DNAr 5S

Um novo marcador molecular para análise genética de tilápias

Fotografias e ilustrações cedidas pelos autores

Fernanda Antunes Alves - Costa
Mestre em Genética, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-Universidade Estadual Paulista, Telefone/Fax: (14) 3811 6264, fa_alves2003@yahoo.com.br

Cesar Martins
Doutor em Genética e Evolução, Professor Assistente do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-Universidade Estadual Paulista, Telefone/Fax: (14) 3811 6264, cmartins@ibb.unesp.br

Resumo

Os recentes avanços da genética têm permitido um salto tecnológico na aqüicultura mundial, especialmente, pela utilização dos estudos de DNA para determinação de variabilidade genética dentro e entre linhagens de peixes, para identificação de parentais e para formulação de mapas genéticos úteis na identificação de genes ou seqüências de DNA, ligadas a características de valor econômico. Estes tipos de análises podem ser aplicados ao melhoramento dos estoques e linhagens, levando a incrementos significativos na produção. Embora diversas regiões do genoma vem sendo exploradas como marcas nas análises genéticas, a identificação de novos marcadores ainda se faz necessária. Dessa forma, foram objetivos deste estudo analisar a potencialidade da aplicação das seqüências de DNA ribossomal 5S como marcadores para estudos genéticos nos peixes, utilizando como modelo espécies de tilápias de ampla utilização no setor produtivo.

Introdução

As tilápias representam os primeiros peixes utilizados para criação em cativeiro no mundo – ilustrações de tumbas do Egito sugerem que a tilápia vem sendo criada há mais de três mil anos (Popma e Masser, 1999). As tilápias pertencem à família Cichlidae que ocorrem, predominantemente, nos lagos africanos. Os ciclídeos africanos têm representado um excelente modelo de estudos, pois além de apresentarem uma história evolutiva bastante peculiar, que levou ao surgimento de uma grande diversidade de formas e comportamentos, muitas espécies (como as tilápias, por exemplo) apresentam enorme importância na aqüicultura mundial, especialmente em regiões onde há uma carência crônica de proteína animal (Kocher, 2004).

Algumas características das tilápias fazem delas extremamente favoráveis para a aqüicultura: alimentam-se de uma ampla variedade de organismos e aceitam, muito bem, qualquer tipo de alimento; são relativamente robustas e resistentes a doenças; possuem tolerância a baixos níveis de oxigênio e baixas temperaturas e possuem rápido crescimento, tornando-se sexualmente maturas e comercializáveis aos 4-8 meses (Boscolo et al., 2001). Ao lado de sua importância econômica, as tilápias representam também, um excelente animal de laboratório. Uma das características mais intrigantes deste grupo é sua agressividade, apresentando um comportamento territorialista, o que permite amplos estudos na área de etologia (Kocher, 2004). Algumas espécies de tilápia protegem a prole na cavidade bucal, podendo reproduzir-se em condições de cativeiro durante todo o ano, desde que a temperatura da água não fique abaixo de 22ºC. Além disso, seus ovos podem ser facilmente incubados de maneira artificial (Zimmermann, 1999).

Embora cerca de 70 espécies de ciclídeos recebam a denominação de "tilápia", somente *Oreochromis niloticus, Oreochromis mossambicus, Oreochromis aureus, Tilapia rendalli* e seus híbridos têm grande importância na aqüicultura mundial

(Stickney, 1997). Atualmente, as tilápias representam o segundo grupo de peixes mais amplamente produzido no mundo (o primeiro é representado por espécies de carpas). A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Figura 1) é uma espécie nativa do Norte da África, que foi introduzida em vários outros continentes, especialmente na América, onde sua produção anual excede 1.000.000 toneladas. Neste cenário, o Brasil tem contribuído com uma ínfima parcela de 0.2% em relação à produção mundial e de 5% em relação à produção americana, equivalendo a um total de, aproximadamente, 50 mil toneladas/ano (Kubtiza, 2003).

