de duas bases (GT/AC)<sub>n</sub> ou (CT/GA)<sub>n</sub> (GOFF *et al.*, 1992), sendo úteis para análises de estrutura de populações e características quantitativas (KELLOGG *et al.*, 1995).

*Loci* polimórficos de microssatélites são frequentemente aplicados à análise de diversidade genética, à identificação de parentesco e à criação de programas de cultivo de peixe (CHISTIYAKOV *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006). Em aquicultura, estes marcadores são usados para identificação de genes responsáveis por características de interesse econômico para aplicação em programas de melhoramento (CHISTIYAKOV *et al.*, 2005).

Atualmente, é cada vez mais crescente o número de estudos com tilápias usando marcadores moleculares, principalmente para o monitoramento de programas de melhoramento e conservação, estudos da variabilidade genética, filogenia, caracterização genética, hibridização e outros (COSTA-PERCE & DOYLE, 1997; CALETON *et al.*, 2001; ROGNON & GUYOMARD, 2003; WON *et al.*, 2006; EL-SERAFY *et al.*, 2007).

Gregg *et al.* (1998) utilizaram marcadores moleculares aloenzimáticos em um estudo com três espécies de tilápia (*O. mossambicus*, *O. mortimeri* e *O. macrochir*) existentes em Zimbábue, nos lagos Kariba e Kyle, e evidenciaram a existência de hibridização entre estas espécies.

Kocher *et al.* (1998) construíram um mapa genético da tilápia *Oreochromis niloticus*, utilizando marcadores de DNA. Estudaram a segregação de 62 microssatélites e 112 marcadores aleatórios anônimos gerados por AFLP (polimorfismo no comprimento dos fragmentos amplificados) em 41 embriões haplóides derivados de uma única fêmea. Identificaram os vínculos entre 162

(93,1%) desses marcadores. Verificaram que 95% dos microssatélites e 92% dos marcadores AFLP estavam ligados no mapa final.

Lee *et al.* (2005) construíram a segunda geração do mapa genético de ligação da tilápia (*Oreochromis* spp), a partir da progênie F2 de um cruzamento interespecífico entre *O. aureus* e *O. niloticus*. O mapa apresentou 525 microssatélites e 21 marcadores baseados em genes.

MELO *et al.* (2006) caracterizaram geneticamente 235 indivíduos de seis plantéis de tilápia da região sudeste do Brasil, utilizando 5 *loci* microssatélites, tendo se verificado diferença genética entre os seis plantéis, obtida pelo cálculo do índice de fixação de alelos.

Nyingi *et al.* (2009) caracterizaram populações da tilápia *O. niloticus* no Quênia usando o DNA mitocondrial como marcador molecular para determinar a origem das populações locais.

Marcadores genéticos com métodos de inferência estatísticos bem estabelecidos podem ser usados para identificar as forças, tanto naturais como antrópicas, que são responsáveis pela perda de diversidade genética. Além disso, os genes fornecem um meio cada vez mais popular e eficaz para a compreensão de aspectos importantes do comportamento, movimentos e dinâmica de populações de espécies de grande importância para programas de conservação (GROOM *et al.*, 2006).

A diversidade genética pode ser explicada pela existência de diferentes genótipos dentro de uma população (VILA *et al.*, 1997). Segundo Fisher (1930), "A taxa de mudança evolutiva na população é proporcional à quantidade de diversidade genética disponível".

A biologia da conservação é um campo relativamente recente. Esta área de conhecimento aplica os princípios de ecologia, biogeografia, genética populacional, economia, sociologia, antropologia, filosofia e outras disciplinas para manutenção da diversidade biológica (MEFFE *et al.*, 2006).

A genética da conservação, por sua vez, trata da teoria e de todas as técnicas da genética aplicadas para preservar espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais (SOLÉ-CAVA, 2001). A variação genética fornece a matéria-prima para a futura adaptação de uma espécie e é a base para a "flexibilidade" evolutiva e a capacidade de resposta às mudanças ambientais. A variação genética deve ser preservada, tanto a curto como a longo prazo porque ela garante a sobrevivência das espécies. A diversidade genética (medida em nível dos

genes ou características genéticas quantitativas) representa o nível primário da biodiversidade. Os genes regulam todos os processos biológicos do planeta. Todos os produtos bioquímicos, cada padrão de crescimento, cada comportamento instintivo, cada padrão morfológico é codificado em uma biblioteca genética "de uma extensão global inimaginável" (SCRIBNER *et al.*, 2006).

As técnicas moleculares e a genética de populações podem complementar estudos ecológicos de demografia e comportamento, ajudando a fazer previsões confiáveis das tendências das populações e controlá-las face a ameaças à sobrevivência das espécies e do seu potencial evolutivo. Assim, a genética da conservação tem dois objetivos fundamentais: ajudar a manter os padrões naturais de diversidade genética em vários níveis e, assim, preservar as opções para a evolução futura, e fornecer ferramentas para o monitoramento e avaliação das populações que podem ser usadas para planos de conservação (SCRIBNER *et al.*, 2006).

O Governo de Moçambique, por meio do Ministério da Coordenação da Ação Ambiental, definiu a conservação da biodiversidade como objetivo prioritário nacional em relação às obrigações surgidas da Convenção sobre a Diversidade Biológica (MICOA, 2003).

Assim, com os resultados gerados no presente trabalho pretende-se fornecer informações que possam contribuir para o desenvolvimento da aquicultura em Moçambique, bem como para planos de manejo para a manutenção da variabilidade genética dos estoques naturais da tilápia *Oreochromis mossambicus* Peters, 1852.

## **1.6 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO**

As coletas de tilápia foram realizadas em três bacias hidrográficas (do rio Limpopo, Incomati e Umbeluzi) situadas ao sul de Moçambique. Um dos pontos de coleta foi no rio Sabié que pertence à bacia do rio Incomati.

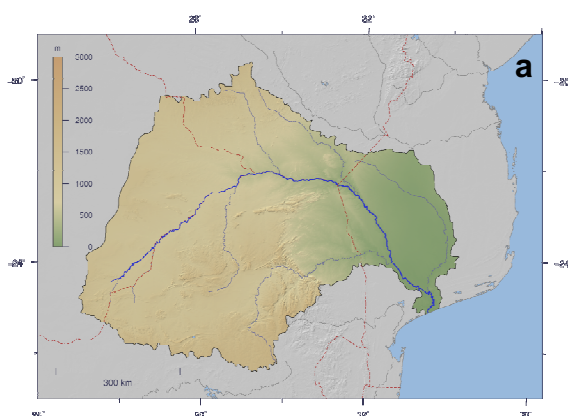
O rio Limpopo (Figura 3 a,b) tem 1.461 km de extensão e possui uma bacia hidrográfica com uma área de 412.000 km<sup>2</sup>, partilhada com quatro países da Comunidade para o Desenvolvimento da África Austral (SADC - *South African Development Community*), nomeadamente África do Sul, Botsuana, Zimbábue e Moçambique. A bacia do rio Limpopo localiza-se entre os paralelos 22° e 26° Sul e

entre os meridianos 26° e 35° Leste. Em Moçambique, enquadra-se entre os paralelos 22° e 25° Sul e os meridianos 31° e 35° Leste. Constitui um dos principais rios de Moçambique (BRITO *et al.*, 2009). É o segundo rio mais extenso e abastece o maior sistema de irrigação do país.

O rio Limpopo nasce na confluência dos rios Marico e Crocodilos na zona noroeste de Pretória, África do Sul. Em Moçambique, o rio percorre 561 km antes de desaguar no Oceano Índico em Zongoene, a 60 km da cidade de Xai-Xai. Este rio sofre variações consideráveis devido a períodos de seca e cheias. O nível de água é muito baixo durante a estação seca (BRITO *et al.*, 2009).

Em certos anos, pode permanecer seco por alguns meses. Seu leito reduziu-se bastante no baixo Limpopo, a partir da barragem de Macarretane até a foz do rio Zongoene, devido à construção de reservatórios e barragens nos países a montante (MINISTÉRIO DA ADMINISTRAÇÃO ESTATAL, 2005).

As águas do rio Limpopo tendem a ser altamente mineralizadas (salinas) devido a vários motivos: a) o fato de o rio drenar uma área de captação árida; b) o fluxo de água salina drenada dos vários sistemas de irrigação existentes ao longo de suas margens, o que aumenta a condutividade e a concentração de sais em direção à jusante; c) e, no período seco ocorre penetração de água do mar (salgada) para o interior, até 80 km da costa (MINISTÉRIO DA ADMINISTRAÇÃO ESTATAL, 2005).



**Figura 3a:** Bacia do rio Limpopo. Fonte: Brito *et al.* (2006)



**Figura 3b:** Detalhe do rio Limpopo

O rio Incomati (Figura 4) nasce na África do Sul e passa pela Suazilândia. Em Moçambique, depois de percorrer 120 km, o rio deságua por um estuário no Oceano Índico, no Distrito de Marracuene. Esta bacia tem 14.925 km<sup>2</sup> em território Moçambicano (32% do total da bacia partilhada com a África do Sul e Suazilândia).



Os principais afluentes são Komati, Crocodilo e Sabié (Figura 5). A precipitação média anual, na área moçambicana da bacia, é de cerca de 650 mm (ARA-SUL, 2010).

O rio Incomati é bastante propenso à intrusão salina, que está associada aos baixos níveis de água que se têm verificado ultimamente e à maré que chega a atingir 1,0 m na região estuarina. A ocorrência de intrusão é bastante alta mesmo na época chuvosa. Neste período, os episódios de cheias são freqüentes. Em Moçambique, além da barragem de Corrumana, encontram-se infra-estruturas de irrigação com uma área aproximada de 26.000 ha (LEESTEMAKER *et al.*, 2000).



**Figura 4:** Rio Incomati



**Figura 5:** Rio Sabié

O rio Umbeluzi possui uma bacia internacional com uma área total de 5.460 km<sup>2</sup>, dos quais 58% estão na Suazilândia, 1% na África do Sul e 41% em Moçambique. O rio nasce na Suazilândia a uma altitude de 1.680 m e corre para o leste, entrando no território nacional pela vila fronteiriça de Goba. Os principais afluentes em Moçambique são os rios Calichane e Movene, respectivamente a montante e a jusante (Figura 6).

Possui uma cobertura vegetal caracterizada por um extrato abundante de gramíneas, predominando as matas cerradas e matas baixas abertas junto à fronteira e à zona central. Na parte restante predominam matas e parques de árvores. O clima é seco com exceção da zona de Goba que é tropical chuvoso de savana. Na zona norte, o clima é seco com estação seca no inverno e uma pequena mancha com clima temperado úmido sem estação seca. A temperatura média varia entre 20 e 25°C (ARASUL, 2010).

A precipitação média é de 736 mm. A época chuvosa tem início em novembro no litoral e em outubro nos Pequenos Libombos, terminando em abril e março,

respectivamente. A duração da precipitação é de cerca de 6 meses, chegando aos 7 - 8 meses na região de Namaacha. A maior concentração de chuvas ocorre de dezembro a fevereiro. Este rio possui duas obras hidráulicas de grande vulto: a Barragem de Mnjoli na Suazilândia e a Barragem dos Pequenos Libombos em Moçambique (IUCN, 2006).



**Figura 6:** Detalhe do rio Umbeluzi

## 1.7 JUSTIFICATIVA

No intuito de reduzir a pobreza absoluta e minimizar os efeitos da fome que se fazem sentir no país, o Instituto Nacional de Investigação Pesqueira de Moçambique está desenvolvendo um projeto piloto de criação de tilápias em gaiolas no Lago Niassa, com o objetivo de expandir esta técnica para todo o país. Pretende-se também iniciar o cultivo de tilápias em viveiros, iniciando-se pela região sul.

Existem no mundo, particularmente no Brasil, vários estudos que relatam o desempenho das tilápias em sistemas de cultivo. Esses estudos, aliado ao conhecimento da variabilidade genética das tilápias existentes nas águas moçambicanas é de suma importância, uma vez que com base nele poder-se-á selecionar variedades mais apropriadas para o cultivo, que tenham um crescimento rápido, bom índice de conversão alimentar e resistência a doenças.

Um estudo em nível molecular pode mostrar o grau de hibridação entre espécies existentes no meio natural, bem como conhecer as possíveis diferenças genéticas intra e inter populacional de *Oreochromis mossambicus* de diferentes bacias em Moçambique de maneira a contribuir para estabelecer medidas de conservação dos estoques nativos existentes. Em Moçambique, não existem

estudos em nível molecular deste peixe. Deste modo, os resultados do presente trabalho poderão fornecer um suporte técnico e científico para a seleção das espécies com melhor desempenho para o cultivo e para medidas de conservação da variabilidade genética em seu ambiente natural.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a diversidade genética das populações de *Oreochromis mossambicus* existentes nas bacias dos rios Limpopo, Incomati e Umbeluzi e no rio Sabié, em Moçambique, por meio de marcadores moleculares microssatélites.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar a variabilidade genética dos estoques de tilápia *O. mossambicus* coletados nos rios Limpopo, Incomati, Umbeluzi e Sabié;
- Testar a hipótese nula de não diferenciação dos estoques selvagens de tilápia coletados nos rios acima indicados;
- Propor estratégias para conservação dos estoques de cada local de coleta.

## 3 MÉTODO

### 3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 200 amostras de *Oreochromis mossambicus*: 50 da bacia do rio Limpopo; 50 da bacia do rio Umbeluzi; 50 do rio Incomati; e, 50 do rio Sabié (Tabela 1 e Figura 7).

**Tabela 1:** Coordenadas dos pontos onde foram efetuadas as coletas de *O. mossambicus* nos rios Limpopo, Incomati, Sabié e Umbeluzi

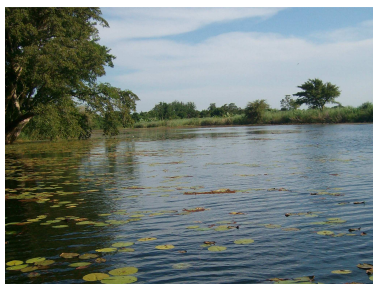
Local	Longitude	Latitude
Rio Limpopo	23°52'54,45" S	32°08'08,45" L
Rio Incomati	25°01'01,40" S	32°44'56,39" L
Rio Sabié	25°08'09,01" S	32°07'59,16" L
Rio Umbeluzi	26°02'13,25" S	32°23'02,64" L

Após as coletas, os peixes foram pesados e medidos quanto ao comprimento total, comprimento padrão, largura do corpo e comprimento da cabeça com o auxílio de um ictiômetro. A seguir, contou-se o número de espinhos e raios das nadadeiras dorsal e anal.

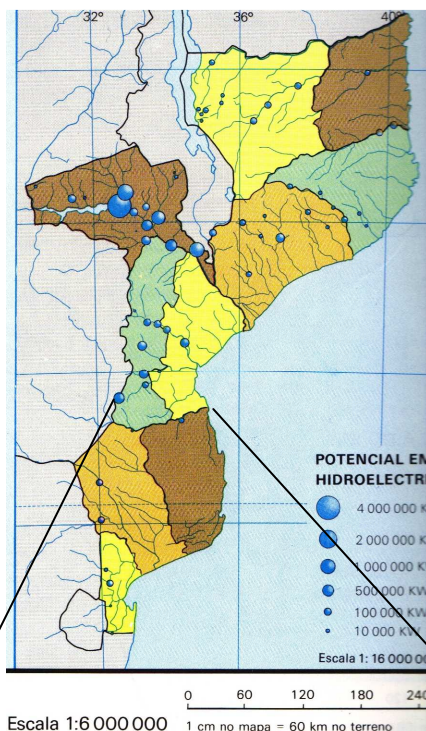
O material biológico para a extração do DNA foi composto de nadadeira caudal e de tecido da muscular de tilápias (*O. mossambicus*) com aproximadamente 1,5 cm<sup>2</sup>. As amostras foram conservadas em etanol a 95% e mantidas a uma temperatura de 4°C até a extração do DNA. Depois de retirado o tecido, as tilápias foram conservadas em freezer a -20°C.



Rio Sabié



Rio Umbeluzi



Rio Limpopo



Rio Incomati

Mapa hidrográfico de Moçambique. Fonte: Ministerio de Educação (1986)

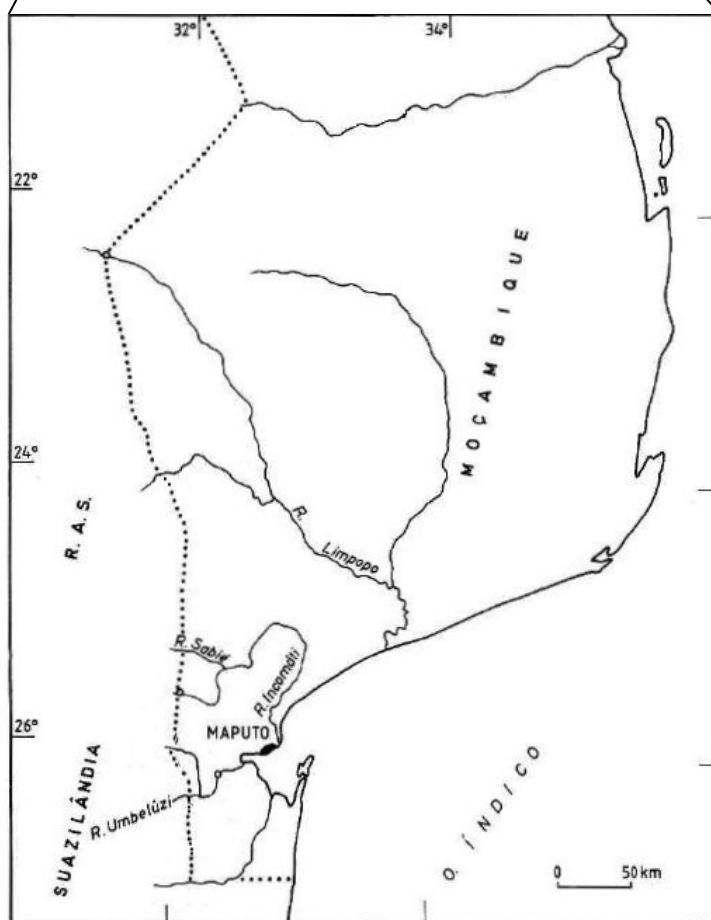


Figura 7: Mapa da região sul de Moçambique mostrando os locais de coleta Fonte: Moreira (1999)

### 3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi feita de acordo com o protocolo descrito por Taggart *et al.* (1992). Após a extração, fizeram-se as leituras das concentrações de cada amostra no espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%) para avaliar a integridade do DNA. Utilizou-se um marcador de peso molecular  $\lambda$ -HindIII (*Invitrogen*).

Uma vez que o DNA resultante da extração da nadadeira caudal mostrou-se muito degradado, fez-se uma segunda extração de DNA com um pedaço do tecido muscular, usando o mesmo protocolo acima.

Utilizou-se também um Kit de Extração de DNA Genômico (*GE Healthcare Life Science*) para obtenção de uma melhor qualidade na extração de DNA, já que as amostras não se encontravam em boas condições.

