

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

GENÉTICA POPULACIONAL E MELHORAMENTO DE
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Autora: Vanessa Lewandowski
Orientador: Lauro Daniel Vargas Mendez

MARINGÁ
Estado do Paraná
Maio - 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

GENÉTICA POPULACIONAL E MELHORAMENTO DE
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Autora: Vanessa Lewandowski
Orientador: Lauro Daniel Vargas Mendez

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Maio – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

L669g Lewandowski, Vanessa
Genética populacional e melhoramento de Zebrafish
(*Danio rerio*) / Vanessa Lewandowski. -- Maringá,
2018.
xiii, 50 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Lauro Daniel Vargas-Mendez.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, 2018.

1. Eclodibilidade - Reprodução. 2. Melhoramento
genético - Zebrafish. 3. Herdabilidade. 4. Modelo
animal - Zebrafish. 5. Variabilidade genética -
Zebrafish. 6. Reprodução - Zebrafish. I. Vargas-
Mendez, Lauro Daniel, orient. II. Universidade
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 21.ed. 639.3748

Ana Maria Marquezini Alvarenga -CRB9/442



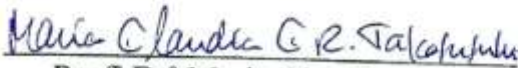
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS


GENÉTICA POPULACIONAL E MELHORAMENTO
DE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

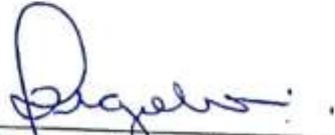
Autora: Vanessa Lewandowski
Presidente: Prof. Dr. Carlos Antonio Lopes de Oliveira

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 08 de maio de 2018.


Prof.ª Dr.ª Maria Claudia Colla
Ruyolo Takasusuki


Prof.ª Dr.ª Stefania Caroline
Claudino da Silva


Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon


Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera
Barrero


Prof. Dr. Carlos Antonio Lopes de Oliveira
Presidente

*“Faça o seu melhor, na condição que você tem, enquanto não pode fazer melhor
ainda.”*

(Mário Sergio Cortella)

Aos meus pais, Euclides e Sônia Lewandowski,
pelo apoio e por me ensinarem a lutar pelos meus objetivos.

Aos meus irmãos Jackson e Mateus Lewandowski,
pelo carinho e amizade.

Ao meu esposo César Sary,
por me apoiar nos momentos mais difíceis durante a realização do meu
doutorado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que iluminou meu caminho durante esta jornada.

Aos meus pais e irmãos que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu esposo Cesar, que de forma especial e carinho me deu força e coragem, me apoiando nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Lauro Vargas e ao professor Ricardo Ribeiro, pelo apoio, atenção e ensinamentos.

Ao professor Carlos Antonio Lopes de Oliveira, pela paciência, apoio, ensinamentos e especialmente por aceitar presidir a banca de defesa desta Tese.

A Jaisa Casetta, pela amizade e auxílio na execução do projeto.

Aos demais amigos e colegas do Grupo de Pesquisa PeixeGen, pelos momentos de alegria e pelo companheirismo nos momentos mais difíceis.

BIOGRAFIA

Vanessa Lewandowski, filha de Euclides e Sônia Lewandowski, nasceu em 19 de junho de 1990.

Em fevereiro de 2007, iniciou o Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, campus Toledo e finalizou em dezembro de 2012.

Em março de 2013, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca e Recursos Pesqueiros, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, campus Toledo, finalizando em fevereiro de 2015.

Em março de 2015, iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá, na área de concentração Produção Animal. Realizou a defesa da Tese de Doutorado em maio de 2018.

ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
Modelos animais	1
<i>Zebrafish (Danio rerio) como modelo animal</i>	2
Polimorfismo e genética de populações	6
<i>Marcadores moleculares microsatélites</i>	9
Melhoramento genético	10
Referências	13
II – OBJETIVOS GERAIS.....	18
III - GENETIC VARIABILITY AND REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF ZEBRAFISH STOCKS*	19
Abstract	19
Introduction	19
Material and methods	20
<i>Ethics committee</i>	20
<i>Animals and research locations</i>	21
<i>Analysis of genetic variability and structure</i>	21
<i>Evaluation of reproductive performance</i>	23
<i>Statistical analyses</i>	23
Results	24
<i>Genetic variability analysis</i>	24
<i>Evaluation of reproductive performance</i>	28

Discussion	29
<i>Genetic variability</i>	29
<i>Reproductive performance</i>	31
Conclusion	32
Acknowledgments	32
References	32
IV - ZEBRAFISH BREEDING PROGRAM: GENETIC PARAMETERS ESTIMATES FOR GROWTH TRAITS*	36
Abstract	36
Introduction	36
Materials and methods	38
<i>Ethics Committee</i>	38
<i>Genetic breeding program</i>	38
<i>Family production and data collection</i>	38
<i>Evaluation of quantitative genetic parameters</i>	40
Results	41
<i>Descriptive statistics</i>	41
<i>Genetic parameters</i>	42
Discussion	43
<i>Descriptive statistics</i>	43
<i>Genetic parameters</i>	44
Conclusion	45
Acknowledgments	Erro! Indicador não definido.
References	46
V – CONSIDERAÇÕES FINAIS	49

LISTA DE TABELAS

III - GENETIC VARIABILITY AND REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF ZEBRAFISH STOCKS

Páginas

Table 1 - Sequence of primers used in the DNA amplification	22
Table 2. Genetic diversity measurements at six microsatellite loci of six zebrafish stocks	25
Table 3. Value of the Fis inbreeding coefficient between the different loci and stocks of zebrafish.....	26
Table 4. Estimates of genetic differentiation (Fst) among the six stocks of zebrafish...	26
Table 5. Descriptive statistics of the reproductive parameters of zebrafish stocks	28

IV - ESTIMATION OF THE GENETIC PARAMETERS OF ZEBRAFISH IN A BREEDING PROGRAM

Páginas

Tabela 1. General information on the evaluated generations	40
Tabela 2. Description of effects tested on different models and DIC values	41
Tabela 3. Descriptive statistics of collected information	42
Tabela 4. Means and standard deviations of the genetic parameters of the best models for G1 and G1G2.....	43

LISTA DE FIGURAS

III - GENETIC VARIABILITY AND REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF ZEBRAFISH STOCKS

Páginas

FIG. 1. Maps of zebrafish stocks source.....	21
FIG. 2. Dendrogram of genetic identity between zebrafish stocks.....	27
FIG. 3. Assignment test for zebrafish individuals from six populations (K = 5), being represented by the colored vertical bars. The same color in different populations indicates that they belong to the same group. Different colors in the same bar indicate the percentage shared with each group. In the Y axis are the values of Q: coefficient of individual participation in a given group, and in the X-axis, populations (1=SP-1; 2=MG; 3=SP-2; 4=SP-3; 5=PR and 6=SP-4).....	27
FIG. 4. Total number of eggs and hatchability of zebrafish stocks.....	28
FIG. 5. Average number of eggs spawned and spawning frequency of zebrafish stocks.....	29

IV - ESTIMATION OF THE GENETIC PARAMETERS OF ZEBRAFISH IN A BREEDING PROGRAM

Páginas

FIG.1. Scheme of the productive cycle to obtain the families from the nucleus of the genetic improvement program.....	39
--	----