Figura 1: Exemplar de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Tailandesa

A partir de uma única introdução de tilápia do Nilo no nordeste brasileiro, na década de 70, diversas linhagens foram desenvolvidas e sua criação disseminada entre os estados brasileiros (Lovshin, 2000). Embora a produção de tilápias fosse inicialmente vista com bastante desconfiança pelos aqüicultores, aos poucos este peixe foi conquistando seu espaço, provando ser de grande potencial para criação e comercialização. Nas décadas seguintes, a produção se fixou, cresceu e novas linhagens foram trazidas para o território nacional, entre elas a Tailandesa ou Chitralada, em 1996 (Zimmermann, 1999) e, mais recentemente, a Genomar Supreme, em 2002 (Zimmermann, 2003), que promete ganhos significativos na produção quando comparada com as demais linhagens. Atualmente, os tilapicultores nacionais têm almejado a conquista do mercado externo e, ainda, têm se preocupado com a busca da competição igualitária com outros países produtores de tradição no mercado. Desse modo, há grande expectativa e incentivo ao desenvolvimento de novos métodos que induzam ao aumento da produtividade e à diminuição dos custos de produção.

A chegada da tecnologia tailandesa de reprodução em tanques-rede e incubação artificial de ovos e embriões têm aumentado não apenas a produtividade, mas também, a possibilidade de controle sobre o processo de reversão sexual, aumentando a eficiência do processo de alevinagem, tanto no sentido da sobrevivência quanto na proporção de machos revertidos (Zimmermann, 1999). No entanto, em muitas tilapiculturas do país, as práticas em aqüicultura têm inadvertidamente diminuído a variabilidade genética presente nos estoques de produção, pela seleção e acasalamento de indivíduos aparentados ou pelo uso de um pequeno número de indivíduos como reprodutores, aumentando grandemente a probabilidade de endocruzamentos. Dessa forma, um manejo adequado assistido por análises genéticas podem contribuir grandemente para o progresso da aqüicultura no Brasil.

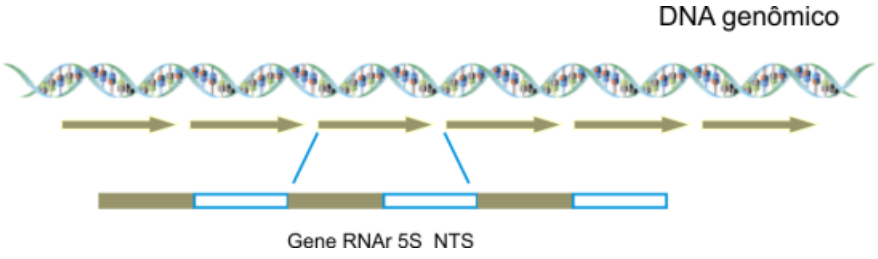

Figura 2: Esquema da organização em tandem do DNAr 5S no genoma dos eucariotos

Estudos genéticos em tilápias

As linhagens domesticadas da tilápia do Nilo utilizadas em todo o mundo sofrem de um empobrecimento genético, oriundo de práticas sucessivas de endocruzamentos; e as linhagens de melhor performance são aquelas isoladas mais recentemente da natureza. Da mesma forma, durante os anos consecutivos às primeiras introduções de tilápia do Nilo no Brasil, foram desenvolvidas novas linhagens provenientes de cruzamentos híbridos entre as linhagens importadas e, também, entre a tilápia do Nilo e outras espécies de tilápia. Como resultado, o produtor enfrenta um grave problema relacionado à incerteza quanto à origem dos animais que vêm sendo utilizados para produção e ao empobrecimento genético que gera indivíduos com performance reduzida no crescimento e pouca resistência a doenças, afetando grandemente a produção. Além disso, a questão da manutenção da variabilidade genética dos estoques, que está diretamente associada à produtividade, muitas vezes, não recebe a valorização que merece. Uma outra dificuldade enfrentada pelos produtores relaciona-se à identificação eficiente de espécies, subespécies e linhagens de tilápias, e ao estabelecimento de parentesco genético entre os estoques.