### 3.3 ESCOLHA DOS *LOCI*/MICROSSATÉLITES

A análise de marcadores microssatélites para a composição da estrutura genética de populações das tilápias baseou-se na utilização de sequências de microssatélites disponíveis no “GenBank”. A escolha dos *loci* para análise dependeu da localização do mesmo no mapa de ligação descrito por Lee & Kocher (1996). Os *loci* escolhidos não pertencem ao mesmo grupo de ligação.

Foram selecionados os seguintes *loci*: UNH104, UNH118, UNH123, UNH142, UNH203, UNH216, UNH222, UNH231, UNH129, UNH169 e UNH111 (LEE & KOCHER, 2005) (Tabela 2).

**Tabela 2:** *Loci* selecionados, número de acesso no GenBank e seus respectivos *primers*

<i>Loci</i>	Número de acesso do GenBank	<i>Primers</i> (5' – 3')
UNH104	G12257	A: GCA GTT ATT TGT GGT CAC TA B: GGT ATA TGT CTA ACT GAA ATC C
UNH118	G12271	A: CAG AAA GCC TGA TCT AAT ATT B: TTT CAG ATA CAT TTT ATA GAG GG
UNH123	G12276	A: CAT CAT CAC AGA CAG ATT AGA B: GAT TGA GAT TTC ATT CAA G
UNH142	G12294	A: CTT TAC GTT GAC GCA GT B: GTG ACA TGC AGC AGA TA
UNH203	G12354	A: CAC AAA GAT GTC TAA ACA TGT B: GAA TTT GAC AGT TTG TTG TTT AC
UNH216	G12367	A: GGG AAA CTA AAG CTG AAA TA B: TGC AAG GAA TAT CAG CA
UNH222	G12373	A: CTC TAG CAC ACG TGC AT B: TAA CAG GTG GGA ACT CA
UNH231	G123882	A: GCC TAT TAG TCA AAG CGT B: ATT TCT GCA AAA GTT TTC C
UNH129	G12282	A: AGA AGT CGT GCA TCT CTC B: TGT ACA TCA TCT GTG GG
UNH111	G12264	A: TGC TGT TCT TAT TTT CGC B: ATA AGA GTG TAT GCA TTA CTG G
UNH169	G12321	A: GCT CAT TCA TAT GTA AAG GA B: TAT TTT TTG GGA AGC TGA

### 3.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE)

Os *primers* microssatélites selecionados foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* representada pela “Prodinol”. Os *primers* foram diluídos em água deionizada (autoclavada) a uma concentração final de 10 µM.

Seis amostras do DNA de cada local amostrado foram usadas para fazer a padronização do protocolo de amplificação para cada *locus* microssatélite analisado. Realizaram-se vários testes de gradiente de concentração de MgCl<sub>2</sub> (entre 1,5 mM e 3,0 mM) e temperatura (entre 50°C e 60°C). Testaram -se também diferentes concentrações de DNA.

Alguns *loci* não mostraram resultados satisfatórios após a reação de amplificação (PCR). Assim dos 11 *loci* testados, selecionaram-se 5 para as análises posteriores.



Após a otimização das reações, foram realizadas as amplificações para a análise populacional. As reações de amplificação para os *loci* selecionados continham tampão de reação 10x (sem  $MgCl_2$ ), 2,5 mM de dNTPs, 10  $\mu$ M de cada *primer* (direto e reverso), 5U de Taq DNA Polimerase (*Fermentas*), aproximadamente 50 ng de DNA, 2,0 a 3,0 mM de  $MgCl_2$  e água deionizada suficiente para completar o volume final de 10 $\mu$ L.

As condições de amplificação estão descritas na Tabela 3. Devido à dificuldade obtida para a amplificação do *locus* UNH129, foi utilizada a técnica da “PCR *Touchdown*” (Tabela 4). Todas as amplificações foram realizadas nos termocicladores PTC-100 e PTC-200 (*MJ Research e Bio Rad*).

Para verificação da eficiência da PCR, submeteu-se o produto de amplificação à eletroforese em gel de agarose (1%). Os géis foram corados com brometo de etídeo, observados e fotografados sob luz ultravioleta com o fotodocumentador ImageQuant 300 (*GE Healthcare Life Sciences*).

Após confirmação da amplificação, os produtos de PCR foram analisados em géis de poliacrilamida a 7,5% (21 mL de  $H_2O$  MilliQ; 7,5 mL de poliacrilamida 30% [Acrilamida e Metilenobisacrilamida 29:1]; 1,5 mL de TBE 10 X, pH 8,3; 300  $\mu$ L de persulfato de amônio a 10% e 30  $\mu$ L de TEMED). O tamanho das bandas foi determinado com os marcadores 10 pb e 100 pb DNA *Ladder* (*Invitrogen*). Os géis foram corados com solução de nitrato de prata ( $AgNO_3$ ) (*Sigma*) a 1g/L e revelados com solução de hidróxido de sódio (NaOH).

Para a medição das bandas utilizou-se o *software* ImageQuant 300 (*GE Healthcare Life Sciences*).

**Tabela 3:** Condições de amplificação para os *loci* analisados

<b>Locí</b>	<b>Temperatura de anelamento</b>	<b>Concentração de MgCl<sub>2</sub></b>
UNH104	54°C	3,0 mM
UNH129	51°C	2,0 mM
UNH142	58°C	2,5 mM
UNH222	56° C	2,5 mM
UNH231	56° C	2,5 mM

**Tabela 4:** Condições de amplificação *touchdown* usada para o locus UNH129

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1- Desnaturação inicial	95°C	5 min
2- Desnaturação	95°C	45 s
3- Anelamento	63°C	45 s
4- Extensão	72°C	45 s
5- Repetir a etapa 2	-	1 vez
6- Desnaturação	95°C	45 s
7- Anelamento	61°C	45 s
8- Extensão	72°C	45 s
9- Repetir a etapa 6	-	1 vez
10- Desnaturação	95°C	45 s
11- Anelamento	59°C	45 s
12- Extensão	72°C	45 s
13- Repetir a etapa 10	-	1 vez
14- Desnaturação	95°C	45 s
15- Anelamento	57°C	45 s
16- Extensão	72°C	45 s
17- Repetir a etapa 14	-	1 vez
18- Desnaturação	95°C	45 s
19- Anelamento	51°C	45 s
20- Extensão	72°C	45 s
21- Repetir a etapa 18	-	25 Vezes
22- Extensão final	72°C	10 min

## 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 3.5.1 Variabilidade genética

A diversidade genética intrapopulacional foi caracterizada pelo número de alelos por *locus* ( $A$ ), riqueza alélica ( $Ar$ ), frequências alélicas, déficit de heterozigosidade intrapopulacional ( $F_{IS}$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ). Essas estimativas foram obtidas nos programas *Arlequin* v. 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2006), *Fstat* v.2.9.3.2 (GOUDET, 2002) e *Genepop* v. 1.2 (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

Assim, as estatísticas  $F$  podem ser obtidas a partir dos conceitos de heterozigosidade observada e esperada, onde:  $H_o$  é a heterozigosidade média observada dentro das populações;  $H_e$  é a heterozigosidade média esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações e  $H_T$  é a heterozigosidade média esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg para o conjunto das populações.

A diferenciação genotípica, que consiste na distribuição de genótipos nas populações, foi estimada pelo teste exato de Fisher por meio do *Genepop* v. 1.2 (RAYMOND & ROUSSET, 1995). Para esta análise, a hipótese nula testada leva em consideração que a distribuição genotípica é idêntica em toda a população.

Com base no teste de Kruskal-Wallis foi realizado a análise de variância com um critério de classificação (*one way* ANOVA) para verificar se existem diferenças significativas entre os valores obtidos nas análises ( $A$ ,  $Ar$ ,  $H_o$  e  $H_e$ ).

O programa *Bottleneck* v. 1.2.02 (CORNUET & LUIKART, 1996) foi utilizado para determinar se houve uma recente redução no tamanho efetivo da população. Esta ferramenta avalia cada população de acordo com as diferenças no excesso ou deficiência de heterozigosidade. Avalia também as diferenças no número de alelos em uma determinada população.

A heterozigosidade foi medida sob três modelos de mutação (I.A.M., T.P.M. e S.M.M. com 5.000 iterações). Para avaliar o nível de significância foi usado o teste de Wilcoxon de excesso ou deficiência de heterozigosidade. Este teste dispõe de alto poder estatístico e pode ser aplicado a alguns *loci* com baixo tamanho amostral.

### 3.5.2 Estrutura Genética

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi caracterizada pelas estatísticas  $F$  de Wright (1965), segundo a metodologia de NEI (1977). Esta estatística admite que todos os desvios de panmixia sejam exclusivamente devido aos efeitos da deriva genética e do sistema reprodutivo.

A estrutura genética das populações foi investigada pela Análise de Variância Molecular (AMOVA - *Analysis of Molecular Variance*) (EXCOFFIER *et al.*, 1992), que leva em consideração a variância das frequências gênicas entre as diferentes localidades amostradas (WRIGHT, 1978). Portanto, o  $F_{ST}$  corresponde ao grau de subdivisão genética intra-específica (EXCOFFIER *et al.*, 1992).

A Análise de Variância Molecular e as estimativas dos valores de  $\Phi_{ST}$  (WRIGHT, 1965), segundo a metodologia de NEI, (1977), baseados no número de diferentes alelos entre pares de populações (WEIR & COCKERHAM, 1984; MICHALAKIS & EXCOFFIER, 1996), foram calculados pelo programa *Arlequin v. 3.01* (EXCOFFIER *et al.*, 2006). Este mesmo programa foi utilizado para calcular uma estimativa análoga ao  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  (SLATKIN, 1995) e o número de migrantes ( $Nm$ ). Enquanto que os valores de  $F_{ST}$  derivam da variância das frequências alélicas, os valores de  $R_{ST}$  levam em consideração a variância do tamanho dos alelos (BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002).

O programa estatístico *Structure v.2.2* (PRITCHARD *et al.*, 2000) foi utilizado para verificar a estrutura populacional. Este implementa um método bayesiano de agrupamento para inferir a estrutura populacional usando somente os dados genotípicos das amostras. Um modelo com um número  $K$  de populações (onde o  $K$  pode ser desconhecido) é assumido e cada uma das populações é caracterizada por um conjunto de frequências alélicas de cada *locus*. Então, indivíduos da amostragem são designados probabilisticamente às populações ou, mutuamente, para duas ou mais populações se seus genótipos indicarem que eles estão misturados. Para a determinação do número de populações ( $K$ ) existentes utilizou-se o modelo de ancestralidade misturada (*admixture*), com os alelos correlacionados, que permite a resolução máxima na separação das populações com  $K$  variando de 2 a 8. Dez corridas independentes com 500.000 simulações em cadeias de Monte Carlo Markov e 100.000 gerações “burn in” foram usadas para cada valor de  $K$ .

Para verificar o grau de diferenciação da população e a relação entre as populações fez-se a Análise de Correspondência Fatorial (FCA) através do programa *Genetix v.4.05.2* (BELKHIR, 1999).

O dendrograma foi gerado baseado nos valores da distância de Nei (1972), os quais foram agrupados pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) implementado no programa TFPGA (*Tools for Population Genetic Analyses*) v. 1.3 (MILLER, 1997).

Para verificar a existência de associação entre a distancia genética e a distancia geográfica, foi realizado o teste de Mantel com base no programa *Genepop v. 1.2* (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISES MERÍSTICAS E MORFOMÉTRICAS

A análise merística das quatro populações em estudo mostrou que os indivíduos amostrados apresentaram em média 16 espinhos e 11 raios dorsais, 3 espinhos e 10 raios anais (Tabela 5)

**Tabela 5:** Valores médios das análises merísticas de exemplares de *O. mossambicus* coletados em diferentes rios de Moçambique

Medição	Rio Sabié		Rio Limpopo		Rio Incomati		Rio Umbeluzi	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Espinhos dorsais	16,02	0,42	16,14	0,49	15,92	0,53	16,00	0,40
Raios dorsais	11,02	0,47	10,68	0,55	11,00	0,70	10,32	0,79
Espinhos anais	2,90	0,46	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
Raios anais	10,22	0,54	10,08	0,66	10,12	0,59	9,78	0,58

n = 50; DP = desvio padrão

Em relação à morfometria, a população do rio Sabié foi a que apresentou maiores valores médios em todos os parâmetros analisados, enquanto que a população do rio Umbeluzi apresentou os menores valores (Tabela 6).

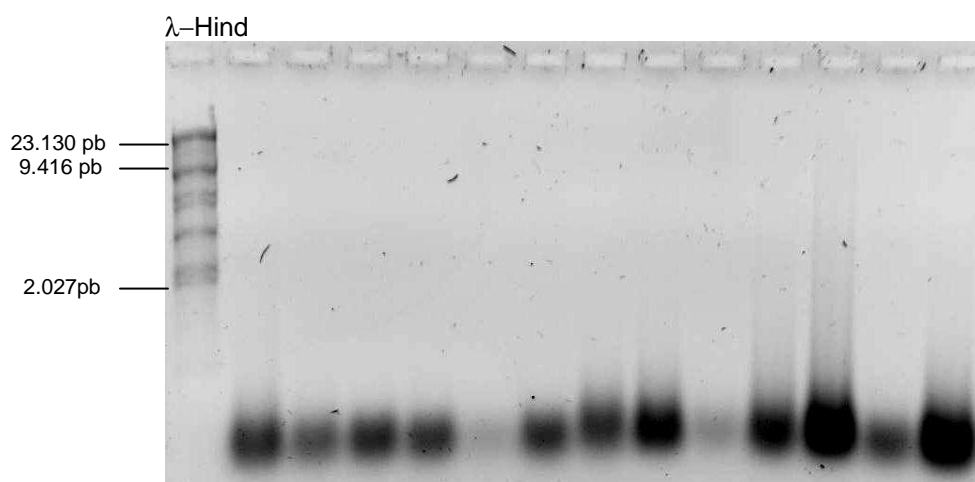
**Tabela 6:** Valores médios das análises morfométricas de exemplares de *O. mossambicus* coletados em diferentes rios de Moçambique

Morfometria	Rio Sabié		Rio Limpopo		Rio Incomati		Rio Umbeluzi	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP
Comprimento Total (cm)	35,66	5,44	23,93	3,45	23,27	2,55	19,03	1,15
Comprimento Padrão (cm)	30,51	4,73	20,47	2,64	19,65	2,35	15,81	0,81
Largura do Corpo (cm)	14,92	2,34	9,66	1,27	9,41	1,25	7,26	0,62
Comprimento da Cabeça (cm)	10,02	1,56	6,39	0,9	6,23	0,84	5,32	0,66
Peso Fresco (cm)	1,11	0,47	0,34	0,14	0,29	0,11	0,10	0,04

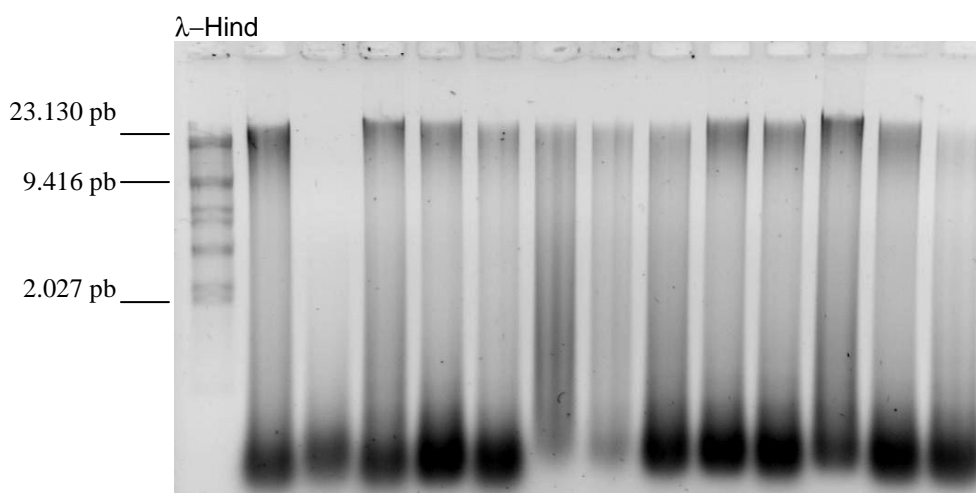
n = 50; DP = desvio padrão

## 4.2 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

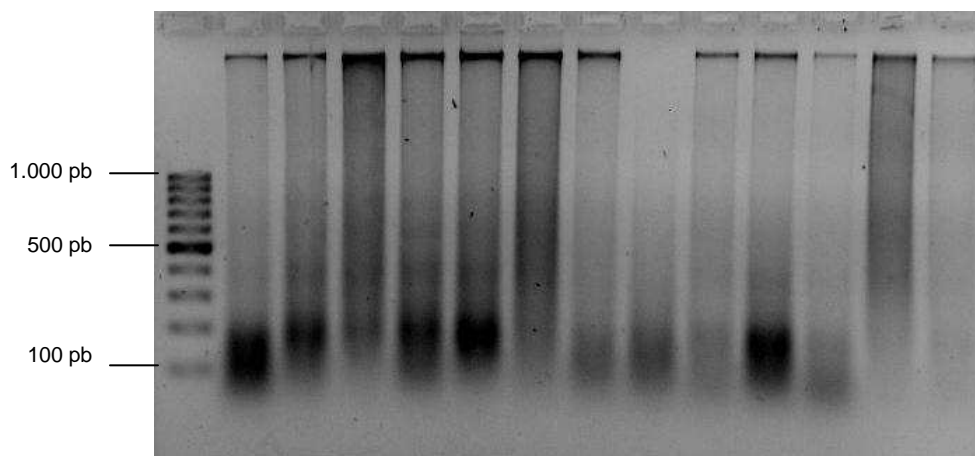
O DNA extraído a partir da nadadeira caudal apresentou-se muito degradado, como pode ser observado na Figura 8. Nota-se um arraste do DNA e a presença de uma maior concentração de fragmentos menores. Assim, optou-se pela extração de DNA do tecido muscular, cujo nível de degradação foi menor (Figura 9). A extração de DNA com kit comercial resultou em uma melhor qualidade do DNA (Figura 10).



