

**VERIFICAÇÃO DA PUREZA DE LINHAGENS DAS TILÁPIAS DE ZANZIBAR, *Oreochromis hornorum* (TREW.), E DO NILO, *Oreochromis niloticus* (L., 1766), ATRAVÉS DA ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM ACETATO DE CELULOSE.**

**Luiz Augusto Ortiz<sup>1</sup>  
José William Bezerra e Silva<sup>2</sup>  
José Raimundo Bastos<sup>3</sup>  
Henrique José Mascarenhas dos Santos Costa<sup>4</sup>**

**RESUMO**

Testou-se o grau de pureza de linhagens das tilápias de Zanzibar, *Oreochromis hornorum* (TREW.), e do Nilo *Oreochromis niloticus* (L., 1766), mantidas na Estação de Piscicultura "Raimundo Saraiva da Costa" (Fortaleza, Ceará, Brasil) através da caracterização bioquímica, encontrando-se os perfis das frações protéicas do músculo branco. O estudo abrange 30 exemplares de cada uma das espécies supracitadas e 30 do híbrido obtido por cruzamento de machos de *Oreochromis hornorum* x fêmeas de *Oreochromis niloticus*, feitos em tanque de 48 m<sup>2</sup>. manteve-se as linhagens puras em tanques isolados, cobertos com tela de náilon, milimetrada. os peixes foram sacrificados, obtidos extratos da parte branca do músculo, elaborados na proporção de 1:1, em água destilada. As corridas eletroforéticas foram feitas em fitas de acetato de celulose, a 300 Volts, durante 30 minutos, em tampão Barbitone-Sódio, pH 8,6 e força iônica 0,1. Dos eletroferogramas concluiu-se o seguinte: (a) perfis com considerável consistência, mostrando diferenças claras entre as duas espécies e o híbrido, o que atesta a pureza das linhagens de *O. hornorum* e *O. niloticus*, estudadas; (b) todos os indivíduos apresentaram duas bandas de proteínas, sendo a primeira intensamente corada e a segunda com intensidade decrescente para híbrido, tilápia de Zanzibar e tilápia do Nilo; (c) menor deslocamento na tilápia do Nilo e mobilidade semelhante para a tilápia de Zanzibar e o híbrido; (d) não houve variação para machos e fêmeas; e (e) não houve diferenças nos perfis eletroforéticos das duas espécies e do híbrido em relação aos estágios da maturação gonadal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tilápia do Nilo, tilápia de Zanzibar, híbrido de tilápia, eletroforese, piscicultura, peixe, tilapicultura.

<sup>1</sup> Engenheiro de Pesca;

<sup>2</sup> Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC e Bolsista do CNPq;

<sup>3</sup> Professor aposentado do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC;

<sup>4</sup> Engenheiro de Pesca da UFC/Departamento de Engenharia de Pesca.

**SUMMARY**

VERIFICATION OF THE PURITY OF STRAINS OF ZANZIBAR TILAPIA, *Oreochromis hornorum* (TREW.), AND NILE TILAPIA, *Oreochromis niloticus* (L., 1766) THROUGH THE PROTEIN ELECTROPHORESE ANALYSES ON THE CELLULOSE ACETATE.

The study was conducted in the "Raimundo Saraiva da Costa" Fisheries hatchery Station, at Fortaleza, Ceará, Brazil. It consisted in determining the degree of purity of the strains of Zanzibar and Nile tilapias by determination of protein fractions in white muscle of the fish. A total of 60 tilapias were use in the test - 30 of *O. niloticus* and 30 hybrids from the cross between *O. hornorum*, male x *O. niloticus*, female. Electrophoresis analysis revealed that: a) profiles with remarkable consistency, showing well-marked differences between the two species and the hybrid, that indicates the degree of purity of the strains of *O. hornorum* and *O. niloticus* studied; b) all individuals showed two protein bands: the first, colored strongly; the color in the second band, decreased as follows: hybrids, Zanzibar tilapias and Nile tilapia, respectively; c) low band mobility was observed in the Nile tilapia film, while this amount of mobility, was similar in magnitude to the Zanzibar tilapia and the hybrids; d) no variations were observed between males and females fish; e) no differences were found related to gonadal stages of the sexual maturity in electrophoretic profiles between the two fish species and the hybrids.