RESUMO

O zebrafish é um modelo animal consolidado na pesquisa, sendo empregado em diversas finalidades e áreas científicas. Em muitos casos, os exemplares utilizados são provenientes de lojas de animais, podendo resultar em alta variabilidade genética e fenotípica entre e dentro dos estoques mantidos em laboratórios. O melhoramento genético é uma forma de obter indivíduos com características fenotípicas específicas, por meio de ação conjunta de seleção e acasalamento, sendo importante ferramenta na produção de linhagens de diferentes espécies. Com o presente trabalho, objetivou-se verificar a variabilidade genética de seis estoques de zebrafish adquiridos de pisciculturas de três Estados da Federação (São Paulo, Paraná e Minas Gerais) e avaliar suas características reprodutivas. Além disso, pretendeu-se determinar um critério de seleção e estimar os parâmetros genéticos de duas gerações de zebrafish em um programa de melhoramento genético. Para variabilidade genética, foram avaliados a heterozigosidade observada e esperada, equilíbrio de Hardy-Weinberg, índice de fixação Fis e Fst, além de plotar um dendrograma de Nei. Verificou-se que alguns estoques apresentavam menores valores de heterozigosidade observada e conseqüentemente maior valor do Fis, constituindo em indivíduos mais endogâmicos. Houve desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os estoques avaliados. Verificou-se diferenciação entre as populações demonstrados pelo Fst, sendo visualizado a formação de quatro grupos distintos através do dendrograma de Nei. As características reprodutivas foram avaliadas durante seis semanas, com intervalo de oito dias entre os acasalamentos. Foram verificados a frequência de desova, eclodibilidade e o número médio e total de ovos por fêmea e estoque, respectivamente. A eclodibilidade foi a variável que apresentou maior diferenciação entre os estoques, com valores menores para aqueles com maiores valores de Fis. Para estimação dos parâmetros genéticos foram utilizadas informações duas

gerações de zebrafish produzidas em um programa de melhoramento genético tendo como objetivo a produção de indivíduos maiores. Foram considerados os seis estoques como populações fundadoras. A coleta de dados foi realizada quando os animais atingiram seis meses de idade, sendo escriturados dados de comprimento total, peso, sexo, idade, densidade na fase larval e identificação das famílias. As variáveis repostas consideradas foram o peso e o comprimento total, sendo este escolhido como critério de seleção, por apresentar maior herdabilidade. Verificou-se que os indivíduos da segunda geração apresentaram maior valor de peso, comprimento total e menor efeito de família. A herdabilidade para comprimento total obtida foi mediana, sendo de 0,26 quando considerada as informações das duas gerações. Dessa forma, populações de zebrafish diferenciam-se geneticamente e fenotipicamente entre si, o que pode influenciar na obtenção de resultados em pesquisas científicas e o melhoramento genético pode ser empregado a fim de obter exemplares maiores, mais homogêneos fenotipicamente e geneticamente, possibilitando maior eficiência na utilização do zebrafish como modelo animal.

Palavras-chave: Eclodibilidade, efeito comum de família, herdabilidade, modelo animal, variabilidade genética, reprodução

ABSTRACT

Zebrafish is a consolidated animal model in research, being used with various purposes and in scientific areas. In many cases, the specimens are from animal stores, which may result in high genetic and phenotypic variability between and within stocks kept in laboratories. Genetic improvement is a way to obtain individuals with specific phenotypic characteristics, through joint selection and mating, being an important tool in the lineage production of different species. The objective of this study was to verify the genetic variability of six zebrafish stocks acquired from fish farms in three Brazilian States (São Paulo, Paraná and Minas Gerais) and to evaluate their reproductive characteristics. In addition, it was intended to determine a selection criterion and to estimate the genetic parameters of two zebrafish generations in a genetic improvement program. For genetic variability, there were evaluated the observed heterozygosity expected, Hardy-Weinberg equilibrium, index F_{st} and F_{is} , and plot a Nei dendrogram was plotted. It was verified that some stocks had lower values of observed heterozygosity and consequently higher F_{is} value, constituting in individuals more inbred. There was a deviation in the Hardy-Weinberg equilibrium in all evaluated stocks. Differentiation between the populations demonstrated by the F_{st} was observed, and the formation of four distinct groups was visualized through the Nei dendrogram. The reproductive traits were evaluated for six weeks, with an interval of eight days between mating. There were verified, the spawning frequency, hatchability and mean and total number of eggs per female and population, respectively. The hatchability was the variable that presented greater differentiation between the stocks, with smaller values for those with higher F_{is} values. For the genetic parameters estimation, there were, used information from two generations of zebrafish produced in a genetic improvement program with the objective of producing larger individuals. The six stocks were considered as base populations. Data collection was

performed when the animals reached six months of age, and were recorded the total length, weight, sex, age, larval stage density and families identification. The answers variables considered were weight and total length, which is chosen as a selection criterion, due to its higher heritability. It was verified that the second generation of individuals presented higher weight, total length and lower family effect. The heritability obtained for total length was median, being 0.26 when considered the two generations information. Thus, zebrafish populations differ genetically and phenotypically among themselves, which may influence results in scientific research then genetic improvement can be employed in order to obtain larger and more homogenous phenotypically and genetically allowing greater efficiency in zebrafish use as an animal model.