**Figura 8:** Imagem da eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA genômico extraído da nadadeira caudal de *O. mossambicus* pelo método fenol:clorofórmio



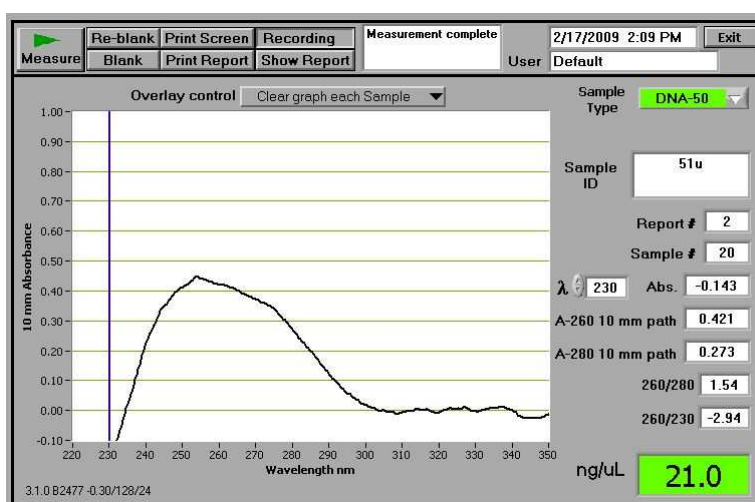
**Figura 9:** Imagem da eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA genômico extraído do tecido muscular de *O. mossambicus* pelo método fenol:clorofórmio



**Figura 10:** Imagem da eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA de *O. mossambicus* extraído com kit de extração genômico

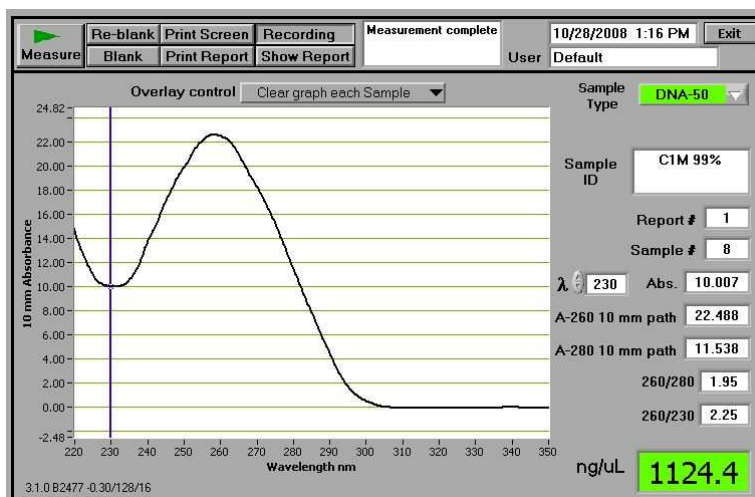
O DNA extraído pelo método fenol:clorofórmio apresentou altas concentrações, com variações de 27,7 a 1.944,9 ng/ $\mu$ L. Por outro lado, a extração feita com kit resultou em concentrações mais baixas de DNA, variando de 5,1 a 34,3 ng/ $\mu$ L. Em ambos os casos, o nível de pureza foi aceitável, representado pela razão entre os comprimentos de onda de 260/280, com valor próximo a 2,0. Este fato pode ser observado nas Figuras 11 e 12 que mostram a leitura da concentração do DNA numa amostra extraída com kit de extração genômico e outra com fenol: clorofórmio, respectivamente.

A grande dificuldade encontrada na extração do DNA foi o seu estado de conservação. O DNA das amostras de tilápias oriundas do rio Umbeluzi apresentou menor degradação que as demais amostras. O DNA de todas as amostras deste rio foi extraído usando kit de extração.



**Figura 11:** Gráfico com a leitura da concentração do DNA da amostra 51u, obtido a partir de kit de extração genômico





**Figura 12:** Gráfico com a leitura da concentração do DNA da amostra C1m, extraído pelo método fenol: clorofórmio

Antes de iniciar os testes para amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), foram selecionadas seis amostras pertencentes a cada um dos quatro pontos de coleta e fez-se uma diluição para 100 ng/μL, 80 ng/μL, 50 ng/μL, 25 ng/μL (para o DNA extraído pelo método fenol: clorofórmio) e 5 ng/μL (para o DNA extraído com kit de extração genômico).

### 4.3 TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DOS LOCI MICROSSATÉLITES

Dos 11 pares de *primers* selecionados, três não amplificaram os *loci* UNH118, UNH123 e UNH216, apesar de terem sido feitas várias modificações das condições de amplificação nomeadamente: quantidade e concentração dos reagentes, temperatura de anelamento e concentração do DNA. Já os *loci* UNH203, UNH169 e UNH111 apresentaram muitas bandas inespecíficas que dificultaram a identificação da banda de interesse. Deste modo, foram avaliados somente os *loci* UNH104, UNH129, UNH142, UNH222 e UNH231, conforme mostra a Tabela 7.

**Tabela 7:** Características dos *loci* analisados: *locus*, tamanho em pares de bases (pb), motivo, número de repetições, número de acesso ao GenBank, sequências *sense* e *antisense*

<b>Locus</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Motivo</b>	<b>Nº de repetições</b>	<b>Acesso/ GenBank</b>	<b>Sequências Sense/Antisense (5' - 3') dos primers</b>
UNH104	138pb	CA/TG	30	G12257	A: GCA GTT ATT TGT GGT CAC TA B: GGT ATA TGT CTA ACT GAA ATC
UNH129	193pb	CA/TG	52	G12282	A: AGA AGT CGT GCA TCT CTC B: TGT ACA TCA TCT GTG GG
UNH142	170pb	CA/TG	36	G12294	A: CTT TAC GTT GAC GCA GT B: GTG ACA TGC AGC AGA TA
UNH222	180pb	CA/TG	34	G12373	A:CTC TAG CAC ACG TGC AT B:TAA CAG GTG GGA ACT CA
UNH231	180pb	CA/TG	25	G123882	A:GCC TAT TAG TCA AAG CGT B:ATT TCT GCA AAA GTT TTC C

Para a amplificação dos *loci* UNH231 e UNH222 não foi preciso fazer muitas variações nos protocolos de amplificação, uma vez que grande parte das amostras amplificaram facilmente. O mesmo não aconteceu em relação aos demais. Assim, para os *loci* UNH104 e UNH142 foi necessário fazer diversas variações nas condições de amplificação. Já para o *locus* UNH129 só foi possível uma boa amplificação, utilizando à estratégia de PCR *touchdown*. Esta técnica baseia-se na diminuição da temperatura de anelamento à medida que se avança com os ciclos de amplificação. A Tabela 8 apresenta as condições de amplificação utilizadas para os diferentes *loci*.

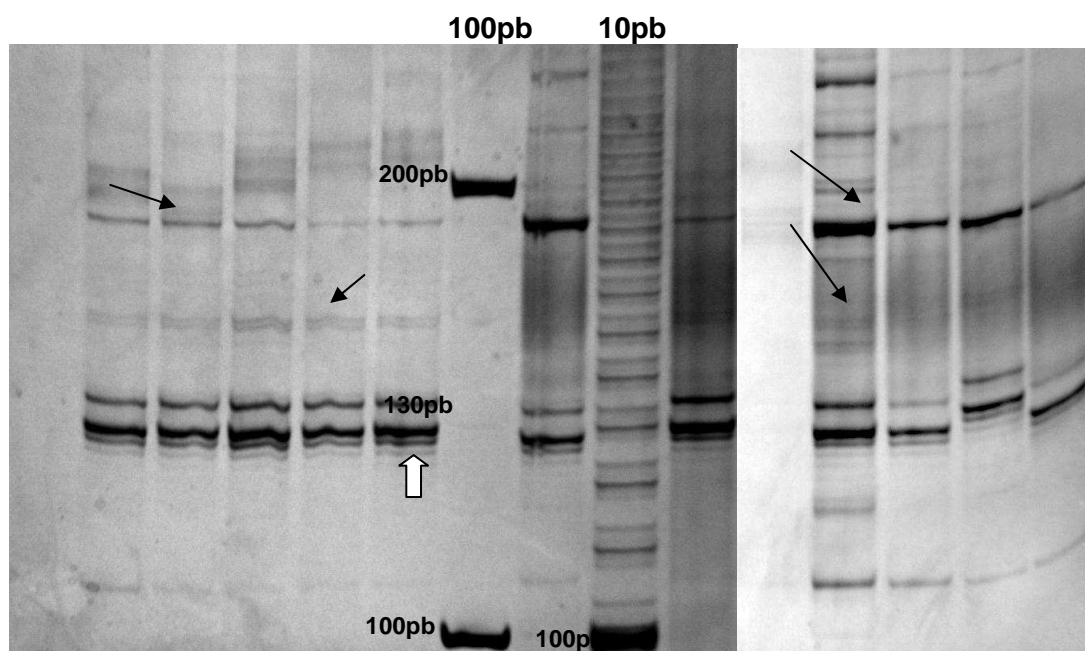
**Tabela 8:** Condições de amplificação para os *loci* microssatélites

<b>Locus</b>	<b>Temperatura de anelamento</b>	<b>Concentração de MgCl<sub>2</sub></b>
UNH104	54°C	3,0 mM
UNH129	51°C	2,0 mM
UNH142	58°C	2,5 mM
UNH222	56°C	2,5 mM
UNH231	56°C	2,5 mM

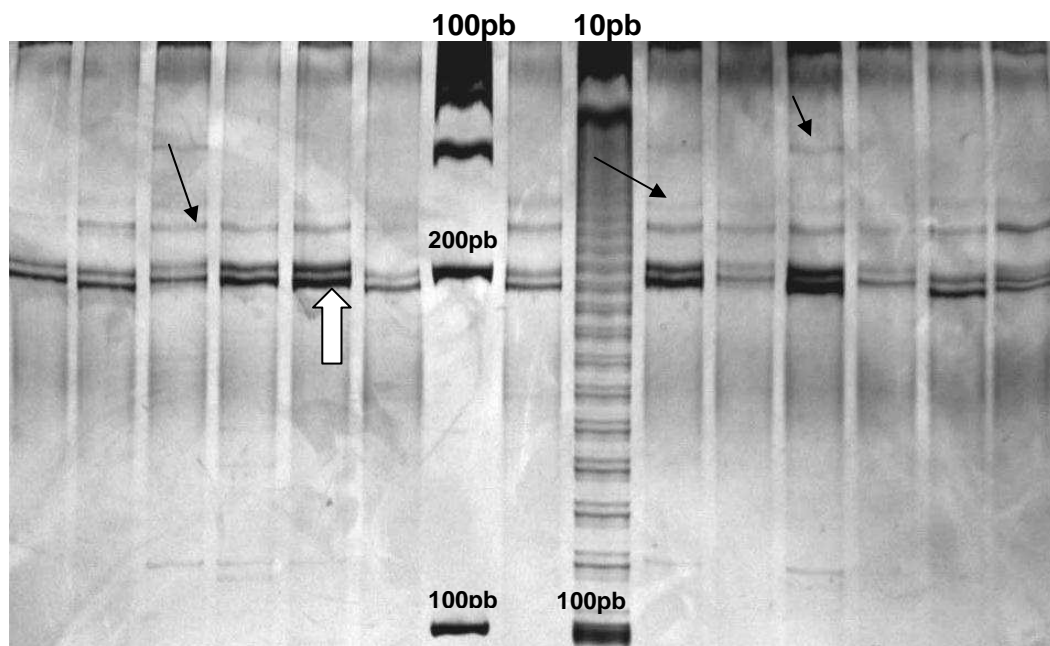
A eletroforese foi conduzida em gel de poliacrilamida na concentração de 9%, com corrente elétrica de 300 volts, 90 miliampères e 30 watts. O tempo de corrida foi de 3 horas e 15 minutos. Utilizaram-se os marcadores moleculares de 100 e 10pb

para dimensionar o tamanho das bandas. Em todos os casos em que as bandas se apresentavam duvidosas como, por exemplo, banda torta ou não muito nítida, fez-se um segundo gel para evitar erros de genotipagem.

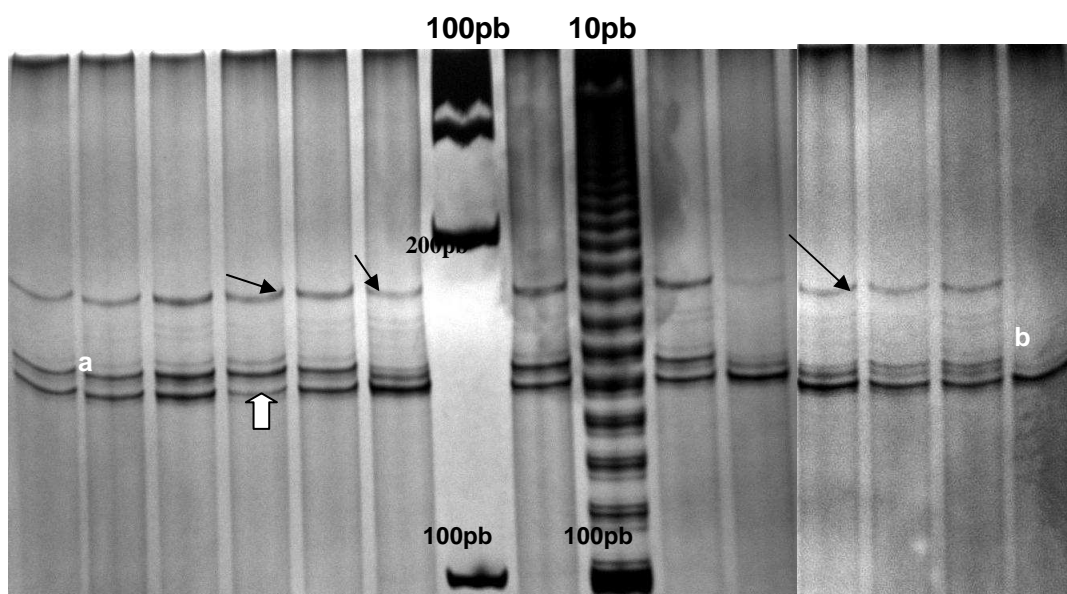
Os géis de poliacrilamida apresentados nas Figuras 13, 14, 15, 16 e 17 referem-se aos *loci* UNH104, UNH129, UNH142, UNH222 e UNH231, respectivamente. As setas pequenas indicadas no gel mostram algumas bandas inespecíficas (*stutters*) que não dificultaram a genotipagem dos *loci* microssatélites. As setas grandes indicam a banda de interesse. Na Figura 15, as letras a e b apontam para um indivíduo heterozigótico e um homozigótico, respectivamente.



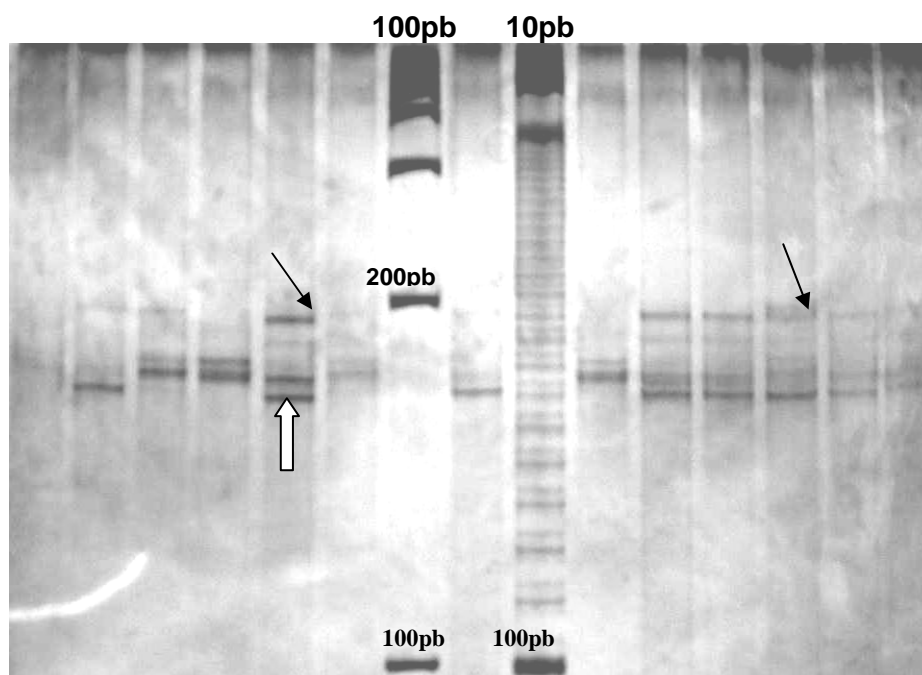
**Figura 13:** Gel de poliacrilamida do *locus* UNH104: as setas menores indicam bandas inespecíficas e as setas maiores, as bandas de interesse (de 130 a 135pb)



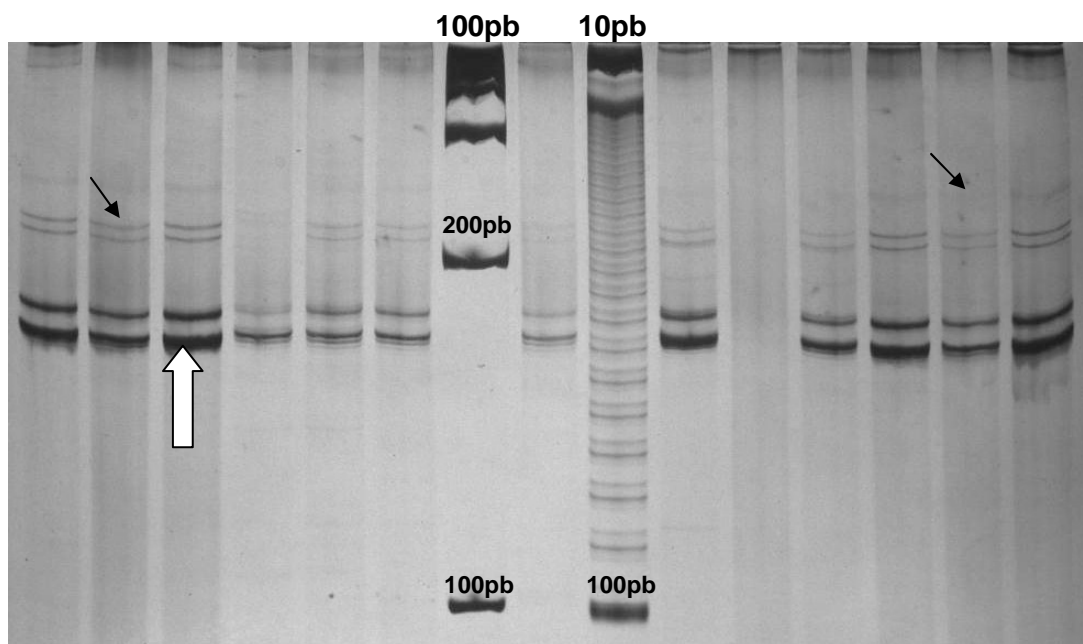
**Figura 14:** Gel de poliacrilamida do *locus* UNH129: as setas menores indicam bandas inespecíficas e as setas maiores, bandas de interesse (por volta de 200pb).



**Figura 15:** Gel de poliacrilamida do *locus* UNH142: as setas menores indicam bandas inespecíficas e as setas maiores, bandas de interesse (em torno de 140pb); a – indivíduo heterozigoto; b – indivíduo homozigoto



**Figura 16:** Gel de poliacrilamida do *locus* UNH222: as setas menores indicam bandas inespecíficas e as setas maiores, bandas de interesse (em torno de 160 pb)



**Figura 17:** Gel de poliacrilamida do *locus* UNH 231: as setas menores indicam bandas inespecíficas e as setas maiores, bandas de interesse (em torno de 160 pb)

## 4.4 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POPULACIONAL

### 4.4.1 Análise Intrapopulacional

#### 4.4.1.1 Alelos encontrados em cada locus microssatélite

Os *loci* microssatélites analisados foram polimórficos. Das 200 amostras genotipadas, foram encontrados de 55 a 70 alelos. As Tabelas 9, 10, 11, 12 e 13 mostram o número de alelos para cada *locus*, com seus respectivos tamanhos e número de repetições. O *locus* UNH104 apresentou 16 alelos com tamanho entre 118 e 150pb e número de repetições de 20 a 36. Para o *locus* UNH129 foram encontrados 15 alelos de 181 a 209 pb com 46 a 60 repetições. O *locus* UNH142 apresentou um total de 9 alelos, cujo tamanho variou de 138 a 154 pb e unidades de repetição de 20 a 28. Para o *locus* UNH222 foram genotipados 18 alelos que variaram de 148 a 186 pb e, em termos de unidades de repetição, de 18 a 34. No *locus* UNH231 foram encontrados 17 alelos, com tamanho entre 146 e 190 pb.