**KEY WORDS:** Fish, fishculture, Nile tilapia, Zanzibar tilapia, hybrid of tilapia, electrophoresis.

**INTRODUÇÃO**

Tilápias são por demais criadas, intensiva e extensivamente, no Brasil. mercê de sua rusticidade, bom crescimento em condições controladas, boa qualidade da carne e elevados rendimentos de proteína por ha. No entanto, apresentam problemas de reprodução intensa e desordenada, quan-

do em cultura pura, que leva à superpopulação, mormente em viveiros, ocorrendo indivíduos de tamanhos heterogêneos, atrofiados e de baixo valor comercial (BARD<sup>4</sup>). Isto devido a precocidade, rusticidade, proteção às proles e frequências de desovas (BAROILLER et al<sup>5</sup>).

Por isso, nos cultivos semi-intensivos e intensivos utilizam-se somente machos (SILVA<sup>14</sup>), obtidos por sexagem manual (BARD<sup>4</sup>), hibridação (CARNEIRO SOBRINHO et al<sup>7</sup>) e reversão de sexo, com tratamento hormonal ou manipulação de cromossomos (PANDIAN et al<sup>13</sup>).

A obtenção de híbridos interespecíficos ou intergenéricos 100% machos se mostra eficiente para tilápias (PANDIAN et al<sup>13</sup>; CARNEIRO SOBRINHO et al<sup>7</sup>; SILVA<sup>14</sup>), desde que sejam utilizadas linhagens puras nos cruzamentos. Este é o problema, vez que o híbrido macho da geração F1 é fértil e retrocruza com fêmeas das espécies que lhe originaram, resultando proles de ambos os sexos. Assim, a infiltração acidental (falha humana, transporte por pássaros, deficiências nas instalações e outras causas) de híbridos nos plantéis de reprodutores e reprodutrices das espécies utilizadas nos cruzamentos (linhagens puras), é possível de ocorrer nas instalações comerciais de médio e grande portes (AVTALION<sup>1</sup>). Isto requer o controle sistemático das linhagens puras, a fim de eliminar híbridos nos cruzamentos. Contudo, a diferenciação pode ser difícil ou impossível, usando-se somente critérios morfométricos ou merísticos, como no caso do cruzamento de machos de **Oreochromis aureus** x fêmeas de **Oreochromis niloticus**, em caráter comercial em Israel (AVTALION<sup>1</sup>).

A sistemática tem usado procedimentos bioquímicos para investigar a uniformidade das espécies, pois dentro da estrutura da molécula das proteínas se encontram informações genéticas úteis às investigações filogenéticas (TSUYUKI et al<sup>15</sup>). Um desses procedimentos é a eletroforese de proteínas, em que uma atração elétrica é usada para separar diferencialmente proteínas do músculo. Isto acontece porque cada proteína difere na estrutura, tamanho e, principal-

mente, porque as moléculas diferem na sua carga elétrica livre. Segundo LANE et al<sup>11</sup>, as diferentes propriedades das proteínas determinam sua migração na direção dos eletrodos, em taxas diferentes.

A eletroforese em gel de amido ou em gel de poliácridamida tem se mostrado particularmente conveniente e o resultado dos estudos é, geralmente, complementar às investigações morfométricas. Uma vez estabelecido que os padrões eletroforéticos do miogênio do músculo ou as proteínas do sangue são características variáveis e específicas para cada espécie, estes métodos são aplicáveis a problemas de caracterização de espécies e híbridos, como demonstrado em trabalhos com salmonídeos (TSUYUKI et al<sup>15</sup>).