Para isso, os estudos voltados à caracterização genética dos estoques de criação e espécies podem ser de extrema valia na solução dos problemas de identificação de linhagens e subespécies deste peixe, bem como, podem ser um instrumento útil no estabelecimento de possíveis

relacionamentos genéticos entre os diversos estoques e, também, na determinação dos níveis de variação genética existente em estoques particulares de cultivo.

Uma ferramenta bastante expressiva, que se mostra promissora no processo de identificação de indivíduos, linhagens, híbridos e espécies, são os marcadores de DNA (Martins et al., 2002b). Estes marcadores fornecem "marcas genéticas" que, dependendo do tipo de análise, podem ser utilizadas como marcas para uma espécie, linhagem, estoque ou mesmo um indivíduo. Além disso, as marcas genéticas podem ser relacionadas a alguma característica de interesse econômico como maior crescimento e resistência às doenças. De posse destas marcas, os pesquisadores podem realizar análises dos níveis de variação genética de estoques, cruzamentos dirigidos, objetivando aumento da variabilidade genética, identificação da origem e pureza de linhagens e produção de linhagens unissexuais. Para a tilápia nilótica existem vários trabalhos abordando o uso de marcadores genéticos baseados em microssatélites (Harris et al., 1991, Kellogg et al., 1995; Lee e Kocher, 1996, Yue e Orban, 2002), RAPD (Bardakci e Skibinski,1994) e análises de restrição enzimática (Seyoum e Kornfield, 1992). Essas técnicas requerem materiais e equipamentos custosos e mão-de-obra altamente qualificada, tanto para o seu desenvolvimento quanto para sua análise. Um dos marcadores de DNA mais utilizados ultimamente nos laboratórios de análises genéticas são os microssatélites, os quais mostram eficientemente níveis de variação genética dentro de um estoque de criação. Porém este tipo de marcador requer um conhecimento inicial de segmentos do genoma da espécie de interesse que envolve a construção de bibliotecas genômicas e de primers específicos, tornando a técnica trabalhosa e dispendiosa. Dessa forma, embora diversos marcadores de DNA já foram desenvolvidos e aplicados nas análises genéticas envolvendo a tilápia do Nilo, a busca por novos marcadores ainda é necessária para aumentar o espectro de cobertura de análise do genoma.

O DNA ribossomal 5S como marcador molecular

Seqüências de DNA ribossônico 5S (DNAr 5S) têm-se mostrado de grande aplicabilidade como um marcador genético para identificação de espécies, híbridos e estoques de diversas espécies de vertebrados, em especial para peixes de interesse econômico como o salmão e a truta (Pendás et al., 1995; Carrera et al., 2000). O DNA 5S apresenta-se repetido de centenas a milhares de vezes no genoma, formando uma família multigênica que é responsável pela codificação do RNA ribossômico 5S (RNAr 5S). Cada repetição do DNAr 5S contém uma região conservada de 120 pares de base (pb), que codifica o RNAr 5S, e um segmento de DNA espaçador não transcrito (NTS) altamente variável (Figura 2). Tais repetições apresentam um dinamismo bastante intenso no genoma e a ausência de pressão de seleção sobre os NTSs permite que estes segmentos de DNA sofram mutações em taxas bastante elevadas. Isto faz dos NTSs excelentes marcadores na identificação de diferenças entre entidades biológicas que divergiram recentemente na sua história evolutiva. O uso das repetições do DNAr 5S apresenta algumas vantagens sobre os demais marcadores disponíveis, pois a presença de seqüências codificantes, conservadas, flanqueando regiões variáveis dos NTSs, favorecem a aplicação da

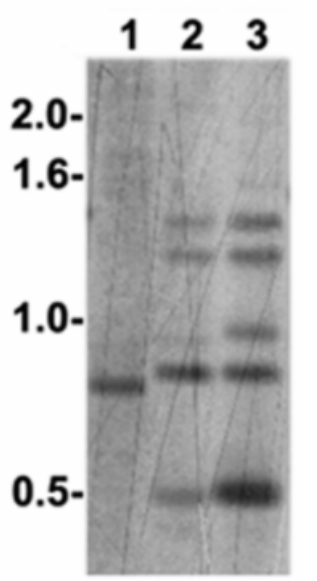

Figura 3: Hibridação de DNA imobilizado em membrana com sonda de DNAr 5S em duas espécies e em um híbrido de tilápias: (1) *Tilapia rendalli* (2), híbrido *O. urolepis x O. mossambicus* e (3) *O. niloticus*. Marcadores de peso molecular em kilo base são mostrados à esquerda da figura

técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e, conseqüentemente, o isolamento dos NTSs das mais diferentes espécies sem um conhecimento prévio do genoma da espécie em questão (Martins e Wasko, 2004).