Key words: Hatchability, common family effect, heritability, animal model, genetic variability, reproduction.

I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Modelos animais

Os modelos animais são espécies que podem ser utilizados em avaliações de efeitos biológicos e comportamentais, produzindo resultados que podem ser transcritos aos seres humanos.¹ Inúmeros avanços observados em diferentes áreas científicas, favorecendo a vida humana, só foram possibilitados por meio da utilização de modelos animais como instrumento de pesquisa.² Segundo os mesmos autores, um modelo animal ideal deve apresentar semelhança genética e fisiológica, bem como ser eficaz quanto às respostas patológicas e farmacológicas com características fenotípicas análogas às observadas no organismo humano.

Além disso, a escolha de um modelo animal deve levar em consideração aspectos como padronização, repetibilidade, precisão de respostas avaliadas, sobrevivência da prole, disponibilidade, facilidade de manutenção em laboratório e disponibilização de amostras biológicas.³ As espécies *Rattus norvegicus* (ratos), *Mus musculus domesticus* (camundongos), *Drosophila melanogaster* (Mosca da fruta), *Danio rerio* (Zebrafish), *Caenorhabditis elegans* (Nemátode) e *Canis familiaris* (Cães) constituem os tradicionais modelos biomédicos utilizados.³ Segundo Stewart *et al.*⁴ os animais primatas não humanos possuem maior semelhança genética com o seres humanos, sendo de 95 a 98%, seguindo dos cães (85-90%), camundongos e ratos (75-80), zebrafish (70%), mosca da fruta (60%) e nematoide (40%)

A uniformidade dos indivíduos é um requisito importante para realização de estudos científicos, a fim de obter respostas mais verdadeiras em relação às variáveis avaliadas,

bem como diminuir a amostragem necessária.⁵ Nesse sentido, a constituição genética dos exemplares exerce um papel fundamental na padronização dos resultados pretendidos.

Os animais de laboratório são classificados em não consanguíneos ou heterogêneos e consanguíneos ou isogênicos, sendo que os heterogêneos geneticamente são obtidos pelos cruzamentos de indivíduos ao acaso, enquanto os isogênicos resultam do acasalamento de animais consanguíneos durante várias gerações.⁵ Os exemplares homogêneos geneticamente são bastante utilizados, pois como apresentam alta semelhança genotípica, permitem maior e melhor mensuração das variáveis as quais estão submetidos, representando uma condição quase ideal para análise de processos fisiológicos complexos incluindo praticamente todas as doenças humanas.⁶

Essa homogeneidade reflete em resultados mais consistentes, exigindo assim menos indivíduos para demonstrar um efeito específico.⁷ Nesse sentido, Beck *et al.*⁸ relatam que em acasalamentos consanguíneos, após 20 gerações, os ratos apresentam um percentual de 98,6% de homozigotos, sendo que muitas linhas endogâmicas são criadas para fenótipos específicos.

Com o avanço da tecnologia, houve a possibilidade de otimizar ainda mais o uso de animais de laboratório, pela formação de linhagens híbridas e de animais modificados geneticamente, como os transgênicos. Os animais híbridos são provenientes do cruzamento entre duas linhagens consanguíneas, sendo a prole constituída de indivíduos homogêneos e com heterozigotos para aqueles genes em que as linhagens parentais diferem entre si.⁵ A produção de animais transgênicos ocorre pela introdução (ou exclusão) de material genético funcional, geralmente por meio de microinjeção de DNA no núcleo de ovócitos fertilizados.⁹

Zebrafish (Danio rerio) como modelo animal

O peixe de água doce *Danio rerio* conhecido popularmente como zebrafish tem se destacado como modelo animal. O primeiro trabalho publicado referente ao seu uso é datado na década de 1930¹⁰ e somente no decorrer da década de 1980, quando foram iniciados os estudos na área de genética molecular, o zebrafish começou a ganhar notoriedade.¹¹