Aquela metodologia tem sido usada nos últimos anos, para estudos genéticos, utilizando-se, geralmente, enzimas como marcadores genéticos, nos mais variados gêneros e famílias, como **Sarotherodon** (AVTALION<sup>3</sup>); **Anabantidae** (DEGANI et al<sup>8</sup>) e **Tilapia** (HINES et al<sup>9,10</sup>; AVTALION<sup>1,2,3</sup>).

Outra metodologia rápida, simples e não muito cara, porém sem alta definição, é a eletroforese em fitas de poliácetato de celulose, aplicada às proteínas do músculo branco, solúveis em água (LANE et al<sup>11</sup>). Este método substitui aquele efetuado em gel de amido, pela **Food and Drug administration**, USA, para determinar se existe substituição de espécies em produtos pesqueiros processados, como filés e blocos, difíceis ou impossíveis de identificação por outros processos. Tem sido usado, também em trabalhos científicos, para identificação de peixes (BASTOS et al<sup>6</sup>).

Em novembro de 1971 foram trazidos, da Costa do Marfim, África, exemplares puros das tilápias do Nilo e de Zanzibar, sendo as mesmas mantidas no Centro de Pesquisas Ictiológicas Rodolpho von Ihering<sup>7</sup> (Pentecoste, Ceará, Brasil), pertencente ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS). Contudo, nos últimos anos não foram realizadas hibridações e, conseqüentemente, não se conhecia o estado genético das espécies, no que se refere a pureza das linhagens. Em

1990, exemplares das duas espécies foram trazidos para a Estação de Piscicultura "Raimundo Saraiva da Costa" (Fortaleza, Ceará, Brasil), onde são mantidos, separadamente, em tanques cobertos com tela de náilon, milimetrada, e abastecidos com água da Companhia de Água e Esgoto de Fortaleza (CAGECE), sem nenhum perigo de contaminação das espécies, através de cruzamentos.

Dada a procura de linhagens puras de *O. hornorum* e *O. niloticus*, para a produção de híbridos 100% machos e o desejo, por parte do Departamento de Engenharia de pesca, em produzi-los, surgiu a necessidade de se testar o grau de pureza daquelas linhagens, através de cruzamento de machos da tilápia de Zanzibar x fêmeas da tilápia do Nilo, com posterior caracterização bioquímica das espécies puras, isoladamente, e do híbrido, geração F1, encontrando-se perfis das frações protéicas do músculo branco.

## MATERIAL E MÉTODOS

Na obtenção do híbrido usou-se 4 machos de *O. hornorum*, com peso médio de 75,0 g e 2 fêmeas de *O. niloticus*, pesando 62,5 g, em média. todos retirados dos tanques de linhagens puras (Estação de Piscicultura "Raimundo Saraiva da Costa"). A seleção e sexagem dos peixes foram feitas segundo CARNEIRO SOBRINHO et al<sup>7</sup>, cuidando-se para que as fêmeas não conduzissem ovos ou larvas na boca. A proporção de machos e fêmeas nos cruzamentos seguiu recomendações de CARNEIRO SOBRINHO et al<sup>7</sup>; BARD<sup>4</sup>; SILVA<sup>14</sup>.

Os cruzamentos (hibridação) foram feitos num tanque de 48 m<sup>2</sup>, isolado e abastecido com água da CAGECE, localizado na Estação de Piscicultura supracitada. A proporção foi de 1 peixe/3m<sup>2</sup>. As tilápias foram alimentadas com dieta balanceada, comercial para galináceos, na base de 3% da biomassa/dia. A ração foi reajustada mensalmente.

Observados alevinos no tanque de hibridação, usou-se rede de arrasto, feita em náilon e malhas de 1 cm, para capturá-los, sendo eles estocados em tanque de 3 m<sup>2</sup>, da mesma Estação. Aqui eles foram alimenta-

dos com dieta balanceada, comercial para pintos. Ao atingirem 20 g, os peixinhos foram sexados, segundo BARD<sup>4</sup>, obtendo-se somente machos. Ao completar 75 dias do acasamento, reprodutores e reprodutrices foram separados, dando-se por encerrado o ciclo de hibridação.