Assim, a análise do DNAr 5S mostra-se mais simples e menos custosa, sendo necessário somente a aplicação da PCR e análises eletroforéticas dos produtos da amplificação, o que torna este marcador mais

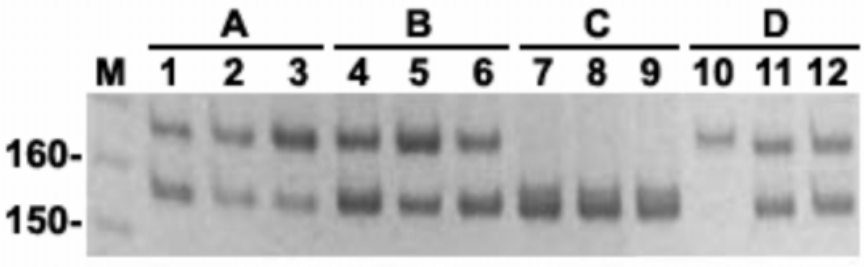

Figura 4: Eletroforese mostrando os produtos de PCR do NTS do DNAr 5S de amostras de quatro diferentes linhagens de tilápia do Nilo cultivadas no Brasil: (A) Cesp, (B) Pernambuco, (C) Chitralada e (D) Santa Catarina. Marcadores de peso molecular em pb são mostrados à esquerda da figura (M)

Figura 5: Seqüência nucleotídica dos fragmentos de 155 e 165 pb dos NTSs da tilápia do Nilo. A diferença de tamanho entre os dois fragmentos identificados deve-se à presença de microrepetições CA presentes no NTS (em destaque)

acessível. Os resultados apresentados em trabalhos abordando o uso das seqüências de DNAr 5S com o marcador genético para distinção de espécies relacionadas, híbridos e estoques de criação, são bastante promissores. Um estudo desenvolvido para salmão do Atlântico (*Salmo salar*), truta marrom (*Salmo truta*) e seus híbridos, usando a PCR e primers específicos, para amplificar as unidades repetitivas do DNAr 5S, mostrou, após análise de eletroferese em gel de agarose, diferenças notórias no tamanho dos produtos da amplificação, enquanto os híbridos apresentaram produtos de tamanhos intermediários (Pendás et al., 1995). Tal diferenciação foi corroborada num estudo de identificação de espécies de peixes defumados, o qual mostrou padrões específicos de bandamento para o salmão (*S. salar*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e pargo (*Brama raii*) (Carrera et al., 2000). Padrões espécie-específicos de bandamento também foram observados nas análises dos produtos de PCR de DNAr 5S das espécies do gênero *Brycon* (matrinchãs, piracanjubas, pirapitingas e piabanhas) (Wasko et al., 2001).

Trabalhos prévios têm demonstrado um intenso dinamismo das seqüências de DNAr 5S no genoma da tilápia do Nilo (Martins et al., 2000, 2002a), sugerindo que estas seqüências representam fontes promissoras de variações na identificação de eventos evolutivos recentes ocorridos nas espécies. Dessa forma, no presente trabalho, seqüências de DNA ribossomal 5S foram analisadas objetivando estimar a sua potencialidade como marcadores genéticos para espécies de tilápias. As análises foram conduzidas em diversas linhagens da espécie de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), na espécie tilápia rendali (*Tilapia rendalli*) e no híbrido tilápia vermelha (*O. mossambicus x O. hornorum*).