No entanto, sua utilização como ferramenta de estudo teve elevado crescimento somente a partir dos anos 2000, especialmente nas áreas de desenvolvimento

embrionário, biomedicina, neurofisiologia e genética.¹² Conforme pesquisa realizada na base de dados PubMed, as publicações utilizando esse modelo animal mais do que dobraram entre o período de 2004 a 2014, sendo que em 2004 representou apenas 7% dos estudos realizados com modelos animais, enquanto em 2014 esse valor subiu para 15%, com crescimento maior do que qualquer outro modelo biomédico.⁴

O destaque do zebrafish como modelo animal é pelo fato de possuir 71% dos genes codificadores de proteínas relacionados com genes encontrados nos seres humanos¹³ e 81% dos genes humanos causadores de doenças apresentam pelo menos um gene órtologo no zebrafish.¹¹ O projeto de sequenciamento do seu genoma foi iniciado em 2001 no Wellcome Trust Sanger Institute no Reino Unido e finalizado no ano de 2013, resultando na constatação que esse modelo animal apresenta 26 206 genes codificadores de proteínas, mais do que ratos, humanos e frangos.^{11,14} Pesquisadores consideram que esse alto valor é consequência do evento de duplicação do genoma ocorrido nos teleósteos há mais de 300 milhões de anos.¹⁵

Além da genética, o zebrafish apresenta características que favorecem sua produção e que auxiliaram no estabelecimento e popularidade de seu uso como ferramenta de pesquisa. Dentre os atributos, destacam-se a alta fecundidade com geração de grande número de prole, rápido desenvolvimento e transparência dos embriões e larvas, robustez, tolerância a várias condições ambientais e baixo custo para mantê-lo em ambientes laboratoriais.¹⁶⁻¹⁸

O zebrafish é encontrado naturalmente no sul e sudeste da Ásia, ao redor dos rios Ganges e Brahmaputra.¹⁹ Caracteriza-se por habitar águas rasas e lentas, às margens de córregos e valas, particularmente adjacentes a campos de arroz.²⁰ Como modelo de pesquisa, o zebrafish é encontrado em vários laboratórios ao redor do mundo,²¹ sendo que os cinco principais países de estudo são Estados Unidos, Alemanha, Inglaterra, Japão e China.¹²

Seu tempo de vida geralmente varia de três a cinco anos,²² sendo classificado em três estágios de desenvolvimento: fase larval, juvenil e adulto. A fase larval compreende desde a eclosão no 3º dia após a fertilização (dpf) até 30 dpf, quando são classificados como juvenis.⁴ A partir dos três meses são considerados adultos, e a partir de dois anos de idade, inicia-se o processo de envelhecimento quando são verificadas mudanças cognitivas, refletidas em diminuição da velocidade de aprendizagem, aumento da senescência, menor prolificidade, diminuição da capacidade generativa e dos ritmos circadianos.²²⁻²⁵

Apesar do zebrafish ser amplamente estudado, algumas questões de manejo e produção básicas ainda permanecem sem respostas, mesmo que vários protocolos de produção estejam disponíveis, muitas situações rotineiras de cultivo ainda não foram avaliadas cientificamente. Nesse sentido, destaca-se que as condições laboratoriais são imprescindíveis para boa manutenção e reprodução dos exemplares em cativeiro.

O sucesso da reprodução do zebrafish em cativeiro é totalmente dependente da temperatura da água (26-28°C) e do fotoperíodo, com ciclo claro-escuro de 14-10h.¹⁹ O fotoperíodo exerce papel fundamental nesse processo, uma vez que na natureza, os peixes acasalam ao amanhecer, sendo que em condições laboratoriais, esse fenômeno é representado pelo início da iluminação artificial.¹⁹

As fêmeas produzem grande número de ovos, podendo apresentar frequência de desova semanal, com liberação de 200 a 700 ovos.²⁶ Os embriões são transparentes, favorecendo os estudos relacionados à embriologia, uma vez que eles são acessíveis à manipulação e podem ser monitorados em todos os estádios de desenvolvimento sob microscopia ótica.²⁶

Além disso, os embriões apresentam desenvolvimento rápido, e os principais órgãos são formados em até 24 horas após a fertilização.²⁷ Da mesma forma, é possível realizar o acompanhamento do desenvolvimento larval no microscópio, podendo por exemplo, ser visualizado o fígado e outros órgãos internos.²⁸