Retirou-se, aleatoriamente, dos tanques de linhagens puras, 30 exemplares da tilápia de Zanzibar e 30 da do nilo, sem diferenciação de sexo ou de estágio de maturação gonadal, estocando-os, separadamente, em tanques de 3 m<sup>2</sup>. Também obteve-se, ao acaso, 30 exemplares do híbrido referido no parágrafo anterior, os quais foram esticados em tanque de 3 m<sup>2</sup>. Todos os peixes acima foram alimentados com dieta comercial para pintos, na base de 5% da biomassa/dia. Ao atingirem 100 g, os 90 peixes supracitados foram sacrificados e filetados, separando-se a carne branca dos músculos. Esta foi macerada em água destilada, proporção de 1:1, homogeneizado e filtrado em papel de filtro. Submeteu-se o filtrado a diálise contra água destilada, em membrana de celulose, por 24 horas e a 8°C, usando agitador magnético. Finalmente, o extrato foi estocado em frasco de vidro a -10°C, até a aplicação da eletroforese.

As corridas de eletroforeses foram procedidas em cuba marca TECNOW, modelo ARGUS 12, sendo que em cada canaleta colocou-se 75 ml do tampão BARBITONE-SÓDIO, com pH 8,6 e força iônica 0,1 (MANUAL OXOID12). Como suporte, usou-se fitas de acetato de celulose, previamente mergulhadas no tampão BARBITONE-SÓDIO, por 10 minutos, sendo o excesso deste removido com papel-filtro comum, e aquelas distendidas, em número de 4, na ponte da cuba, de modo que as duas extremidades ficassem mergulhadas no tampão. A aplicação do extrato foi em duplicata, usando-se macroaplicador da TECNOW.

A cuba foi ligada na corrente elétrica, a 300 Volts, durante 30 minutos. Fidos estes, as fitas foram retiradas daquela e submersas em ácido tricloracético, a 5%, em 5 minutos. Após isto, procedeu-se a coloração das fitas com negro de amido, durante 10 minutos. Na seqüência, fez-se a descoloração, até obten-

ção de fitas brancas, sendo destacadas apenas as bandas de proteína.

A transparentização foi feita submergindo-se as fitas em solução de metanol, ácido acético e glicerina e glicerina, durante 5 minutos. Em seguida, elas foram distendidas em placa de viro e levadas à estufa, numa temperatura de 70°C, até completa transparentização.

Para obtenção dos perfis de proteína, procedeu-se a densimetria do eletroferograma, para cada espécie e o híbrido, utilizando-se DENSÍMETRO INTEGRADOR AUTOMÁTICO DE ELETROFORESE ARGUS7.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Por sexagem constatou-se que os híbridos produzidos eram 100% machos, sugere-

rindo a pureza das linhagens de *O. homorum* e *O. Niloticus* testadas e os cuidados para evitar a contaminação têm sido eficientes.

O número de indivíduos estudados permitiu a obtenção de perfis eletroforéticos de considerável consistência e de clara diferenciação, das espécies entre si e do híbrido (Figura 1). Para isto, verificou-se o número de bandas, no que se refere a diferentes deslocamentos e intensidade de coloração das mesmas (TSUYUKI et al<sup>15</sup>), observado diretamente nas fitas ou com auxílio de gráfico densimétrico. não se encontrou variações entre machos e fêmeas das tilápias de Zanzibar e do Nilo. Também os diferentes estágios de maturação gonadal dos peixes não motivaram mudanças nos perfis eletroforéticos, para as duas espécies e o híbrido, em concordância com as conclusões de TSUYUKI et al<sup>15</sup>.