Observa-se que o *locus* UNH142 foi o que apresentou menor número de alelos (9), enquanto que o *locus* UNH222 o maior número de alelos (18).

**Tabela 9:** Alelos encontrados no *locus* UNH104, com seus respectivos tamanhos (pb) e unidades de repetição

Alelos	Tamanho (pb)	Número de repetições
1	118	(CA/GT) <sub>20</sub>
2	120	(CA/GT) <sub>21</sub>
3	122	(CA/GT) <sub>22</sub>
4	124	(CA/GT) <sub>23</sub>
5	126	(CA/GT) <sub>24</sub>
6	128	(CA/GT) <sub>25</sub>
7	130	(CA/GT) <sub>26</sub>
8	132	(CA/GT) <sub>27</sub>
9	134	(CA/GT) <sub>28</sub>
10	136	(CA/GT) <sub>29</sub>
11	138	(CA/GT) <sub>30</sub>
12	140	(CA/GT) <sub>31</sub>
13	142	(CA/GT) <sub>32</sub>
14	144	(CA/GT) <sub>33</sub>
15	146	(CA/GT) <sub>34</sub>
16	150	(CA/GT) <sub>36</sub>

**Tabela 10:** Alelos encontrados no *locus* UNH129, com seus respectivos tamanhos (pb) e unidades de repetição

<b>Alelos</b>	<b>Tamanho em pb</b>	<b>Número de repetições</b>
1	181	(CA/TG) <sub>46</sub>
2	183	(CA/TG) <sub>47</sub>
3	185	(CA/TG) <sub>48</sub>
4	187	(CA/TG) <sub>49</sub>
5	189	(CA/TG) <sub>50</sub>
6	191	(CA/TG) <sub>51</sub>
7	193	(CA/TG) <sub>52</sub>
8	195	(CA/TG) <sub>53</sub>
9	197	(CA/TG) <sub>54</sub>
10	199	(CA/TG) <sub>55</sub>
11	201	(CA/TG) <sub>56</sub>
12	203	(CA/TG) <sub>57</sub>
13	205	(CA/TG) <sub>58</sub>
14	207	(CA/TG) <sub>59</sub>
15	209	(CA/TG) <sub>60</sub>

**Tabela 11:** Alelos encontrados no *locus* UNH142, com seus respectivos tamanhos (pb) e unidades de repetição

<b>Alelo</b>	<b>Tamanho em pb</b>	<b>Número de repetições</b>
1	138	(CA/TG) <sub>20</sub>
2	140	(CA/TG) <sub>21</sub>
3	142	(CA/TG) <sub>22</sub>
4	144	(CA/TG) <sub>23</sub>
5	146	(CA/TG) <sub>24</sub>
6	148	(CA/TG) <sub>25</sub>
7	150	(CA/TG) <sub>26</sub>
8	152	(CA/TG) <sub>27</sub>
9	154	(CA/TG) <sub>28</sub>

**Tabela 12:** Alelos encontrados no *locus* UNH222, com seus respectivos tamanhos (pb) e unidades de repetição

<b>Alelo</b>	<b>Tamanho em pb</b>	<b>Número de repetições</b>
1	148	(CA/TG) <sub>18</sub>
2	150	(CA/TG) <sub>19</sub>
3	152	(CA/TG) <sub>20</sub>
4	154	(CA/TG) <sub>21</sub>
5	156	(CA/TG) <sub>22</sub>
6	158	(CA/TG) <sub>23</sub>
7	160	(CA/TG) <sub>24</sub>
8	162	(CA/TG) <sub>25</sub>
9	164	(CA/TG) <sub>26</sub>
10	166	(CA/TG) <sub>27</sub>
11	168	(CA/TG) <sub>28</sub>
12	170	(CA/TG) <sub>29</sub>
13	172	(CA/TG) <sub>30</sub>
14	174	(CA/TG) <sub>31</sub>
15	176	(CA/TG) <sub>32</sub>
16	178	(CA/TG) <sub>33</sub>
17	180	(CA/TG) <sub>34</sub>
18	186	(CA/TG) <sub>37</sub>

**Tabela 13:** Alelos encontrados no *locus* UNH231, com seus respectivos tamanhos (pb) e unidades de repetição

<b>Alelo</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Número de repetições</b>
1	146	(CA/GT) <sub>8</sub>
2	150	(CA/GT) <sub>10</sub>
3	152	(CA/GT) <sub>11</sub>
4	154	(CA/GT) <sub>12</sub>
5	156	(CA/GT) <sub>13</sub>
6	158	(CA/GT) <sub>14</sub>
7	160	(CA/GT) <sub>15</sub>
8	162	(CA/GT) <sub>16</sub>
9	164	(CA/GT) <sub>17</sub>
10	166	(CA/GT) <sub>18</sub>
11	168	(CA/GT) <sub>19</sub>
12	170	(CA/GT) <sub>20</sub>
13	172	(CA/GT) <sub>21</sub>
14	174	(CA/GT) <sub>22</sub>
15	176	(CA/GT) <sub>23</sub>
16	178	(CA/GT) <sub>24</sub>
17	190	(CA/GT) <sub>30</sub>



#### 4.4.1.2 DIVERSIDADE ALÉLICA E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Dos 4 rios amostrados, o rio Sabié foi o que apresentou maior número de alelos ( $A$ ) para os 5 *loci* analisados, com um total de 61 alelos. O menor número de alelos foi encontrado nas populações dos rios Limpopo e Incomati, ambos apresentaram 55 alelos (Tabela 14).

A riqueza alélica ( $Ar$ ) variou de 8,937 (*locus* UNH104) a 15,751 (*locus* UNH222), ambos na população do rio Sabié.

A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,940 a 1,000. A heterozigosidade esperada variou de 0,839 (*locus* UNH104) a 0,911 (*locus* UNH222) na população do rio Sabié.

De um modo geral, a população do rio Sabié foi a que apresentou maior variação nos parâmetros analisados. Esta população apresentou a maior diversidade alélica, cuja média do número de alelos foi 12,2. As populações que apresentaram menor diversidade alélica foram as do rio Umbeluzi e do rio Limpopo, ambas com valores de 11,0.

O teste exato de Guo e Tompson e da cadeia de Markov, usada para determinar o coeficiente de endogamia ( $Fis$ ), apresentaram valores negativos. Este resultado é um indicativo de excesso de heterozigotos, isto é, as populações em estudo apresentaram baixo grau de endogamia. O maior valor (-0,032) foi encontrado na população do rio Sabié no *locus* UNH222 e o menor (-0,198) na população do rio Incomati no *locus* UNH104.

Todas as populações apresentaram um desvio significativo quanto às proporções esperadas para o modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este fato está relacionado ao excesso de heterozigotos observados.

Os resultados de todos os parâmetros analisados ( $A$ ,  $Ar$ ,  $H_o$  e  $H_e$ ) foram comparados nos quatro grupos amostrados pelo teste *one way* ANOVA. Verificou-se que não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) (Tabela 15). Um teste não paramétrico (teste de Kruskal-Wallis) foi realizado para a heterozigosidade observada, uma vez que esta não apresentou uma distribuição normal. Neste teste o resultado não se apresentou significativo.

**Tabela 14:** Resumo dos dados estatísticos encontrados no cálculo da diversidade genética em 5 loci microssatélites de amostras de *O. mossambicus* oriundas de 4 rios: número de alelos (A); riqueza alélica ( $A_r$ ); heterozigosidade observada ( $H_o$ ); heterozigosidade esperada ( $H_e$ ); equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P_{HW}$ ); coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ).

Local	Locus	A	$A_r$	$H_o$	$H_e$	$P_{HW}$	$F_{IS}$
Rio Sabié	UNH104	9	8,937	0,980	0,839	0,0000	-0,169
	UNH129	12	11,877	0,980	0,889	0,0010	-0,104
	UNH142	11	10,820	1,000	0,844	0,0037	-0,188
	UNH222	16	15,751	0,940	0,911	0,0000	-0,032
	UNH231	13	12,817	0,960	0,880	0,0000	-0,092
	<b>Média</b>	<b>12,2</b>	<b>12,040</b>	<b>0,972</b>	<b>0,872</b>	<b>0,0009</b>	<b>-0,117</b>
	<b>DP</b>	<b>2,6</b>	<b>2,525</b>	<b>0,023</b>	<b>0,030</b>	<b>0,0010</b>	<b>0,063</b>
Rio Limpopo	UNH104	12	11,817	0,960	0,869	0,0000	-0,106
	UNH129	11	10,940	0,980	0,892	0,0000	-0,102
	UNH142	10	9,937	0,940	0,860	0,0003	-0,094
	UNH222	12	11,934	0,960	0,892	0,0062	-0,078
	UNH231	10	9,997	0,940	0,885	0,0003	-0,062
	<b>Media</b>	<b>11,0</b>	<b>10,925</b>	<b>0,956</b>	<b>0,879</b>	<b>0,0010</b>	<b>-0,083</b>
	<b>DP</b>	<b>1,0</b>	<b>0,955</b>	<b>0,016</b>	<b>0,014</b>	<b>0,0020</b>	<b>0,018</b>
Rio Incomati	UNH104	10	10,000	0,979	0,819	0,0000	-0,198
	UNH129	13	13,000	1,000	0,897	0,0035	-0,118
	UNH142	10	9,996	0,959	0,846	0,0000	-0,135
	UNH222	14	13,916	0,959	0,889	0,0000	-0,079
	UNH231	13	12,917	1,000	0,893	0,0000	-0,121
	<b>Media</b>	<b>12,0</b>	<b>11,966</b>	<b>0,979</b>	<b>0,868</b>	<b>0,0006</b>	<b>-0,130</b>
	<b>DP</b>	<b>1,9</b>	<b>1,839</b>	<b>0,020</b>	<b>0,035</b>	<b>0,0015</b>	<b>0,043</b>
Rio Umbeluzi	UNH104	9	8,959	0,959	0,851	0,0000	-0,128
	UNH129	12	11,937	1,000	0,894	0,0000	-0,121
	UNH142	10	9,880	0,960	0,874	0,0000	-0,103
	UNH222	13	12,937	1,000	0,899	0,0002	-0,043
	UNH231	11	10,917	1,000	0,883	0,0002	<b>-0,175</b>
	<b>Media</b>	<b>11,0</b>	<b>10,926</b>	<b>0,984</b>	<b>0,880</b>	<b>0,0001</b>	<b>-0,114</b>
	<b>DP</b>	<b>1,6</b>	<b>1,583</b>	<b>0,022</b>	<b>0,019</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,048</b>

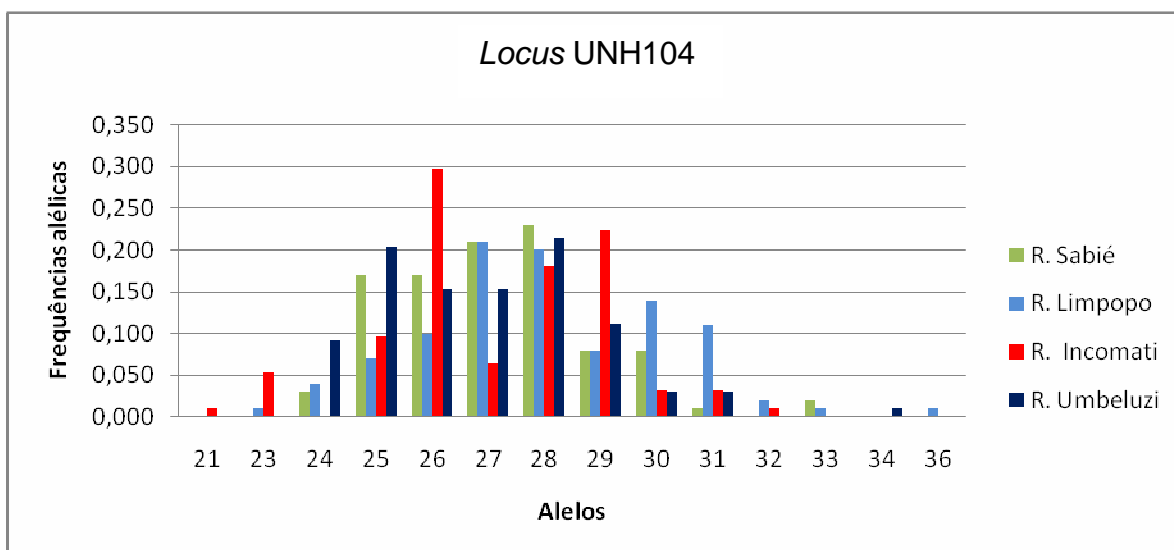
**Tabela 15:** Resultados do teste *one-way* ANOVA

Parâmetro	Valor de P	Significância
$A$	0,625	n.s.
$A_r$	0,631	n.s.
$H_o$	0,359	n.s.
$H_e$	0,876	n.s.

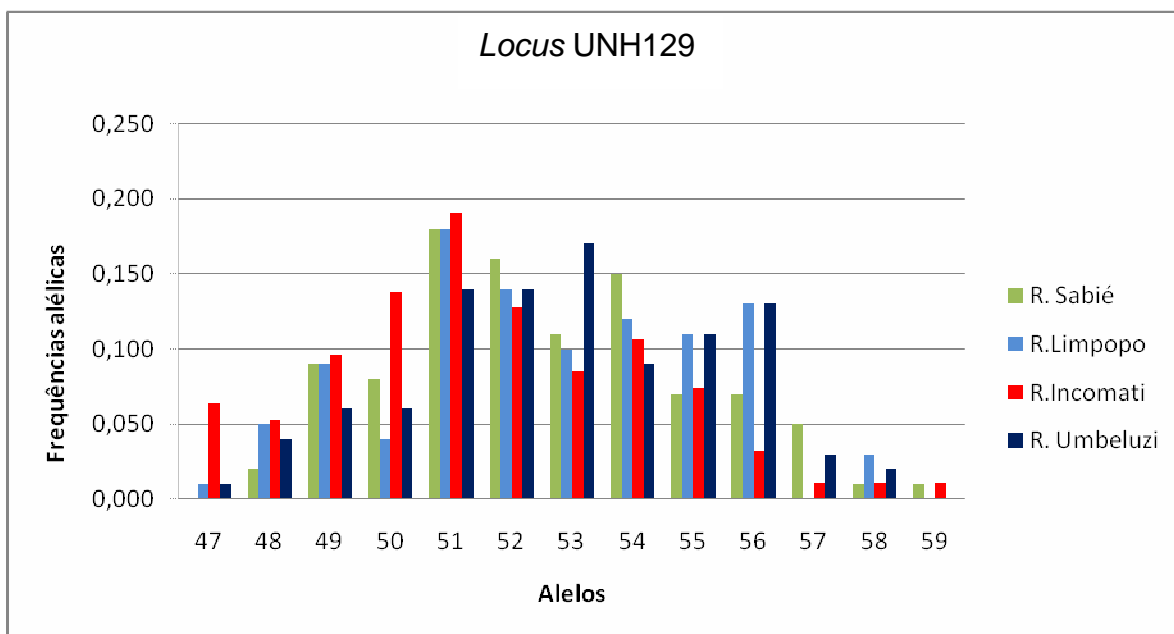
$p < 0,05$ ; n.s. = não significativo

#### 4.4.1.3 Frequências alélicas

As frequências alélicas variaram entre as populações amostradas conforme mostram as Figuras 18, 19, 20, 21 e 22. Alguns *loci* apresentaram alelos exclusivos, como é o caso dos *loci* UNH104 e UNH231. Os alelos 21, 34 e 36 do *locus* UNH104 são exclusivos para as populações dos rios Incomati, Umbeluzi e Limpopo, respectivamente. As frequências alélicas variaram de 0,010 a 0,298. A maior frequência encontrada foi a do alelo 26, na população do rio Incomati.

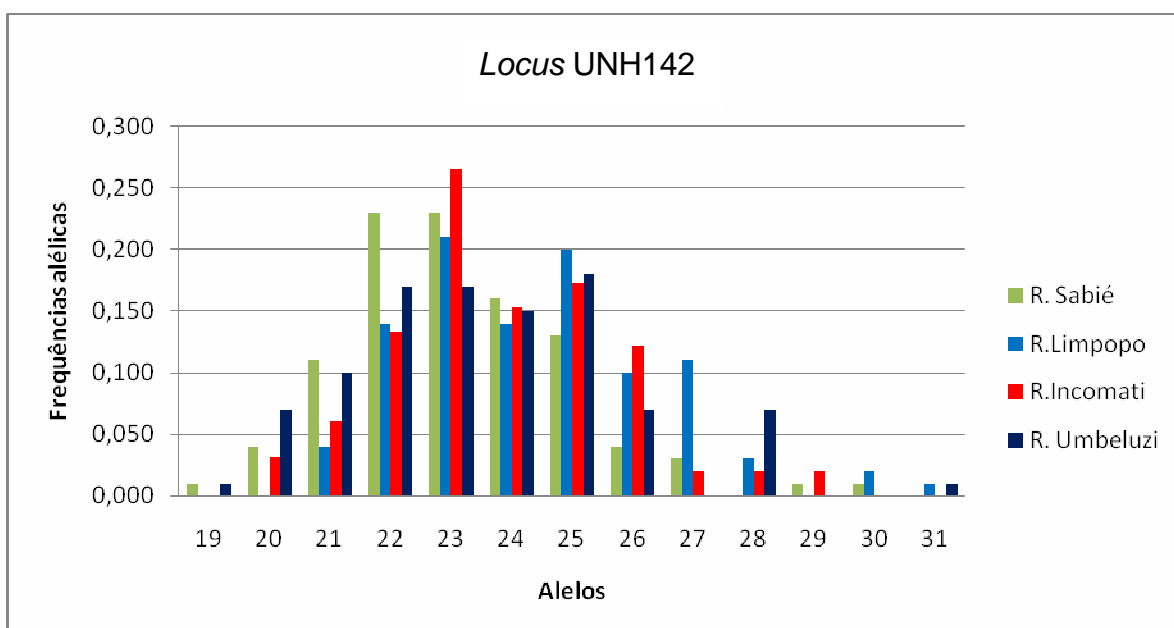
**Figura 18:** Frequências alélicas encontradas no *locus* UNH104

O *locus* UNH129 apresentou frequências que variaram de 0,010 a 0,191 (Figura 19). O alelo 51 foi o que se mostrou mais frequente na população do rio Incomati. Não se verificaram alelos exclusivos neste *locus*. Os alelos 47, 57 e 59 não se fizeram presentes nas populações dos rios Sabié, Limpopo e Umbeluzi.