Entretanto, devido ao seu pequeno tamanho, somente após 30 dias é possível iniciar a alimentação com ração de granulometria maior.²⁹ Os níveis de mortalidade na fase inicial é elevada²⁶ principalmente pelo pequeno tamanho da boca que dificulta a alimentação exógena. Devido às características de desenvolvimento, os embriões e larvas são amplamente utilizados na pesquisa, em estudos como por exemplo toxicidade,³⁰ estresse,³¹ problemas relacionados à memória,³² colesterol,³³ entre outros.

Em relação aos tipos de peixes empregados nas pesquisas, destaca-se que atualmente não há nenhuma linhagem em que todos os indivíduos são idênticos e homocigotos, como já foi descrito para ratos isogênicos.¹⁸ Em muitos estudos, geralmente são utilizados animais heterogêneos, adquiridos de pisciculturas ou de pet shops, resultando em alta diversidade genética entre os exemplares de diferentes laboratórios, tendo em vista as distintas condições geográficas e temporais.³⁴

Os exemplares adquiridos fora de ambientes laboratoriais são considerados de forma generalizada como linhagem “selvagem”, sem diferenciação em relação aos locais, bem como ausência de padrões ou critérios de classificação desses animais.²¹ Esses

exemplares podem apresentar grande diferenciação, tanto genética como comportamental de outras estirpes produzidas há muitas gerações em laboratórios. O ambiente cativo geralmente resulta em diminuição da variabilidade genética da população e valor adaptativo ou “fitness”, sendo possível que essa diferenciação entre os exemplares influencie nas características físicas, além de ter impactos sobre o comportamento e nas respostas à exposição química.³⁵

Esse fato é comprovado por estudos que demonstram a ocorrência de variação genética e comportamental entre estirpes selvagens e de diferentes linhagens produzidas em laboratórios. Essa diferenciação entre os exemplares de zebrafish empregados na pesquisa deve ser eliminada ou reduzida pelo desenvolvimento de um protocolo padrão que permita a integridade genética das linhas de laboratório em toda comunidade científica que emprega a espécie como modelo animal.³⁶

O estabelecimento e propagação de animais geneticamente uniformes e padronizados é vantajoso para uma série de aplicações amplamente utilizadas na pesquisa biomédica, e tais linhas podem ser usadas por vários laboratórios sem preocupações de que a variação no plano genético esteja confundindo os resultados. Nesse sentido, o Centro Internacional de Recursos do Zebrafish (ZIRC), formado em 1998, localizado na cidade de Oregon (EUA) tem auxiliado na disseminação de material genético para pesquisadores ao redor do mundo.³⁶ Nesse Centro, estão dispostas várias linhas que apesar de serem produzidas em laboratório por várias gerações, também são conhecidas como “selvagens” por não apresentarem nenhuma alteração artificial na estrutura genética, além de linhagens mutantes e transgênicas.³⁷

As principais linhagens “selvagens” produzidas em ambientes de pesquisa foram denominadas AB (ZDB-GENO-960809-7) e TU (ZDB-GENO-990623-3).¹⁸ A linhagem AB é proveniente do acasalamento de duas populações, denominadas A e B, adquiridos comercialmente de um pet shop na cidade de Albany, Oregon (EUA), no final dos anos 1970 e mantidos até os dias de hoje em cativeiro. A linhagem denominada TU foi obtida de um estabelecimento comercial na cidade de Tübingen, Alemanha em 1990, sendo utilizada no projeto de sequenciamento do genoma de Zebrafish.