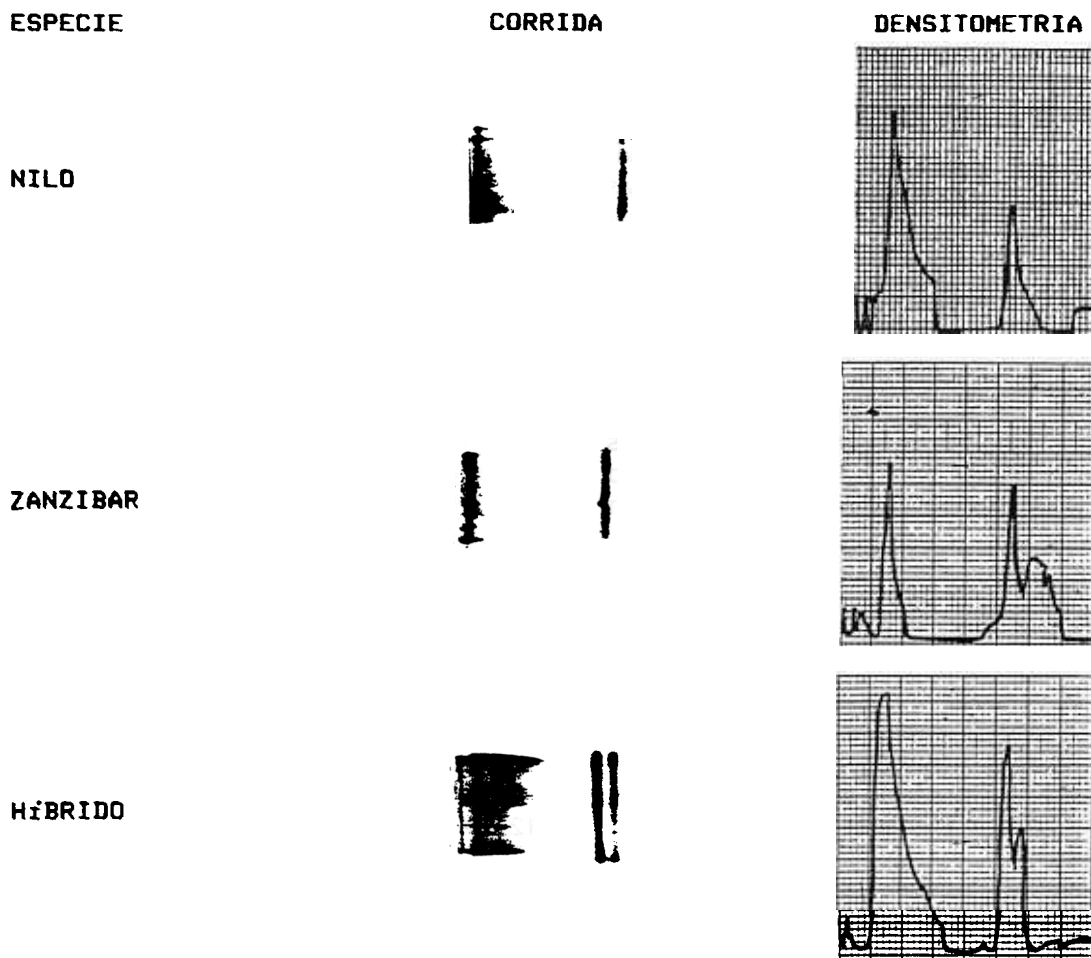


Figura 1 - Perfis da Eletroforese das proteínas do musculo das tilápias do Nilo, de Zanzibar e seu híbrido correspondente

Todos os peixes estudados apresentaram duas bandas eletroforéticas, considerando-se a primeira a de menor deslocamento, as espécies puras e o híbrido apresentaram-na intensamente corada e a segunda com intensidade decrescente para o híbrido, tilápia de Zanzibar e tilápia do Nilo (Figura 1). Observa-se que a intensidade da segunda banda para o híbrido é menor do que a da primeira.

Quanto ao deslocamento das bandas eletroforéticas, em *O. Niloticus* foi menor, enquanto que para *O. hornorum* e o híbrido houve semelhança (Figura 1).

Os diagramas obtidos no densitômetro confirmam as observações feitas nas fitas.