Material biológico e metodologia empregada

Amostras de DNA foram obtidas a partir de pequenos segmentos de nadadeiras coletados diretamente a partir dos organismos vivos e fixados imediatamente em álcool 100%. A biópsia de pequenos segmentos de nadadeiras não causa estresse ou qualquer outro tipo de dano ao animal, representando dessa forma, um método não evasivo de coleta de tecido extremamente eficiente.

As análises foram conduzidas em diversas linhagens da espécie de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), na espécie tilápia rendali (*Tilapia rendalli*) e no híbrido tilápia vermelha (*O. mossambicus x O. hornorum*). Foram obtidas amostras de 170 indivíduos referentes a quatro diferentes linhagens de tilápia do Nilo: linhagem CESP, procedente de Barra Bonita (SP), linhagem Chitralada, importada pela ALEVINOPAR do Paraná, de Toledo (PR), linhagem de Santa Catarina, procedente da Fundação Municipal "25 de Julho", de Joinville (SC) e linhagem Pernambuco, obtida da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Departamento de Engenharia de Pesca), Recife (PE). Também foram obtidos exemplares de outras espécies de tilápia, tais como: cinco indivíduos de *Tilapia rendalli*, provenientes da Fazenda Araucária (Londrina, Paraná) e do Rio Tietê (Anhembi, São Paulo); e oito indivíduos híbridos entre *O. urolepis hornorum* x *O. mossambicus,* provenientes da piscicultura Tole-Peixes (Toledo, Paraná).

O procedimento para extração do DNA seguiu o protocolo descrito por Wasko et al. (2003). Aproximadamente 200mg de nadadeiras foram segmentadas em pequenos pedaços com auxílio de uma tesoura e submetidos a 4ml de tampão de digestão TNES (10mM Tris-HCl, pH 8.0; 125 mM NaCl; 10mM EDTA, pH 8.0; 0,5% SDS e 4M uréia) e 30µl de RNase (10mg/ml), os quais permaneceram incubados a 42º C por uma hora e, em seguida, 30µl de Proteinase K (10mg/ml) foram adicionados. A solução foi mantida, na mesma temperatura, por mais dez horas. Após esse período, o DNA foi isolado pela adição de mais 4 ml (mesmo volume da solução de digestão) de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) nos tubos, os quais, após, foram invertidos durante 15 minutos e, então, centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos. Depois, a fase superior aquosa foi separada e o DNA foi precipitado em 1M de NaCl e dois volumes de etanol 100% gelado. Finalmente, o DNA foi recuperado por centrifugação a 10.000 rpm e secado em estufa a 37º C. O DNA foi ressuspendido em TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) e armazenado em freezer a –20 ºC.

Com o objetivo de determinar a organização genômica do DNAr 5S nas espécies e no híbrido em estudo, foram conduzidos experimentos de Southern-blot (Southern, 1975, com modificações) e hibridação em

Freqüência dos genótipos dos NTSs (%)

Genótipos/linhagem	NTSg1	NTSg2	NTSg3
CESP	0	0	100
Pernambuco	0	5.88	94.12
Santa Catarina	2.94	2.94	94.12
Chitralada	1.66	83.33	15

Tabela 1: Freqüência dos padrões de bandas dos NTSs presentes entre os diferentes estoques de tilápia do Nilo analisados

membrana. Amostras de DNA referentes às duas espécies de tilápias estudadas (*Oreochromis niloticus, Tilapia rendalli*) e do híbrido (*O. urolepis hornorum* x *O. mossambicus*), foram digeridas totalmente pelas endonucleases de restrição *Hind*III, *Sac*I, *Sca*I, *Pst*I e *Pvu*II. Estas enzimas foram selecionadas com base no seu padrão de restrição em relação ao DNAr 5S previamente determinado para *O. niloticus* (Martins et al., 2002a). Após a digestão as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% e a eletroforese foi realizada em baixa voltagem (~50 Voltz). O DNA digerido e separado no gel de agarose foi transferido por capilaridade para uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Bioscience). A membrana carregada com o DNA digerido foi submetida à hibridação com sondas contendo segmentos do DNAr 5S da espécie *O. niloticus*. As sondas foram marcadas por compostos quimioluminescentes, utilizando o kit *ECL direct nucleic acid labelling and detection system* (Amersham Bioscience) e os sinais de hibridação foram revelados em filme de raio-X, utilizando revelador Dektol (Kodak).