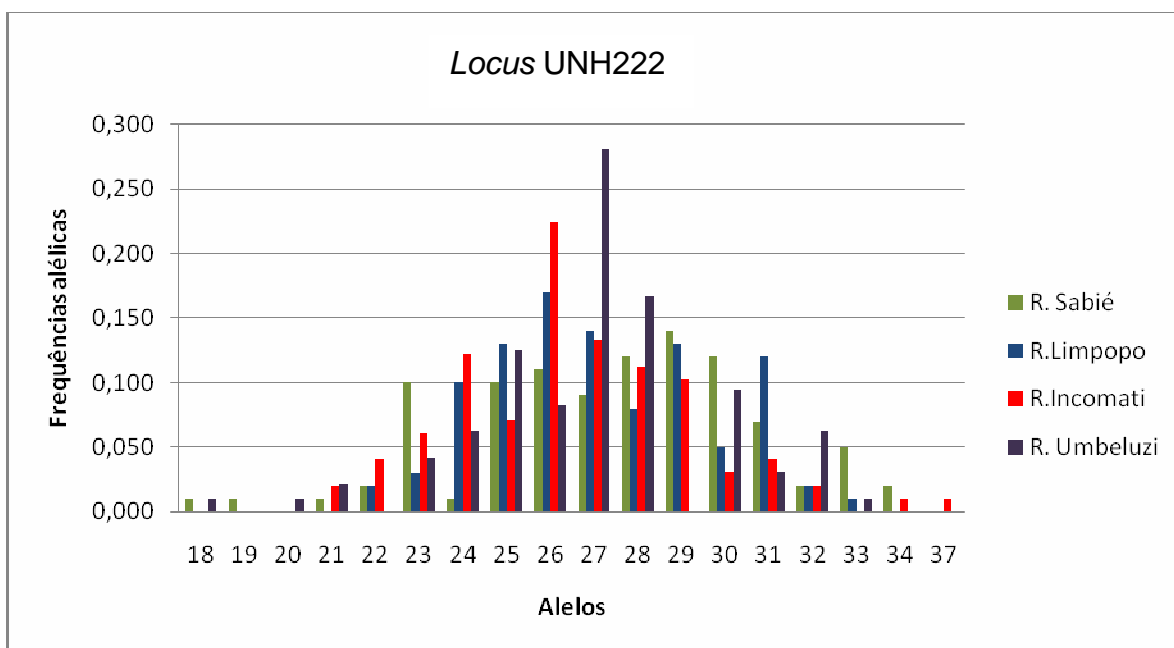
**Figura 19:** Frequências alélicas encontradas no *locus* UNH129.

O *locus* UNH142 não apresentou alelos exclusivos e o alelo 23 foi o mais frequente na população do rio Incomati. Neste *locus*, as frequências variaram entre 0,010 a 0,265. Alguns alelos não estiveram presentes nas populações amostradas, são eles: 28 e 31 na população do rio Sabié, 20 e 29 do rio Limpopo, 30 e 31 do rio Incomati e 20 e 31 do rio Umbeluzi (Figura 20).



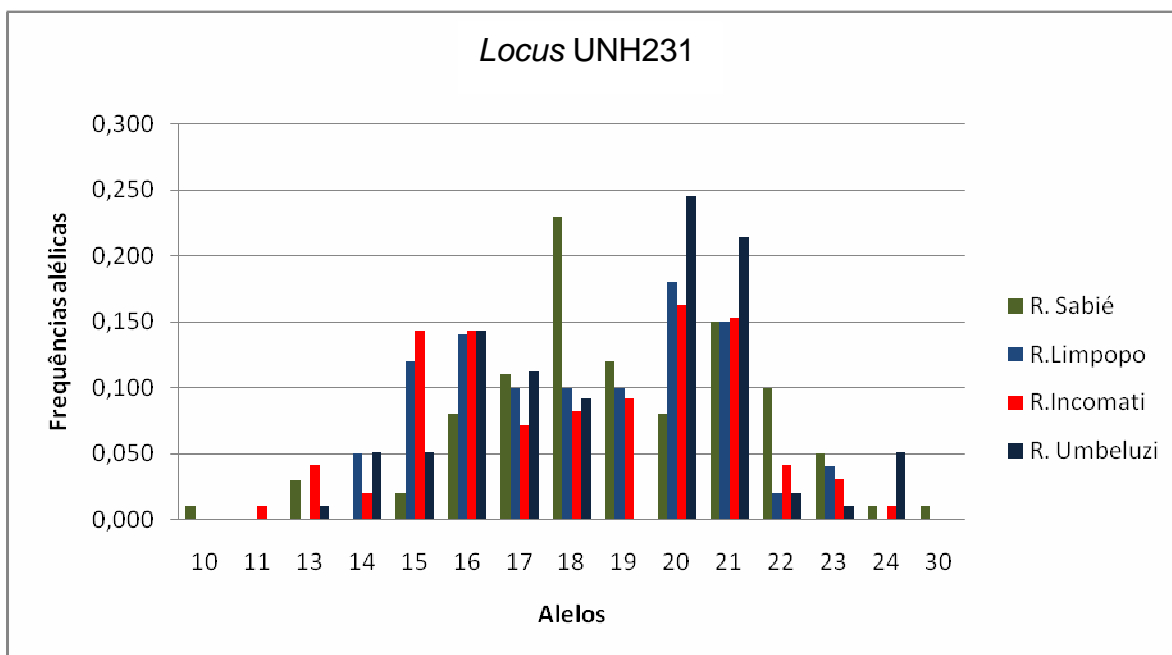
**Figura 20:** Frequências alélicas encontradas no *locus* UNH142

As frequências alélicas do *locus* UNH222 estão representadas na Figura 21. A população do rio Umbeluzi apresentou maior frequência do alelo 27. Neste *locus*, as frequências alélicas tiveram sua variação entre 0,010 e 0,281. Os alelos 19, 20 e 37 foram exclusivos para as populações dos rios Sabié, Umbeluzi e Incomati, respectivamente.



**Figura 21:** Frequências alélicas encontradas no *locus* UNH222

A frequência de alelos encontrada no *locus* UNH231 variou de 0,010 a 0,245 (Figura 22). O alelo 20 apresentou maior frequência na população do rio Umbeluzi. O alelo 10 mostrou-se exclusivo para a população do rio Sabié. A população do rio Incomati apresentou exclusividade dos alelos 11 e 30.



**Figura 22:** Frequências alélicas encontradas no *locus* UNH231

#### 4.4.1.4 Efeito gargalo

Fez-se uma análise para avaliar o efeito gargalo nas populações, com base no programa *Bottleneck*. Os valores obtidos indicam a ocorrência de uma redução populacional recente na população do rio Limpopo. Este resultado foi obtido a partir da análise de três modelos evolutivos de microssatélites I.A.M. (modelo de alelos infinitos), T.P.M. (modelo bifásico) e S.M.M. (modelo de mutação passo a passo), determinados através do teste de Wilcoxon. Os valores de probabilidade obtidos foram: 0,01563 para o modelo I.A.M.; 0,01563 para o modelo T.P.M.; e, 0,03125 para o modelo S.M.M. Estes valores foram significativos ( $p < 0,05$ ) para o excesso de heterozigosidade.

Observaram-se também valores significativos nas populações do rio Incomati, Sabié e Umbeluzi nos modelos mutacionais I.A.M. e T.P.M., porém para o modelo mutacional S.M.M. os valores não foram significativos. Deste modo, não se pode afirmar que estas populações tenham passado por um efeito gargalo recente, apesar de elas terem demonstrado um excesso de heterozigosidade. Todas as estimativas foram obtidas com base em 5.000 replicações (Tabela 16).

**Tabela 16:** Resumo dos valores obtidos no teste de Wilcoxon usando três modelos evolutivos de microssatélites (I.A.M., T.P.M. e S.M.M.) nas populações dos rios Sabié, Limpopo, Incomati e Umbeluzi

População	Modelo I.A.M.	Modelo T.P.M.	Modelo S.M.M.
Rio Sabié	0,01563 <sup>(S)</sup>	0,01563 <sup>(S)</sup>	0,40625 <sup>(NS)</sup>
Rio Limpopo	0,01563 <sup>(S)</sup>	0,01563 <sup>(S)</sup>	0,03125 <sup>(S)</sup>
Rio Incomati	0,01563 <sup>(S)</sup>	0,01563 <sup>(S)</sup>	0,50000 <sup>(NS)</sup>
Rio Umbeluzi	0,01563 <sup>(S)</sup>	0,01563 <sup>(S)</sup>	0,40625 <sup>(NS)</sup>

Baseado em 5.000 replicações;  $p < 0,05$ ; (S) = valor significativo; (NS) = valor não significativo

## 4.4.2 Análise Interpopulacional

### 4.4.2.1 Diferenciação genética

Os valores de diversidade genética foram obtidos pelo índice  $R_{ST}$  nas análises par a par entre as populações (Tabela 17). Os valores do índice  $R_{ST}$  foram significativos ( $p < 0,05$ ) entre todas as populações. A maior diferenciação genética ocorreu entre as populações do rio Sabié e do rio Incomati com  $R_{ST}$  de 0,04259 e a menor diferenciação entre os rios Limpopo e Umbeluzi com  $R_{ST}$  de 0,01862.

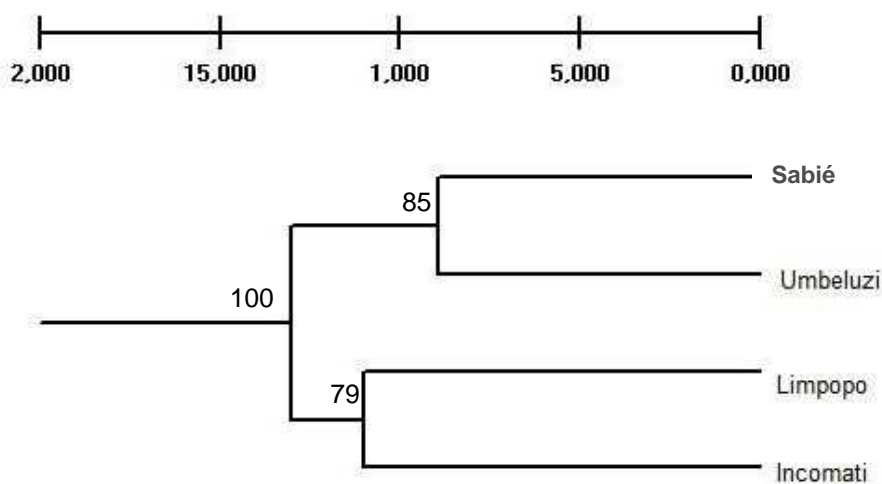
A baixa estruturação que se verifica nas populações pode estar relacionada aos elevados valores de número de migrantes ( $Nm$ ). As comparações dos valores obtidos entre os pares populacionais mostram que as populações dos rios Limpopo e Umbeluzi apresentaram maior valor do número de migrantes (171,73652) e as populações dos rios Incomati e Sabié um menor valor (36,93118).

**Tabela 17:** Diferenciação genética utilizando os índices  $R_{ST}$  (diagonal superior) e número de migrantes ( $Nm$ ) (diagonal inferior) de populações de *O. mossambicus* para todos os loci estudados.

	Rio Sabié	Rio Limpopo	Rio Incomati	Rio Umbeluzi
Rio Sabié	-	0,03942**	0,04259**	0,02203**
Rio Limpopo	64,24995	-	0,03466**	0,01862**
Rio Incomati	36,93118	63,83213	-	0,03828**
Rio Umbeluzi	85,30211	171,73652	53,66191	-

Baseado em 1.000 permutações. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$

Com base nos resultados do cálculo da distância de Nei (1978) pelo programa TFPGA (“*Tools for Population Genetic Analyses*”) versão 1.3 (MILLER, 1997), desenhou-se um dendograma do tipo UPGMA (“*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”) para as quatro populações de *O. mossambicus* (Figura 23). Este dendograma agrupou as populações da seguinte forma: o primeiro agrupamento é composto pelas populações dos rios Sabié e Umbeluzi e o segundo, pelas populações dos rios Limpopo e Incomati.



**Figura 23:** Dendograma obtido a partir do método UPGMA, baseado nos valores de distância genética de Nei (1978) encontrados para as populações de *O. mossambicus* dos rios Sabié (Corrumane), Limpopo, Umbeluzi e Incomati

O teste de Mantel mostrou uma correlação não significativa ( $p = 0,386$ ) entre a distância geográfica e a distância genética.

#### 4.4.2.2 AMOVA (Análise de Variância Molecular)

Os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA - *Analysis of Molecular Variance*) a partir dos índices  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  estão descritos nas Tabelas 18 e 19. Para esta análise foram considerados quatro níveis de hierarquização:

1° - as populações dos rios Sabié e Umbeluzi estão agrupadas e as restantes separadas;

2° - separa as populações em dois grupos: grupo I = populações dos rios Sabié e Umbeluzi; grupo II = populações dos rios Limpopo e Incomati;



3° - as populações dos rios Incomati e Limpopo estão agrupadas e as demais separadas;

4° - as populações dos rios Sabié e Incomati estão agrupadas e as dos demais rios separadas.

**Tabela 18:** Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o  $\Phi_{ST}$  e considerando quatro diferentes agrupamentos das populações de *O. mossambicus*

N.G.	Comp. Grupo	Causas da variação	G. L.	S.Q.	% V.
3	R.S. e R.U.	Entre os grupos	2	8,080	0,230
		Entre populações dentro dos grupos	1	3,420	0,580
		Dentro das populações	394	848,640	99,180
$\Phi_{ST}=0,00817$					
2	R.S. e R. U./ R.L. e R.I.	Entre os grupos	1	4,260	0,150
		Entre populações dentro dos grupos	2	7,240	0,680
		Dentro das populações	394	848,640	99,170
$\Phi_{ST}=0,00827$					
3	R.I. e R.L.	Entre os grupos	2	7,680	0,000
		Entre populações dentro dos grupos	1	3,820	0,780
		Dentro das populações	394	848,640	99,220
$\Phi_{ST}=0,00778$					
3	R.S. e R.I.	Entre os grupos	2	6,485	0,660
		Entre populações dentro dos grupos	1	5,015	1,330
		Dentro das populações	394	848,640	99,330
$\Phi_{ST}=0,00669$					

Baseado em 1.023 permutações;  $p < 0,05$ ; G.L.= Graus de Liberdade; S.Q.= Soma dos Quadrados; %V= Percentagem da Variância; R.S.= rio Sabié; R.U.= rio Umbeluzi; R.I.= rio Incomati; R.L.= rio Limpopo

**Tabela 19:** Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o  $R_{ST}$  e considerando quatro diferentes agrupamentos das populações de *O. mossambicus*

N.G.	Comp. Grupo	Causas da variação	G. L.	S.Q.	% V.
3	R.S. e R.U.	Entre os grupos	2	1141,10	1,260
		Entre populações dentro dos grupos	1	384,04	2,220
		Dentro das populações	394	45898,09	96,520
$R_{ST}=0,03475^*$					
2	R.S. e R.U./	Entre os grupos	1	617,92	0,680
	R.L. e R.I.	Entre populações dentro dos grupos	2	907,23	2,810
		Dentro das populações	394	45898,09	96,554
$R_{ST}=0,03491$					
3	R.I. e R.L.	Entre os grupos	2	1001,96	0,170
		Entre populações dentro dos grupos	1	523,18	3,410
		Dentro das populações	394	45898,09	96,510
$R_{ST}=0,03244$					
3	R.S. e R.I.	Entre os grupos	2	6,485	1,410
		Entre populações dentro dos grupos	1	5,015	4,450
		Dentro das populações	394	848,64	96,950
$R_{ST}=0,03446$					

Baseado em 1.023 permutações;  $p < 0,05$ ; G.L.= Graus de Liberdade; S.Q.= Soma dos Quadrados; %V= Percentagem da variância; R.S.= Rio Sabié; R.U.= Rio Umbeluzi; R.I.= Rio Incomati; R.L.= Rio Limpopo

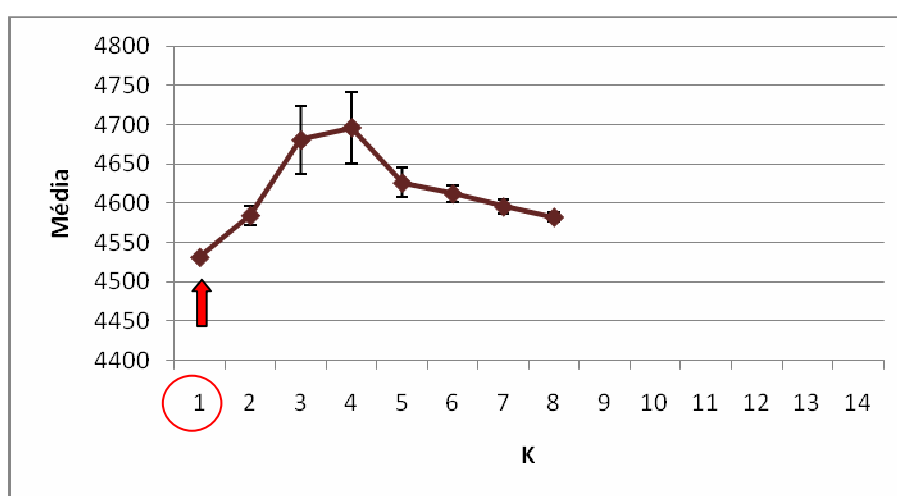
De acordo com os resultados da AMOVA para o índice  $\Phi_{ST}$ , verificou-se que nas diferentes simulações, as percentagens para a variabilidade genética encontram-se em torno de 99% dentro das populações, enquanto que as mesmas análises entre as populações (entre grupos) resultaram em valores percentuais muito baixos (de 0,000% a 0,660%). Estes resultados indicam uma baixa estruturação genética nestas populações.

Os dados obtidos ao calcular-se o  $R_{ST}$  apresentam-se maiores que os obtidos para o  $F_{ST}$ , variando de 0,170% a 1,410% entre as populações (entre grupos). Ao fazer-se a mesma análise dentro das populações encontraram-se valores percentuais em torno de 96%. Os resultados indicam que a maior variabilidade genética encontra-se dentro das populações e que existe pouca diferença entre as populações.

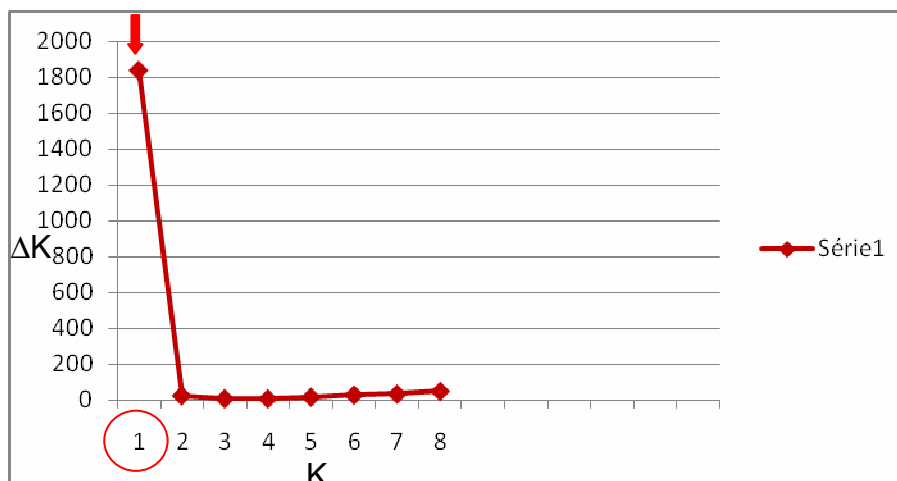
Ao compararem-se os valores de  $\Phi_{ST}$  e  $R_{ST}$ , verifica-se que  $R_{ST}$  apresenta valores maiores que os de  $\Phi_{ST}$  e ambos são significativos, o que mostra uma baixa estruturação genética das populações em estudo.