## CONCLUSÕES

A obtenção de híbridos 100% machos sugere que as linhagens de *O. Hornorum* e *O. Niloticus*, mantidas na Estação de Piscicultura "Raimundo Saraiva da Costa", pertencente a UFC/Centro de Ciências Agrárias, mantêm-se puras. Isto foi corroborado pelos perfis eletroforéticos com considerável consistência, sendo que todos os indivíduos analisados apresentaram duas bandas de proteínas, a primeira intensamente corada e a segunda com intensidade decrescente para híbrido, tilápia de Zanzibar e tilápia do Nilo. Observou-se, também, menor deslocamento das bandas para esta última espécie e mobilidade semelhante para o híbrido e a tilápia do Nilo.

Finalmente, variações nos perfis eletroforéticos para machos e fêmeas não foram observadas, o mesmo aconteceu com os estágios de maturação gonadal dos peixes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AVTALION, R.R. **Determination of allogeneic and xenogeneic markers in the genus of Tilapia: 1 Identification of sex and hybrids in Tilapia by electrophoretic analysis of sérum protein.** *Bamidgeh, Telaviv*, 27(1): 8-11, 1975.
2. AVTALION, R.R. **Electrophoresis and immunoelectrophoresis of sera from some known F1 Hybrids of Tilapia.** *Bamidgeh, Telaviv*, 23(4): 117-123, 1975.
3. AVTALION, R. R. **Genetic markers in Sarotherodon and their use for sex and species identification.** In: r. Pullinn e Lowe-Mc Connell eds./*The Biology and Culture of Tilapias. ICLARM- Conference proceedings* 7 : 269-277 p., 1982.
4. BARD, J. **Desenvolvimento da piscicultura intensiva da tilápia macho no Nordeste.** *Centre Tehnique Forestier Tropical, Nogentsur-Mame*, 24p., 1976.
5. BAROILLER, J. F.; JALABERT, B. **Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilápia.** *Aquatic Living Resources*, 2 : 105-116, 1989.
6. BASTOS, J.R. et al. **Eletroforese de proteínas do músculo de peixes do gênero Lutjanus (Bloch).** *Arq. Cien. Mar. Fortaleza*, 15 (1) : 49-51, 1975.
7. CARNEIRO SOBRINHO, A. et al. **Considerações sobre a obtenção de híbridos machos das tilápias Sarotherodon hornorum (machos) e Sarotherodon niloticus (fêmeas).** *DNOCS/DIPIS, Fortaleza*, 7p., 1979.
8. DEGANI, G.; VEITH, M. **Electrophoretic variations of isozyme systems in the muscle and liver of Anabantidae fish.** *Bamidgeh, Telaviv*, 42 (3) : 67-71, 1975.
9. HINES, R.; YASHOUV, A. **Differences in the electrophoretic mobility of the hemoglobins of Tilapia aurea, Tilapia vulcani and their hybrid cross.** *Bamidgeh, Telaviv*, 23 (2) : 53-55, 1975.
10. HINES, R.; YASHOUV, A. **Preliminary studies of muscle protein polymorphism occurring within the genus Tilapia.** *Bamidgeh, Telaviv*, 22 (3) : 60-71, 1970.
11. LANE, J. Et al. **Identification of species in raw processed fishery products by means of cellulose polyacetate strip electrophoresis.** *Commercial Fisheries Review*, 28 (3) : 10-13, 1966.
12. MANUAL OXOID. **The Oxoid manual of culture Media ingredients and other laboratory Services. Third Edition (Revised), London**, 1973.
13. PANDIAN, T. J.; VARADARAJ, K. **Technique to produce 100% male**

- tilapia. The ICLARM Quaterly, Naga 13 (3) : 3-5, 1977.**
14. **SILVA, J. W .B. E. Recursos pesqueiros de águas interiores do Brasil, especial-mente do Nordeste. MINTER/DNOCS, Fortaleza, 98p., 1981.**
15. **TSUYUKI, H.; ROBERTS, E. Zone electrophoretic comparison of muscle myogens and blood proteins of artificial hybrids of salmonidae with their parental species. fisheries research board of Canada, 22(3): 767-773, 1955.**