Através da análise de seqüências prévias do DNAr 5S da tilápia do Nilo (Martins et al., 2002a), foi desenhado o conjunto de primers - NTSIIA (5'-CTG CTG CTG TCT CTG TTT GTG-3') e NTSIIB (5'-TGT ATG CTG AAG CTA AAG CTG-3') - para amplificação de segmentos específicos dos NTSs do DNAr 5S desta espécie. Os produtos das amplificações foram analisados em gel de agarose 1% e poliacrilamida 6%.

Resultados e Discussão

A análise do DNAr 5S nas diferentes espécies de tilápias, através de *Southern blot* e hibridações em membrana, possibilitou a distinção genética das diferentes espécies de tilápias analisadas, bem como, contribuiu para a melhor compreensão da organização genômica dessas seqüências e da possível relação evolutiva existente entre as amostras de tilápias (Figura 3). A espécie *T. rendalli* mostrou um padrão bem diferente das demais amostras, as quais evidenciaram bandas com tamanhos bastante similares. A diferença evidente entre as amostras do híbrido e de *O. niloticus* foi a presença de uma banda de aproximadamente 1000 pb nesta última e ausente no híbrido. Estes resultados relacionam-se a proximidade evolutiva existente entre estes dois organismos, ou seja, eles pertencem ao mesmo gênero – *Oreochromis*. Os dados também permitem inferir uma menor complexidade de organização do DNAr 5S no genoma de *T. rendalli*, pois a hibridação revelou uma única banda, diferentemente das demais amostras que exibiram várias bandas. Isto indica que as repetições de DNAr 5S apresentam uma maior diversidade de cópias e arranjos no genoma do gênero *Oreochromis* em relação ao gênero *Tilapia*. Dessa forma, as análises de hibridação em membrana indicam que o DNAr 5S apresenta padrões de organização que permitem distinguir espécies de tilápias.

Através das amplificações por PCR de um segmento interno do NTS do DNAr 5S de diferentes linhagens da tilápia do Nilo, foi possível distinguir três padrões de bandas entre os indivíduos analisados (Figura 4): (i) presença de uma única banda de aproximadamente 165 pb, denominado de genótipo NTSg1; (ii) presença de uma única banda de aproximadamente 155 pb, denominado de genótipo NTSg2; (iii) presença de duas bandas de aproximadamente 155 e 165 pb, denominado de genótipo NTSg3. A análise destas bandas nas diferentes linhagens de tilápia do Nilo em cultivo no país permitiu verificar que as linhagens provenientes da primeira introdução nacional (CESP, Pernambuco, Santa Catarina), ocorrida em 1970, apresentaram freqüências distintas de genótipos quando comparadas com a linhagem proveniente da segunda introdução (Chitralada) no país, ocorrida em 1996, (Figura 4 e Tabela 1). Os indivíduos da linhagem CESP, por exemplo, apresentaram o genótipo NTSg3 em 100% dos seus indivíduos e os das linhagens Pernambuco e Santa Catarina apresentaram 94.12% de freqüência para o genótipo NTSg3. A linhagem Chitralada apresentou 83.66% do genótipo NTSg2.

A clonagem e o seqüenciamento das bandas de 155 e 165 pb permitiram definir a seqüência nucleotídica destes fragmentos de DNA e identificar a origem da variação detectada (Figura 5). A diferença de tamanho nos fragmentos deve-se à presença de um microsatélite CA que se encontra expandido no fragmento maior e retraído no fragmento menor. A presença de microsatélites nos NTSs mostra que estas regiões são governadas por intensas taxas evolutivas.

De forma geral, as análises do DNAr 5S possibilitaram distinguir

espécies e linhagens de tilápias em cultivo no Brasil. As variações apresentadas pelos NTSs da tilápia do Nilo além de mostrarem-se úteis na identificação das linhagens, mostram-se promissoras também na análise dos níveis de variação existente dentro de estoques específicos de cultivo. Neste sentido, a exploração do microsatélite CA mostra-se promissora para este tipo de análise, pois se trata de uma região com taxas evolutivas extremamente elevadas. Estes resultados atestam o DNAr 5S como marcador para estudos genéticos nas tilápias.