#### 4.5 ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL E FLUXO GÊNICO

Para avaliar a distinção do número de populações ( $K$ ), foi realizada uma análise Bayesiana por meio do programa *Structure* 2.2 (PRITCHARD, 2000). Testaram-se as possibilidades de existência de 2 a 8 populações. Os resultados geraram valores de  $Ln(PD)$  (log neperiano da distribuição da população), a partir dos quais foi calculado o valor de  $K$ . Considera-se que o número mais provável de populações ( $K$ ) é aquele que possui o menor valor de  $Ln(PD)$ . Assim, o  $K$  a ser escolhido será aquele que apresentar menor desvio padrão quando o gráfico atinge um platô. Os resultados obtidos apontam para  $K=1$ , ou seja, a existência de apenas uma população da tilápia *O. mossambicus* (Figura 24). Evanno *et al.* (2005) verificaram que em muitos casos os valores de  $Ln(PD)$  não oferecem uma estimativa acurada dos valores de  $K$ . Estes autores delinearam uma metodologia para a determinação do  $K$  mais provável que utiliza o delta  $K$  ( $\Delta K$ ) a partir dos valores de  $Ln(PD)$ . Com base nesse método, obteve-se também  $K=1$  (Figura 25).

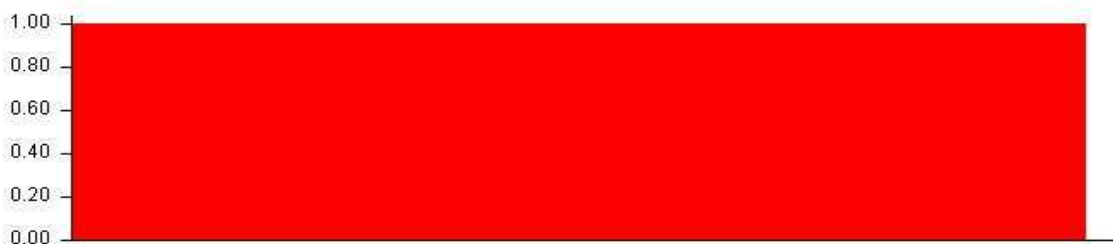


**Figura 24:** Gráfico com os resultados do *Structure* mostrando os valores de  $Ln(PD)$  em relação ao número de populações ( $K$ ) testadas.



**Figura 25:** Gráfico que ilustra os resultados do Structure mostrando os valores de  $\Delta K$  em relação ao número de populações ( $K$ ) testadas.

A análise da estrutura do *bar plot* também confirma a ocorrência de uma única população (Figura 26).



**Figura 26:** Gráfico da análise da estrutura do *bar plot*. A cor vermelha representa a existência de uma população de *O. mossambicus*.

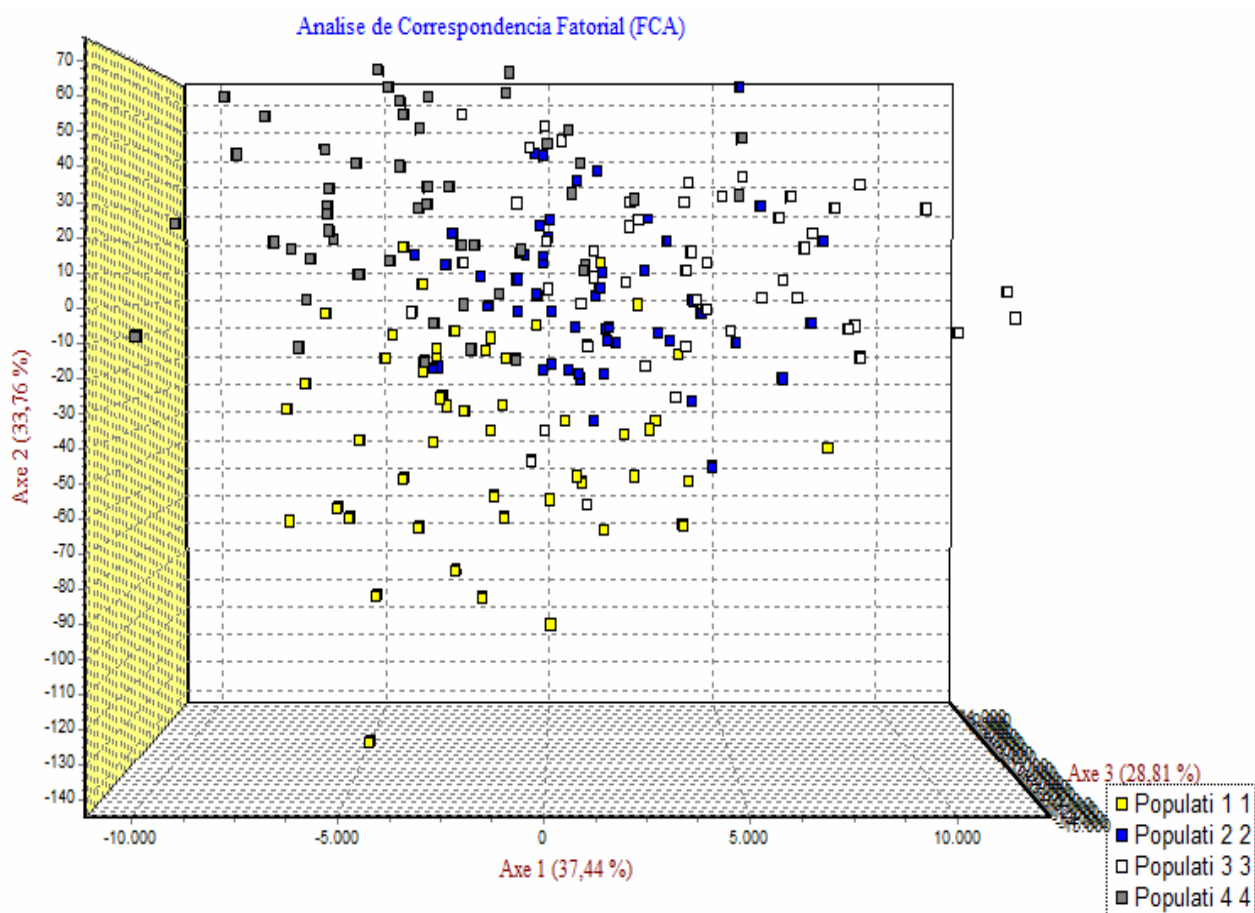
#### 4.6 ANÁLISE DE CORRESPONDÊNCIA FATORIAL (FCA)

A análise de correspondência (FCA) é um método de análise fatorial para variáveis categóricas. Nessa análise, uma decomposição dos dados é obtida para se estudar a estrutura dos dados sem que um modelo parta de uma hipótese ou que uma distribuição de probabilidade tenha sido assumida. O objetivo principal é a representação ótima da estrutura dos dados observados. Nessa análise, procura-se o subconjunto de variáveis que melhor represente a estrutura das variáveis originais, medindo a importância de cada variável (GUEDES, 1999).

Os resultados de FCA estão representados na Figura 27, onde cada cor corresponde a uma população. A nuvem de pontos mostra uma sobreposição entre

as diferentes cores, o que pode indicar uma baixa estruturação das populações e alguma relação existente entre elas. Este fato pode ser causado pelo elevado número de migrantes (Tabela 17) que causa um grande fluxo gênico entre as populações, interferindo deste modo na sua estruturação.

O fator 1 explica 37,44% da inércia, o fator 2 explica 33,36% e o fator 3, 28,81%.



**Figura 27:** Distribuição das populações de *O. mossambicus* de todos locais amostrados através da análise de correspondência fatorial (FCA). Cada cor dentro dos retângulos indica uma população:

- rio Sabié ■ - rio Limpopo ■ rio Incomati;  rio Umbeluzi

Os valores obtidos no teste exato de Fischer mostram diferenças significativas entre todos os pares de populações testadas. Este teste avalia a heterogeneidade na distribuição das frequências genotípicas (Tabela 20).

**Tabela 20:** Diferenciação genotípica estimada pelo teste exato de Fisher entre populações de tilápia *O. mossambicus*

<b>Pares de populações</b>	<b>Valor de p</b>
Sabié e Limpopo	$p < 0,01$
Sabié e Incomati	altamente significativo
Limpopo e Incomati	altamente significativo
Sabié e Umbeluzi	altamente significativo
Limpopo e Umbeluzi	altamente significativo
Incomati e Umbeluzi	altamente significativo

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES MERÍSTICAS E MORFOMÉTRICAS

Nos rios amostrados, além de *Oreochromis mossambicus* existem outras espécies de tilápias como, por exemplo, a *Tilapia rendalli*. Os indivíduos coletados foram selecionados de acordo com as características morfológicas e merísticas descritas por TREWAVAS (1983). Durante a coleta, contou-se com o apoio de um técnico do Instituto de Investigação Pesqueira de Moçambique treinado para diferenciar as várias espécies de tilápia, bem como com o saber popular da comunidade ribeirinha. Verificou-se a coloração dos peixes e das nadadeiras que se caracterizam pela ausência de listras e cor vermelha nos extremos das nadadeiras dorsal e caudal. Analisou-se a forma da cabeça e obtiveram-se algumas medidas como o número de espinhos e raios das nadadeiras dorsal e caudal. Essas precauções foram tomadas para ter certeza de que os peixes coletados pertenciam à espécie *O. mossambicus*.

As avaliações merísticas dos indivíduos amostrados apresentaram um número de 16 espinhos e 11 raios dorsais, 3 espinhos e 10 raios anais. Esses valores coincidem com a descrição de Skelton (2001) para *O. mossambicus*, na qual a nadadeira dorsal contém de 15 a 17 espinhos e 10 a 13 raios ramificados e a nadadeira anal, 3 espinhos e 9 a 12 raios ramificados.

Estes mesmos valores foram também descritos por Pullin (1988) que descreveu *O. mossambicus* usada em cultivo. Do total de 200 amostras coletadas em cada um dos 4 rios amostrados, todos os exemplares avaliados apresentaram as características morfológicas e merísticas que correspondem a *O. mossambicus*.

Com relação às medidas morfométricas, os maiores valores dos exemplares do rio Sabié pode ser devido ao fato deste rio sofrer uma menor pressão da pesca que o rio Umbeluzi. O rio Sabié está localizado numa região mais remota, onde uma pequena população vive da pesca de subsistência. Já o rio Umbeluzi, o rio Limpopo e rio Incomati percorrem áreas mais populosas, sofrendo um maior esforço de pesca.

## 5.2 DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL

Apesar da tilápia *O. mossambicus* originar-se de Moçambique, poucos são os estudos em nível molecular realizados para esta espécie no país. Em contraste, várias pesquisas vêm sendo conduzidas em diversos países do mundo, a fim de estimar a diversidade genética e a diferenciação das populações de tilápias, principalmente para o monitoramento de programas de melhoramento e conservação do patrimônio genético (BALLOUX & MOULIN, 2002; CARLETON *et al.*, 2002; BHASSU *et al.*, 2004; ROMANA-EGUIA *et al.*, 2004).

Diversidade genética é a variedade de alelos e genótipos presentes no grupo em estudo (populações, espécies ou grupos de espécies). Esta pode ser medida em termos de frequência dos alelos, número de alelos e heterozigidade observada (MOREIRA *et al.*, 2007; FRANKHAN *et al.*, 2008). Elevados níveis de variabilidade genética aumentam a possibilidade da ocorrência de um grande número de novas combinações genotípicas. Isto eleva o potencial evolutivo das espécies, pelo aumento da capacidade de adaptação a possíveis mudanças ambientais (SEBBENN *et al.*, 2000).

Com a avaliação dos cinco *loci* microssatélites foi possível identificar um total de 75 diferentes alelos distribuídos da seguinte forma, os *loci* UNH104, UNH129, UNH142, UNH222 e UNH222 apresentaram 16, 15, 9, 18 e 17 alelos, respectivamente. Estes valores são semelhantes aos encontrados por Hassanien & Gilbey (2005) numa análise da diferenciação da tilápia do Nilo, tendo como ferramenta os marcadores microssatélites.

No presente trabalho, três dos 5 *loci* analisados apresentaram alelos exclusivos ou privados (UNH104, UNH222 e UNH231). Num trabalho sobre a caracterização genética de 4 linhagens da tilápia do Nilo, Rutten *et al.* (2004) encontraram alelos privados em todos os *loci* analisados. Segundo Pearse & Crandall (2004), os alelos exclusivos podem gerar um excesso de heterozigidade, uma vez que durante o gargalo genético eles se perdem devido à deriva genética e pouco contribuem para a heterozigidade esperada.

Geralmente, as heterozigosidades esperadas são empregadas para a obtenção da heterozigidade média, uma vez que são menos sensíveis ao



tamanho amostral do que as heterozigosidades observadas (FRANKHAM *et al.*, 2008).

As medidas de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e ( $H_e$ ) representam o grau de diversidade gênica das populações em estudo. Neste trabalho foram obtidos valores que variaram de 0,940 a 1,000 enquanto as heterozigosidades esperadas ( $H_e$ ) variaram de 0,839 a 0,911, sendo que os maiores valores de  $H_o$  foram encontrados nos rios Sabié, Incomati e Umbeluzi, nos *locus* UNH142, UNH129, UNH222 e UNH231.

D'Amato *et al.* (2006), utilizando marcadores microssatélites, fizeram um estudo envolvendo *O. mossambicus* e outras espécies de tilápias e obtiveram valores de  $H_o$  que variaram de 0,25 a 0,70 e para  $H_e$  de 0,36 a 0,82. Estes valores diferem dos encontrados no presente trabalho. Esta diferença talvez se deva ao fato desses autores terem usado para seu estudo majoritariamente amostras provenientes de plantéis de cultivo, enquanto que as amostras usadas no presente trabalho foram todas obtidas em meio natural. Outros trabalhos como o de Romana-Eguia *et al.* (2004) analisaram marcadores microssatélites em 11 populações de *O. niloticus* (tilápia NIFI, tilápia de Israel, quatro populações provenientes de programas de melhoramento – GIFT, GMT, FAC e SEAFDEC, além de cinco populações híbridas) e obtiveram valores de  $H_o = 0,560$  e  $H_e = 0,702$ . RUTTEN *et al.* (2004), num estudo sobre a caracterização genética de 4 linhagens de tilápia do Nilo, encontraram valores de  $H_o$  entre 0,624 e 0,711 e  $H_e$  entre 0,612 e 0,696. Os resultados obtidos por esses autores diferem dos encontrados no presente trabalho, em que  $H_o$  foi significativamente maior que  $H_e$ .

Quando se tem uma população grande em que a reprodução se dá ao acaso e não existe nela a atuação de nenhuma força como ausência de mutação, migração ou seleção, as freqüências alélicas e genotípicas num *locus* autossômico atingem um equilíbrio a que se dá o nome de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, em homenagem a seus propositores (BEAUMONT & HOARE, 2003; FRANKHAN *et al.*, 2008).

No presente trabalho, encontrou-se desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg nas quatro populações em estudo. Este fato pode ser explicado pelo excesso de heterozigotos (SELKOE & TOONEN, 2006), verificado pelos valores de  $F_{IS}$ . Os valores de  $F_{IS}$  representam uma medida do desvio das freqüências genotípicas em relação às freqüências panmíticas, expressas em termos de

deficiência ou excesso de heterozigotos, e que também podem ser interpretados como coeficiente de endogamia ( $F$ ) (GROOM *et al.*, 2006; FRANKHAN *et al.*, 2008).

Ao estudar a variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites, Moreira *et al.* (2007) encontraram valores que foram variáveis e significativamente diferentes de zero ( $\alpha = 0,005$ ) nas variedades e seus cruzamentos. Esses valores indicaram a ocorrência de excesso de heterozigotos em todos os plantéis por eles analisados. Os valores de  $F_{IS}$  encontrados no presente estudo corroboram com os valores encontrados por estes investigadores.

Segundo Murray (1996), a predominância de cruzamentos isogâmicos pode ser o principal motivo da existência do excesso de heterozigotos.

Beaumont & Hoare (2003), por sua vez, citam que o excesso de heterozigotos pode ocorrer devido ao acasalamento preferencial (*disassortative*), ou seja, quando os indivíduos dão preferência a um parceiro que possui características diferentes das suas.

Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) também foram encontrados para todas as populações de tilápia do Nilo estudadas por Hassanien & Gilbey (2005), por meio de marcadores microssatélites. Outros trabalhos, como o de D'Amato *et al.* (2007) e de Romana-Eguia *et al.* (2004), obtiveram resultados semelhantes, ou seja, de 5 *loci* microssatélites estudados, 4 apresentaram desvio significativo no EHW.

Ao analisar o efeito gargalo, encontraram-se valores significativos nos três modelos evolutivos (IAM, TPM e SMM) para a população do rio Limpopo, demonstrando que esta está passando ou passou por um efeito gargalo recente. No entanto, para as demais populações (rios Incomati, Sabié e Umbeluzi) este teste foi significativo para os modelos evolutivos IAM e TPM, mas não significativo para o modelo SMM. Deste modo, não se pode afirmar que tenham sofrido uma redução populacional recente.

Chacate & Chaúque (2007) realizaram um estudo de monitoramento da pescaria artesanal e de estatística pesqueira do rio Limpopo. Constataram que houve uma redução do rendimento da pesca das espécies *O. mossambicus* e *O. niloticus*. Verificaram uma diminuição do tamanho dos peixes no período compreendido entre 2006 e 2007. Em 2007, a maioria dos espécimes capturados encontrava-se na fase juvenil, ou seja, antes mesmo da primeira maturação gonadal.

Segundo D'Amato *et al.* (2007), o rio Limpopo possui um caráter temporal, no qual ocorrem variações entre períodos de cheias e de secas. Durante as épocas secas, os peixes ficam confinados em lagoas permanentes e algumas populações experimentam o efeito gargalo. Este fato aliado à pressão causada pelo grande esforço de pesca, confirma os resultados encontrados no presente trabalho para a população do rio Limpopo.

Pactrick *et al.* (2000) fizeram um estudo sobre a divergência e o fluxo gênico de populações de ciclídeos do lago Malawi e obtiveram um efeito gargalo na população de Mbuna. Este efeito pode ter sido causado pelas grandes flutuações nos níveis de água do lago que levaram a uma grande redução populacional. Episódios de secas severas alternadas com cheias criam um forte impacto nas populações locais, levando a extinções e recolonizações. O efeito gargalo obtido por estes investigadores corrobora com o obtido no presente trabalho.

Ao estudar a evolução de tilápias selvagens (*Oreochromis spp*), Costa-Pierce (2003) encontrou um efeito gargalo em uma das populações analisada. Esse resultado é semelhante ao resultado encontrado neste trabalho.

### 5.3 ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES

O teste de Análise Molecular de Variância (AMOVA) baseia-se na análise da variância das frequências dos genes, tendo em conta o número das diferenças mutacionais entre os haplótipos moleculares (EXCOFFIER *et al.*, 1992; MICHALAKIS & EXCOFFIER, 1996). O investigador define os membros hierárquicos dos indivíduos amostrados e a AMOVA reparte a variância total nos componentes da amostra (LABATE, 2000).

Das diferentes simulações feitas para a AMOVA com base no parâmetro  $\Phi_{ST}$ , verificou-se que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações. A maior percentagem de variância foi de 99,330%, enquanto entre as populações obteve-se no máximo 0,660% ( $\Phi_{ST} = 0,00669$ ) (Tabela 18). Ao realizar-se a mesma análise com o parâmetro  $R_{ST}$  também se constatou que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações. A maior porcentagem foi de 96,950% dentro das populações e de 1,410% entre os grupos ( $R_{ST} = 0,03446$ ) (Tabela 19). Resultado semelhante foi obtido Romana-Eguia *et al.* (2004) que após

analisarem a diversidade genética de tilápias usando marcadores microssatélites, também encontraram maior variância molecular dentro de cada grupo (99,61%) do que entre os grupos (0,18%).

Os valores de  $\Phi_{ST}$  e  $R_{ST}$  encontrados foram 0,00669 e 0,03446, respectivamente. De acordo com Wright (1978), valores de  $F_{ST}$  entre 0 e 0,05 indicam baixa estruturação genética, entre 0,05 e 0,15, estruturação moderada, entre 0,15 a 0,25 alta estruturação e acima de 0,25, forte estruturação genética. Deste modo, os valores encontrados na análise  $\Phi_{ST}$  e  $R_{ST}$  sugerem que as populações apresentam baixa estruturação genética.

Para as análises de  $R_{ST}$  e  $N_m$  par a par, todos os valores encontrados foram significativos e também indicaram baixa estruturação genética. Contrariamente, D'Amato *et al.* (2007) obtiveram uma alta estruturação genética e baixo fluxo gênico, onde  $R_{ST}$  foi de 0,43 ( $p < 0,01$ ) e  $N_m < 1$ .

Moreira *et al.* (2007) em um trabalho com *O. niloticus* obtiveram valores de  $R_{ST}$  (0,130) significativamente diferentes de zero para  $p < 0,05$ . Estes valores indicam de moderada à alta separação genética entre as variedades, que pode ser resultado do histórico diferencial de formação genética das variedades analisadas ao longo dos anos. Este valor difere do encontrado no presente trabalho.

O dendograma construído a partir das distâncias de Nei (1978) evidencia a existência de diferenças entre as populações, a partir das quais aquelas mais relacionadas geneticamente foram agrupadas. Coincidentemente, o dendograma agrupou as populações mais próximas geograficamente. Entretanto, ao realizar-se o teste de Mantel verificou-se que não existe nenhuma relação entre a distância genética e a distância geográfica. O fluxo gênico tende a reduzir as distâncias genéticas entre as populações (SCRIBNER *et al.*, 2006).

Uma das vias através das quais as populações de *O. mossambicus* possivelmente se dispersam é por via marítima ao longo da costa (D'AMATO *et al.*, 2007). Assim, uma vez que todos os rios amostrados deságuam junto à costa sul de Moçambique, provavelmente o fluxo gênico entre estas populações se tenha dado a partir deste ponto. Durante o período das cheias do ano 2000, os rios Limpopo e Incomati estiveram ligados pelo rio Mazimechopes, permitindo um fluxo das populações que neles habitam (SHNEIDER, 2000). Provavelmente, o mesmo tenha acontecido em relação aos rios Umbeluzi e Sabié, uma vez que estes dois rios localizam-se geograficamente mais próximos.

O programa *Structure 2.2.* (PRITCHARD, 2000) sem informação *a priori*, infere o número de populações ( $K$ ) mais provável, cada uma contendo um conjunto de indivíduos cujos genótipos estão em EHW. A análise testou a existência de 1 a 8 populações, mas os valores de  $K$  e  $\Delta K$  indicaram apenas uma população. Ao analisar-se a estrutura do *bar plot*, as representações dos genótipos mostraram também uma única população. Isto talvez possa ter ocorrido devido aos baixos valores de  $F_{ST}$  que não foram suficientes para separar essas populações. Este resultado pode ser justificado pela ocorrência de ligação entre os rios que teve lugar durante o período das cheias no ano 2000 (MICOA, 2005).

Shneider (2000) ao estudar a ocorrência de espécies de peixes comerciais exóticos no rio Limpopo, depois das cheias do ano 2000, constataram que a presença de tilápia do Nilo neste rio. De acordo com Micoa (2007), episódios de cheias que atingem as bacias dos referidos rios são vários. A Tabela 21 aponta alguns dados sobre as cheias históricas em geral e a de 2000, em algumas bacias hidrográficas de Moçambique, onde se incluem os rios amostrados no presente trabalho. As cheias em Moçambique são causadas não só pela precipitação que ocorre dentro do território nacional, mas também pelo escoamento das águas provenientes das descargas das barragens dos países vizinhos situados a montante das bacias hidrográficas partilhadas (MICOA, 2007).

**Tabela 21:** Cheias históricas nas bacias hidrográficas de Moçambique

Bacia	Cheias Históricas			Cheia de 2000	
	Nº	Período	Ano	Q (m <sup>3</sup> /s)	Q (m <sup>3</sup> /s)
Umbeluzi	4	1966 – 1984	1984	6.150	1.410
Incomati	12	1937 – 1998	1976	5.260	11.000
Limpopo	13	1915 – 1996	1977	8.740	10.581
Buzi	12	1957 – 1995	1973	8.246	> 10.000
Save	5	1960 – 1981	1974	6.300	> 10.000

Micoa (2007) apresenta mapas de Moçambique que mostram os locais mais abrangidos pelas cheias. A cor vermelha indica os locais de alto risco, onde estão incluídos os rios amostrados no presente trabalho (Figura 28).

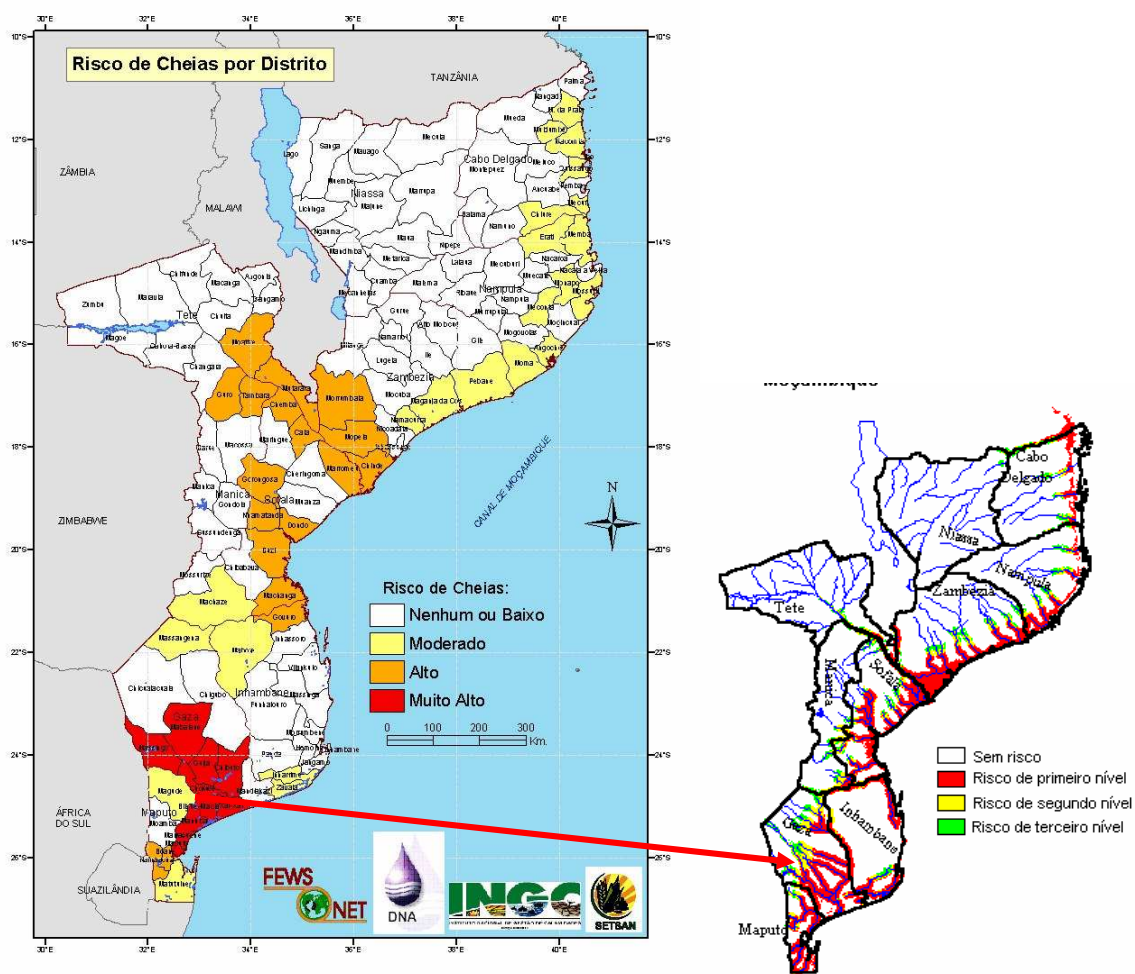


Figura 28: Zonas de risco de cheias em Moçambique (MICOA, 2005)

D'Amato *et al.* (2007) fizeram um estudo com base em marcadores moleculares microssatélites e mtDNA sobre a hibridização e a filogeografia de *O. mossambicus* na África do Sul e evidenciou a presença de duas ou três linhagens desta espécie. No lago Malawi, constatou-se a presença de uma linhagem mais antiga, a partir da qual ocorreu uma recente radiação ou colonização de uma linhagem mais recente na bacia do rio Zambezi através do sistema Shire, do qual este rio fazia parte no passado. Por outro lado, o sistema Limpopo esteve ligado ao Alto Zambezi. Assim, não é de se admirar que a dispersão desta espécie para o rio Limpopo tenha ocorrido do Baixo Zambezi por onde se dispersou para a região sul de Moçambique. Ainda segundo esta mesma autora, *O. mossambicus* foi observada em águas marinhas ao norte de KwaZulu-Natal, o que sugere que sua dispersão possa também ocorrer ao longo da costa. Este fato é mais um indicativo do fluxo gênico que ocorre entre as populações de *O. mossambicus* existentes nos rios amostrados.

A estrutura populacional é grandemente influenciada pelo fluxo gênico (SLATKIN, 1993). Espécies com altas taxas de dispersão ou que ocupam habitat livre de barreiras geográficas tendem a exibir baixos níveis de estruturação populacional, enquanto aquelas que possuem pequena capacidade de dispersão ou estão submetidas à separação imposta por barreiras físicas e comportamentais acentuadas apresentam um alto grau de divergência interpopulacional (GRAVES, 1998).

Segundo Galetti *et al.* (2008), existe uma associação entre distância genética e distância geográfica, sendo que o isolamento por distância é um fator significativo de estruturação em uma grande escala geográfica. No presente caso, apesar dos rios amostrados situarem-se em bacias diferentes (com exceção do rio Sabié que faz parte do sistema do rio Incomati), a ocorrência das cheias acaba permitindo que haja um fluxo gênico entre as populações dos locais amostrados.

A análise fatorial de correspondência (FCA) indicou uma sobreposição em todas as populações amostradas, porém existe alguma tendência delas se afastarem da zona central do gráfico tomando diferentes posições. Esta tendência é um indicativo de que as populações têm alguma estruturação, fato que não se consegue observar na análise feita pelo *Structure*. Esta baixa estruturação pode ser causada pela recente colonização destas populações na região sul de Moçambique, pela existência de fluxo gênico entre as populações através das correntes marítimas e pelos diferentes episódios de cheias ocorridos nos rios amostrados.

Nyingi *et al.* (2009) realizaram um estudo para caracterização genética de populações de tilápias no Quênia. Esses autores obtiveram uma grande diferenciação entre as populações, provavelmente, devido ao elevado número de alelos privados (10). Neste trabalho, foi encontrado apenas 1 alelo privado nas populações dos rios Incomati, Umbeluzi e Limpopo.

Os resultados encontrados no presente trabalho diferem também daqueles encontrados por D'Amato *et al.* (2007), que estudaram populações de *O. mossambicus* e *O. niloticus*. Estes pesquisadores fizeram amostragens de populações pertencentes a bacias bem distantes umas das outras, entre as quais se inclui a bacia do rio Limpopo dentro do território sul africano. Além disso, usaram um número amostral muito pequeno, por exemplo, para a população do rio Limpopo analisaram somente seis indivíduos. Outro fato, não menos importante, foi que algumas populações analisadas eram provenientes de plantéis de cultivo. No

presente trabalho, o número amostral para cada rio foi de 50 indivíduos e todas as populações foram oriundas do ambiente natural.

#### **5.4 IMPLICAÇÕES DA GENÉTICA PARA O CULTIVO E A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE *O. mossambicus***

Como discutido anteriormente, vários estudos mostram a importância de *O. mossambicus* para o cultivo. Apesar de apresentar um crescimento lento quando comparada a *O. niloticus*, esta tilápia exibe a vantagem de se adaptar facilmente a elevadas salinidades, o que torna possível o seu cultivo em água salgada. Devido a esta característica e à existência de um mutante sem pigmentação, ela tem sido usada para a formação de híbridos com alta tolerância à água salgada e que com coloração vermelha ou branca. Os híbridos com as colorações descritas são muito apreciados no mercado.

A hibridização deve-se à recente divergência das espécies, de modo que as populações de tilápias continuam reprodutivamente compatíveis (COSTA-PIERCE & DOYLE, 1997). Apesar da relativa facilidade de obtenção de híbridos em sistemas de cultivo, a hibridização em populações naturais não ocorre facilmente, a não ser que algum evento ambiental de grande escala ocorra, tais como cheias, terremotos, etc. (PULLIN, 1988). A introdução de outras espécies de tilápia no meio natural, seja por eventos ambientais, como as constantes cheias alternadas com os períodos de seca dos rios de Moçambique, ou por ação antrópica, é um fator preocupante, uma vez que podem hibridizar-se com as espécies nativas, pondo em risco a existência de espécies puras.

Para um programa de melhoramento genético é fundamental que haja diferenças entre os caracteres herdáveis nas populações em causa. Deste modo, torna-se de suma importância a conservação da integridade genética das populações alvo.

As análises efetuadas no presente trabalho demonstram que “as populações” amostradas não devem ser tratadas como uma única população. De acordo com os resultados obtidos e as discussões relatadas sugere-se: as seguintes medidas de



conservação dos estoques selvagens de *O. mossambicus* existentes em Moçambique.

Um monitoramento periódico da variabilidade genética dos estoques da tilápia *Oreochromis mossambicus* oriundas de Moçambique em seu ambiente natural;

- A criação de um banco de germoplasma de *O. mossambicus* para fins de conservação;
- Uma avaliação da ocorrência de hibridização entre *O. mossambicus* e outras espécies de tilápia existentes nos rios estudados, através de uma análise de RFLP do DNA mitocondrial e nuclear;
- A realização de um estudo abrangendo outras bacias hidrográficas do território moçambicano usando um número maior de *loci* microssatélites;
- A proibição ou restrição da criação da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) dentro do território moçambicano para evitar que ela escape do meio de cultivo para o ambiente natural;
- O estabelecimento de um programa de melhoramento genético intraespecífico de *O. mossambicus*.

## 6 CONCLUSÕES

O estudo das populações naturais de *Oreochromis mossambicus* por meio de marcadores microssatélites possibilitou chegar às seguintes conclusões:

- As populações não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, possivelmente, devido ao excesso de heterozigotos apontados pelo índice de fixação;
- A amostragem de rio Limpopo indica a ocorrência de uma redução populacional recente (efeito gargalo);
- Valores de  $R_{ST}$  e  $F_{ST}$  demonstram baixa estruturação genética, possivelmente, em decorrência das cheias periódicas;
- A maior variação genética está contida dentro das populações de *O. mossambicus*;
- A parcela de variação entre as populações estudadas deve ser levada em consideração para fins de conservação;
- O elevado polimorfismo na população de *O. mossambicus* revela que esta espécie pode ser utilizada na construção de uma linhagem com boa performance para a aqüicultura.

## REFERÊNCIAS

- AGRESTI, J. J. ; SEKI S.; CNAANI, A.; POOMPUANG, S.; HALLERMAN, E. M.; UMIEL, N.; HULATA, G.; GALL, G. A.E.; BERNIE, M. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. **Aquaculture**, v.185, p.43–56, 2000.
- ARA-SUL. Administração Regional de Águas no Sul. **Pela Água Vida e desenvolvimento**. Disponível em: <<http://www.ara-sul.co.mz/subindex.asp>>. Acesso em: 18 de Janeiro de 2010.
- BALLOUX, F.; MOULIN, N. L. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v.1, p.155-165, 2002.
- BEAUMONT, A. R.; HOARE, K. **Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquacultures**. School of Sciences, University of Wales, Bangor, U.K., Blackwell Science Ltda., 2003.
- BECKER, K.; FISHELSON L. Standard and routine metabolic rate, critical oxygen tension and spontaneous scope for activity of tilapias. 1986 p. 623-628. In: MACLEAN, J.L.; DIZON L.B. and HOSILLOS L.V. (eds.) **The First Asian Fisheries Forum**. Asian Fisheries Society, Manila, Philippine.
- BELL, G.I.; JURKA, J. The length distribution of perfect dimer repetitive DNA is consistent with its evolution by an unbiased single-step mutation process. **J. Mol. Evol.** 44, 414–421.1997.
- BENITES, C. **Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae), da Bacia Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares do tipo microssatélite**. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 74p. 2008.
- BHASSU, S.; YUSOFF, K.; PANANDAM, M.; EMBONG, W. K.; OYYAN, S.; TAN, S. G. The genetic structure of *Oreochromis* spp. (Tilapia) populations in Malaysia as revealed by microsatellite DNA analysis. **Biochemical Genetics**, v. 42, p.217-229, 2004.
- 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**, v. 32, p.314-331, 1980.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 374p.

BRITO, R.; FAMBA, S.; MUNGUAMBE, P.; IBRAIMO, N.; JULAIA, C. Profile of the Limpopo Basin in Mozambique, a Contribution to the Challenge Program on Water and Food. Project 17 "Integrated Water Resource Management for Improved Rural Livelihoods: Managing risk, mitigating drought and improving water productivity in the water scarce Limpopo Basin". **WaterNet Working Paper**, v.11, WaterNet, Harare, 2009.

BRUTON, M.N.; and BOLT, R.E. Aspects of the biology of *Tilapia mossambicus* Peters (*Pisces: Cichidae*) in a natural freshwater lake (Lake Sibaya, South Africa). **Journal of Fish Biology**, 7: 423-446. 1975.

CAULTON, M.S. and HILL, B.J. The effect of temperatura on the ability of *Tilapia mossambicus* Peters to enter deep water. **Journal of Fish Biology** 7: 221-226. 1975.

CAMPO, L. F. C. **Una evolucion de 25 años, de la incertidumbre al éxito, tilapia roja**, 2006. Disponível em: <[http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/Colombia/TILAPIA\\_ROJA.doc](http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/Colombia/TILAPIA_ROJA.doc)>. Acesso em: 28 de Março de 2008.

CARLETON, K. L.; STREELMAN, J. T.; LEE, B.-Y; GARNHART, N.; KIDD, M.; KOCHER, T. D. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. International Society for Animal Genetics. **Animal Genetics**, v.33, p.140-144, 2002.

CASTRO, L. A. B. Sustainable use of biodiversity-components of a model project for Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.29, p.687-699, 1996.