Referências

Bardakci, F., Skibinski, D. O. F. Aplication of RAPD thechniques in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, v.37, p. 117-23, 1994.

Boscolo, W. R., Hayashi, C., Soares, C. M., Furuya, W. M., Meurer, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1391-6, 2001.

Carrera, E., García, T., Céspedes, A., González, I., Fernández, L. M. A., Hernández, P. E., Martín, R. Differentiation of smoked *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* and *Brama raii* using the nuclear marker 5S rDNA. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 35, p. 401-6, 2000.

Harris, A. S., Bieger, S., Doyle, R. W., Wright, J. M. Dna Fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 92, p. 157-63. 1991.

Kellogg, K. A., Markert, J. A., Stauffer, J. R., Kocher, T. D. Microsatellite variation demonstrates multiple paternity in lekking cichlid fishes from lake Malawi, Africa. **Proc. R. Soc. Lond. B**., v. 260, p. 79-84, 1995.

Kocher, T. D., Adaptative evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. **Nature**, v. 5, p. 288-98, 2004.

Kubitza, F. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercados. **Panorama da Aqüicultura**. março/abril, p. 25-35, 2003.

Lee, W. –J., Kocher, T. D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, v. 49, p. 169-71, 1996.

Lovshin, L. L. Tilapia culture in Brazil. In: Costa-Pierce, A., Rakocy, J. E. (Eds). **A Tilapia Aquaculture in the Americas**. Louisiana : The World Aquaculture Society, Baton Rouge, p. 133-40. 2000.

Martins, C., Wasko, A. P., Oliveira, C., Wright, J. M. Nucleotid sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiini cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. **Hereditas**, v. 133, p. 39-46, 2000.

Martins, C., Wasko, A. P., Oliveira, C., Porto-Foresti, F., Parise-Maltempi, P. P., Wright, J. M., Foresti, F. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. **Cytogenetic and Genome Research,** v. 98, p. 78-85, 2002a.

Martins, C., Porto-Foresti, F., Wasko, A. P., Oliveira, C., Foresti, F. Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 28, p. 12-15, 2002b.

Martins, C., Wasko, A. P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams, C. R. (ed). **Focus and genome research**. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2004. p. 289-318.

Pendas, A. M., Móran, P., Martínez, J. L., Garcia-Vásquez, E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brow trout and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. **Molecular Ecology,** v. 4, p. 275-6, 1995.

Popma, T., Masser, M. Tilapia life history and biology. **SRAC Publication**, no. 283, p.1999.

Seyoum, S., Kornfield, I. Identification of the subspecies of *Oreochromis niloticus* (Piesces: Ciclhidae) using restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. **Aquaculture**, v. 102, p. 29-39, 1992.

Stickney, R. R. Tilapia update 1996**.** World **Aquaculture**, v. 28, p. 20-5, 1997.

Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 503-17, 1975.

Wasko, A P., Martins, C., Wright, J. M., Galetti Jr, P. M. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome**, v. 44, p. 893-902, 2001.

Wasko, A P., Martins, C., Oliveira, C., Foresti, F. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. **Hereditas**, v. 138, p. 161-5, 2003

Yue, G. H., Orban, L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 99-100, 2002.

Zimmermann, S. Incubação Artificial: técnica que permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. **Panorama da Aqüicultura**, julho/agosto, p. 15-21, 1999.

Zimmermann, S. Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. **Panorama da Aqüicultura,** março/abril, p.69, 2003.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CAUNESP (Centro de Aqüicultura da UNESP), às fazendas e pisciculturas do Paraná (Fazenda Araucária, Londrina/PR e Piscicultura Tole-Peixes, Toledo/PR) e aos Veterinários Carlos Roberto Moreira e Adelaide Marina Schaedler da SEAB/PR (Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná) pelas amostras de tilápias fornecidas.