CHANGADEYA, W.; MALEKANO, L. B.; AMBALI, A. J. D. Potential of genetics for aquaculture development in Africa. **International Network on Genetics in Aquaculture**, 2003. Disponível em: <[http://www.worldfishcenter.org/Naga/Naga26-3/pdf/naga\\_26no3\\_feature8.pdf](http://www.worldfishcenter.org/Naga/Naga26-3/pdf/naga_26no3_feature8.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2008.

COCHERHAM, C. C.; WEIR, B. S. Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, v.47, p.855-863, 1993.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v.144, n. 4, p.2001-2014, 1996.

COSTA-PIERCE, B. A.; DOYLE, R. W. Genetic identification and status of tilapia regional strains in southern California. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. (Eds.) **Tilapia Aquaculture in the Americas**, Vol. 1. World Aquaculture Society Baton Rouge, Louisiana, United States, 1997, p. 1-17.

COSTA-PIERCE, B. and RAKOCY, J.B. Tilapia Aquaculture in the Americas. **World Aquaculture Society**, v.1, 1997.

CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics **Aquaculture** 255.1–29. 2006.

CRUZEIRO DO SUL, Instituto de Investigação para o Desenvolvimento José Negrão. **Perfil do Rio Umbeluzi, 2006**. Disponível em: <[http://www.iid.org.mz/iucn/html/bacia\\_do\\_umbeluzi\\_perfil.htm](http://www.iid.org.mz/iucn/html/bacia_do_umbeluzi_perfil.htm)>. Acesso em: 23 fev. 2010.

D'AMATO, M. E.; ESTERHUYSE, B. C. W.; VAN DER WAAL; BRINK, D.; VOLCKAERT, F. A. M. Hybridization and phylogeography of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* in southern Africa evidenced by mitochondrial and microsatellite DNA genotyping. **Conservation Genetics**, v. 8, p. 475-488, 2007.

Di Rienzo, A.A.; Peterson, J.C.; Carza, A.M.; Valdes, M., Slatkin, M.;Freimer, N.B.. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 91, 3166–3170.1994.

EDWARD, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A.; CASKEY, C. T. DNA typing genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Genetics**, v. 49, p.746-756, 1991.

EL-SERAFY, S. S.; HAMEID N. A. H. A.; AWWAD M. H.; AZAB, M. S. DNA ribotyping analysis of Tilapia species and their hybrids using restriction fragment length polymorphisms of the small subunit ribosomal DNA. **Aquaculture Research**, v. 38, p.295-303, 2007.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p.2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Molecular Biology Evolution**, v. 12, p.921–992, 1995.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Applications to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p.479–491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN version 3.01. **An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland. Disponível em: <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>>. Acesso em: 07 dez. 2009.

FAO, **National aquaculture sector overview Mozambique 2003**. Disponível em: <http://www.fao.org/fisher/topic/3380>. Acessado a 29 de Março de 2008.

FAO, Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service, In: **FAO Yearbook Annuaire 2007**, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2009, 72p.

FERGUNSON, A.; TAGGAART, J. B.; PRODHOL, A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to salmon. **J. Fish Biol.**, v. 47, n. A, p. 103-126, 1995.

FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

FISHER, R. A. **The genetical theory of natural selection**. Oxford: Charendon Press, 1930.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21st century. In: K. Fitzsimmons and J. C. Filho (eds.) **Tilapia aquaculture in the 21st century**. Proceedings of the Fifth International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 2000. p. 3-8.

FRANKHAM, R., BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética de Conservação**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. 262p.

GALETTI, J. R. P. M.; RODRIGUES, F. P.; SOLÉ-CAVA, A.; MIYAKI, C. Y.; CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E. A.; SANTOS, F. R.; FARIAS, I. P.; VIANNA, J. A.; OLIVEIRA, L. R.; WEBER, L. I.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FRANCISCO, M. R.; REDONDO, R. A. F.; SICILIANO, S.; DEL LAMA, S. N.; FREITAS, T. R. O.; HRBEK, T.; MOLINA, W. F. 2008. Genética da conservação brasileira. In: Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP: SBG, p. 244-274.

GOFF, D. J.; GALVIN, K.; KATZ, H.; WESTERFIELD, M.; LANDER, E. S.; TABIN, C. J. Identification of polymorphic simple sequence repeats in the genome of the zebrafish. **Genomics**, v.14, p.200-202, 1992.

GOUDET, J. **FSTAT, A program for IBM PC compatibles to calculate Weir and Cockerham's (1984) estimators of F-statistics (version) 1.2**.1995.

GOUDET, J. **FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2)**. Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002.

GRAEFF, Á. e PRUNER, A. N. **Variáveis que podem interferir na sobrevivência e desenvolvimento da Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) na região fria do Estado de Santa Catarina**. EPAGRI. Estação Experimental de Caçador. Unidade de Piscicultura. Caçador, SC (Brasil) Comunicação Científica. Disponível em: <<http://www.civa2006.org>>, 70-79. Acesso em: 25 mar. 2008.

GREGG, R. E. HOWARD, J. H. AND SHONHIWA, F. Introgressive hybridization of tilapias in Zimbabwe **Journal of Fish Biology** 52, 1–10. 1998

GROOM, M. J.; MEFFE, G. K.; CARROLL, C. R. and Contributors. **Principles of Conservation Biology**. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2006.

HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTERER (Eds.) **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, 1999, p. 1-9.

HASSANIEN, H.A.; GILBEY, J. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. **Aquaculture Research**, v.36, p.1450-1457, 2005.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas - Uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, p.73-84, 1995.

HOGUANE, A. M. Perfil Diagnóstico da Zona Costeira de Moçambique. Diagnosis of Mozambique Costal Zone. **Revista de Gestão Costeira Integrada**. Universidade Eduardo Mondlane, Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras, Quelimane, Moçambique, 7(1): 69-82. Artigo sem revisão editorial, 2007. Disponível em: <[www.aprh.pt/rgci](http://www.aprh.pt/rgci) [www.gci.inf.br](http://www.gci.inf.br)>. Acesso em: 39 mar. 2008.

HOSHINO, A. A.; PALMIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T. E. B.; LOPES, C. R.; GIMENES, E. M. A. Marcador Microssatélite na Conservação de Germoplasma Vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p.146-150, 2002.

JACOB, H. J.; LINDPAINNER, K.; LINCOLN, S. E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R. K.; MAO, Y. P.; GANTEN, D.; DZAU, V. J.; LANDER, E. S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v. 67, p. 213-224, 1991.

JEFFREYS A. J.; WILSON, V. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.

KAMAL, M.A.H.MD, e MAIR, C.G. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia. *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. **Aquaculture**. 247:189-201. In NEIRA, R. e DÍAZ, N.F. Genetics in Aquaculture VIII. Elsevier. 2005.

KELLOGG, K. A.; MARKET, J. A.; STAUFER, J. R.; KOCHER, T. D. Microsatellite variation demonstrates multiple paternity in liking cichlid fishes from Lake Malawi, Africa. **Proceedings of Royal Society of London**, v. 260, p.79-84, 1995.

KIMURA, M.; Crow, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics** 49, 725–738. 1964.

KIMURA, M.; OHTA, T. **Stepwise mutational model and distribution of allelic frequencies in a finite population**. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 2868–2872. 1978.

KOCHER, T. D.; LEE, W. J.; SOBOLEWSKA, H.; PENMAN, D.; McANDREW, B. A. Genetic Linkage Map of a Cichlid Fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Genetics Society of America. **Genetics**, v. 148, p.1225–1232, 1998.



KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí, F. kubitza, 2000, 285p.

KUBITZA, F. Tilapia em água salgada, uma boa alternativa de cultivo para estuários e viveiros litorâneos. **Panorama da Aquicultura**, v. 15, n. 88, 2005.

LABATE, J. A. Software for Population Genetic Analyses of Molecular Marker Data. **Crop Science**, v. 40, p.1521–1528, 2000.

LEE, W. J.; KOCHER, T. D. **Tilapia CA Repeats**, 1996. Disponível em: <<http://tilapia.unh.edu/www/Pages/TGP/CA-Tilapia.html>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

LEE, B.Y.; LEE, W.J. J.; STREELMAN, T., CARLETON, K. L.; HOWE, A. E.; HULATA, G.; SLETTAN, A.; STERN, J. E.; TERAJ, Y.; AND KOCHER, T.D. A Second-Generation Genetic Linkage Map of Tilapia (*Oreochromis* spp.) **Genetics Society of America** DOI: 10.1534/genetics.104.035022. 2005.

LEESTEMAKER, HEYINK, J. **Gaps Between the UN-Convention, the SADC Protocol and National Legal Systems in South Africa, Swaziland, and Mozambique**. Disponível em: <http://www.thewaterpage.com/leestemaker.htm>. Acesso em 02/02/2010

LITT, M.; LUTY, J. A. A hyper variable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetic**, v. 44, p.398-401, 1989.

LOVE, J. M.; KNIGHT, A. M.; MCALEER, M. A.; TODD, J. A. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p.4123–4130, 1990.

MACARANAS, J. M.; TANIGUCHI, N.; PANTE, M. J. R.; CAPILI, J. B.; PULLIN, R. S. V. Electrophoretic evidence for extensive hybrid gene introgression into commercial *Oreochromis niloticus* (L.) stocks in the Philippines. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 17, p. 249-258, 1986.

MEFFE, K.G.; CARROLL, C. R. and GROOM M. J. and Contributors. **Principles of Conservations Biology**. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2006.

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

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P. TEIXEIRA, C.S.; SOUSA, A.B.; COELHO, E.G.A.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.58, n.1, p.87-93, 2006.

MENEZES, M. R.; NOGUCHI, D.; NAKAJIMA, M.; TANIGUCHI, N. Microsatellite development and survey of genetic variation in skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*. **Journal of Fish Biology**, v. 73, n. 2, p. 463–473, 2008.

MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIER, L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite *loci*. **Genetics**, v. 142, p.1061-1064, 1996.

MICOA, **Estudo sobre o Papel das Convenções Internacionais sobre meio ambiente no Alívio a Pobreza em Moçambique - uma análise de Consistência**. Disponível em: < <http://www.nicap.net/fileadmin/NCAP/Countries/Mozambique/O4.2-032135.0407xx.MOZ.CON-01.Output4-2.v1.pdf>. > Acesso em: 30 jan. 2010.

MICOA, **Avaliação da vulnerabilidade às mudanças climáticas e estratégias de adaptação**. Ministério para Coordenação da Acção Ambiental (MICOA), Maputo, 2005, 58p. Disponível em: <[www.napa-pana.org](http://www.napa-pana.org)>. Acesso em: 30 jan. 2010.

MILLER, M. P. **Tools for population genetics analyses (TFPGA) version 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data**. Flagstaff Northern Arizona University, 1997. 33p

MOREIRA, A. A. **Variabilidade genética e desenvolvimento de duas variedades de *Oreochromis niloticus* (Red Stirling e Chitralada) e de seu híbrido intraespecífico**. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, 158 p., 2003.

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

MOREIRA, H. L. M. **Análise da estrutura genética de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimados por microssatélites.** Tese de Doutorado em Ciências. Instituto de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 112p.1999.

MOREIRA, M. E. S. A. Formas de Modelado nos Leitões Rochosos dos Rios no Sul de Moçambique. **Finisterra**, XXXIV, 67-68, 1999, PP. 57-70.

MURRAY, B. W. **The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data.** 1996. Disponível em: <<http://helix.biology.mcmaster.ca/brent/node1.html>> Acesso em: 25 jan. 2010.

NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, v. 106, p.283-292, 1972.

Nei, M. **Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.**, 70(12, Pt 1), 3321-3323. 1973.

NEI, M., F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annual of Human Genetics**, v.41, p.225-233, 1977.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p.583-590, 1978.

NYINGI, D., VOS, DE L., AMAN, R., AGNÉSE J-F. Genetic characterization of an unknown and endangered native population of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae; Teleostei) in the Lobo Swamp (Kenya). **Aquaculture** 297: 57-63. 2009.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R. and Vieira, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites **Genetics and Molecular Biology**, 29, 2, 294-307. 2006.

ONU, 2009 **El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo - Crisis económicas: repercusiones y enseñanzas extraídas.** Organización de Las Naciones Unidas para La Agricultura y la Alimentación, Roma, 2009, 66p.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical Applied Genetic**, v. 85, p.985-993, 1993.

- PATRICK, D. D.; JEFFREY, A. M.; MATTHEW, E. A.; KOCHER, T. D. Divergence with gene flow in the rock-dwelling cichlids of Lake Malawi. **Evolution**, v. 54, n. 5, p. 1725-1737, 2000.
- PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. Beyond  $F_{ST}$ : Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 585–602, 2004.
- POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. L. **World-wide prospect for commercial production of tilapia**. International Centre for Living Aquatic Resources Management (ICLARM), Auburn University. 1994. 40 p.
- PHILIPPART, J. C.; RUWET, J.C. **Ecology and distribution of tilapias**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY AND CULTURE OF TILAPIAS, 7., Manila, 1982. **Proceedings**. Manila: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1982. p.15-59.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.
- PULLIN, R.S.V. and McCONNELL. **The biology and culture of tilapias**. ICLAM Conference proceedings. International Center for living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines. 1982. 7,432 p
- PULLIN, R. **Tilapia Genetic Resources for Aquaculture**. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila Philippines. 1988.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (Version 12): Population genetics software for exact tests and ecumenism. **Journal of Heredity**, v. 86, p.248-249, 1995.
- REDNER, B.D. and STICKNEY, R.R. Acclimation to ammonia by *Tilapia aurea*. **Trans. Amer. Fish. Soc.** 108: 383-388. 1979.
- ROGNON, X.; GUYOMARD, R. Large extent of mitochondrial DNA transfer from *Oreochromis aureus* to *O. niloticus* in West Africa. **Molecular Ecology**, v. 12, p.435–445, 2003.
- ROMANA-EGUIA, M. R. R.; IKEDA, M.; BAISAO, Z. U.; TANIGUCHI, N. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. **Aquaculture**, v. 236, p.131-150, 2004.

RUTTEN, M. J. M.; KOMEN. J.; DEERENBERG, R.M.; SIWEK, M.; BOVENHUIS, H. Genetic characterization of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 35, n.2, p.93-97, 2004.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermo stable DNA polymerase. **Science**, v. 238, p.487-491, 1988.

SCOTT, L.E.P.; SKELTON, P.H.; BOOTH, A.; VERHEUST, L.; DOOLEY, J. & HARRIS, R. **Atlas of Southern African Freshwater Fishes**. Smithiana Monographs, 2, The South African Institute for Aquatic Biodiversity, Grahamstown. 2006. pp 303.

SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J-M.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L., **ARLEQUIN ver. 1.1: A software for population genetic analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 1997.

SCHNEIDER, M. F. Ocorrência das Espécies Comerciais Exóticas de Peixe no Rio Limpopo depois das Cheias no Ano 2000. **Boletim de Investigação Florestal**, p. 31-36, dez. 2003.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, C. E. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 58, p.25-40, 2000.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v.9, p.615-629, 2006.

SENIOR, M. L.; CHIN, E. C. L.; LEE, M.; SMITH, J. S. C.; STUBER, C. W. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GenBank database: map construction. **Crop Science**, v.36, p.1676-1683, 1996.

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

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457-462, 1995.

SKELTON, P.H., **A complete guide to the freshwater fishes of South Africa**. Struik Publishers. South Africa. 2001

SCRIBNER, K. T.; MEFFE, G. K.; GROOM, M. J. Conservation Genetics: the use and importance of genetic information. In: GROOM, M. J.; MEFFE, G. K.; CARROLL C. R. and Contributors. **Principles of Conservation Biology**, 3<sup>rd</sup> ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, p. 375-415, 2006.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**/editor Holos, editor. Ribeirão preto: p202. 2001.

STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M. AND PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature** 365:274-276. 1993.

STRASSMAN, J. E.; SOLÍS, C. R.; PETERS, J., M.; QUELLER, D. C. Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite *loci* for studies of genetic relatedness and pedigrees. In: FERRARIS, J. & PALUMBI, S. R. (eds.), **Molecular Zoology**, Willey, New York, p. 163-180, 1996.

TAGGART, J. B.; HYNES, R. A.; PRODOHL, P. A.; FERGUSON, A. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 40, p.963-965, 1992.

TAUTZ, D. Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.6464-6471, 1989.

TEICHERT-CODDINGTON, D. R.; GREEN, B. W. Experimental and commercial culture of tilapia in Honduras. In: COSTA-PIERCE, B.A. & RACOCY, J. E. (eds.) **Tilapia Aquaculture in the Americas**, Vol. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States, p. 142-162, 1997.

TREWAVAS, E. Taxonomy and Speciation. In: PULLIN, R. S. V. & McCONNEL, R. H. (eds) The Biology and culture of tilapias. **ICLARM Conference Proceedings 7, International Center for Living Aquatic Resources Management**, Manila, Philippines. 1982. 432 p.

WATANABE, W. O.; OLLA, B. L.; WICKLUND, R. I.; HEAD, W. D. Saltwater culture of Florida red tilapia and other-tolerant tilapias: a review. Pages 54-141. In: COSTA-

PIERCE, B. A. & ROKOCY, J. E. (eds.) **Tilapia Aquaculture in Americas**, Vol. 1 World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States, p. 54-141, 1997.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lawrence, v.38, p.1358-1370, 1984.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKY, J. A.; TINGEY, S. V. DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. **Nucleic Acids Reaserch**, v. 18, p.6531-6535, 1990.

WIRTH, T.; BERNATCHEZ, L. Genetic evidence against panmixia in the European eel. **Nature**, v. 409, p. 1037-1040, 2001.

WHITFIELD, A.K. and BLABER, S.J.M. The distribution of the freshwater *cichlid* *Sarotherodon mossambicus* in estuarine systems. **Environ. Biol. Fishes** 4(1): 77-81. 1979.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann Eugen** 15: 323–354.1951.

WRIGHT, S., The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p.219-234, 1965.

WRIGHT, J. W. A simplified design for combined provenance and progeny testing. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 27, n. 2, p. 68-70, 1978.

YAPI-GNAORÉ, C. V.; KOUASSI, N. C.; ASSEMIEN, O. S.; OTÉMÉ, Z. J. **Capacity (human and institutional) for developing and managing genetically improved strains of tilapia in Africa**, including brood stock management and quarantine. Nairobi, Kenya. (In press), 2002.

VAN DER MHEEN, H. W. Review of introduction and translocation of aquatic species in the Limpopo River system and regional co-operation for policy development. **ALCOM Report**, n.25, 37p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/008/ad791e/ad791e00.htm>>. Acesso em: 7 out. 2009.

VILA, C., MALDONADO, J.E., and WAYNE, R.K., Phylogenetic Relationships, Evolution and Genetic Diversity of the Domestic Dog. **The American Genetic Association**, v.90, p.71-77, 1997.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZAUBER, M. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprint. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

WON Y. J.; WANG, Y.; SIVASUNDAR, A.; RAINCROW, J.; HEY, J. Nuclear Gene Variation and Molecular Dating of the Cichlid Species Flock of Lake Malawi. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n.4, p.828-837, 2006.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p.1-16, 2002.

ZHANG, X.G.; TONG, J.G.; TONG XIONG. Applications of microsatellite markers in studies of genetics and breeding of fish. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology** 3(2); 83–87,2006



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)