Além dos tipos de exemplares considerados “selvagens” categorizados no ZIRC, são empregadas técnicas laboratoriais para obtenção de animais mutantes e transgênicos. Nesse sentido, a avaliação de muitas doenças é favorecida pela criação de animais transgênicos e é facilitado pela transparência de embriões e larvas, permitindo que isso seja feito em larga escala e sem a necessidade de infraestrutura ou equipamentos

sofisticados¹⁰. A técnica da transgenia por meio de injeções em ovos fertilizados resultam em células germinativas transgene com eficiência de 50 a 80%.²⁷ A clareza óptica dos embriões e larvas de zebrafish oferecem vantagem em relação a outros modelos animais como ratos, nos quais os aspectos da organogênese e patologia das doenças não podem ser examinados sem intervenções como cirurgia ou exame pós-mortem.¹⁰

Além disso, desenvolveu-se a técnica de morfolidos, em que oligonucleotídeos são injetados em embriões no estágio de um a quatro células e ligam-se ao mRNA evitando ou inibindo a tradução dos genes, resultando em proteínas não funcionais.³⁸ O efeito dos morfolidos no organismo permanece durante vários dias, permitindo o acompanhamento da função do gene no organismo vivo, e é impossibilitado em camundongos e ratos, uma vez que, esses oligonucleotídeos são rapidamente diluídos durante o desenvolvimento desses animais.²⁷

Polimorfismo e genética de populações

Uma população é definida como um grupo de indivíduos com diferentes genótipos, situados em um determinado local, em que os descendentes apresentam frequência genética proporcional aos progenitores. Uma mesma espécie pode ser dividida em várias populações isoladas reprodutivamente devido a questões físicas e biológicas, como seleção e barreiras geográficas, representando um processo fundamental da evolução, uma vez que, pode alterar a estrutura genética das populações.

A produção de animais em cativeiro resulta na formação de subpopulações, em que a estrutura genética depende da quantidade de exemplares envolvidos na formação das progênes, sendo que, quanto maior o número de reprodutores, maior será a variabilidade genético desse grupo de animais.³⁹ De forma geral, no processo de domesticação, os indivíduos que se adaptam melhor ao ambiente de cativeiro e que apresentam traços para objetivos econômicos específicos são selecionados para serem os criadores da próxima geração, resultando em prole mais uniforme e mais adaptada a um determinado conjunto de condições.^{40,41} Essa pressão seletiva sobre os animais cativos provoca alterações na frequência alélica dos diferentes genótipos existentes,⁴² fazendo com que em muitos casos, animais produzidos em cativeiro apresentem pouca variabilidade genética, e consequentemente, alta consanguinidade ou endogamia, provocando redução dos valores fenotípicos para características relacionadas à capacidade produtiva e reprodutiva.

A endogamia é resultado de acasalamentos entre indivíduos que possuem ancestrais em comum, podendo ocorrer em sistemas de produção em virtude da pressão seletiva sobre os reprodutores. O acasalamento de animais aparentados resulta em prole com menor proporção de heterozigotos em relação à diversidade alélica,⁴³ permitindo o aparecimento de fenótipos característicos de genes recessivos, os quais geralmente estão associados à diminuição de atributos econômicos da produção animal. Indivíduos endogâmicos possuem menor potencial de resposta às mudanças ambientais,⁴⁴ sendo que a perda de um único alelo em uma espécie pode reduzir substancialmente sua capacidade de adaptação.⁴⁵

Dessa forma, a variabilidade genética é um importante fator estudado em várias espécies de animais, inclusive peixes, tanto na área ecológica como em cultivo comercial. Na aquicultura, a diversidade genética pode ser intensamente reduzida em consequência de práticas ligadas à propagação dos animais, ou questões relacionadas a sobrevivência dos indivíduos na fase larval ou juvenil.⁴⁶ Isso ocorre porque muitas espécies apresentam a fase de desenvolvimento larval sensível, e eventos aleatórios podem afetar drasticamente o sucesso da criação, e torna-se um impedimento para contribuição genética desses animais na formação de novas progênes.⁴⁶ Estudos demonstram uma perda da variabilidade genética de peixes ao longo do tempo, principalmente em espécies com hábito alimentar carnívoro, e a sobrevivência da prole na fase larval é diminuída em função do canibalismo.⁴⁷

Destaca-se ainda que é imprescindível o acompanhamento genético na obtenção de exemplares destinados a programas de repovoamento de peixes, principalmente em relação aos reprodutores utilizados. Além disso, a manutenção da variabilidade é um requisito quando se trata de programas de melhoramento genético, demonstrado por estudos com diferentes animais, inclusive com tilápias e salmões, as quais são as principais espécies aquícolas produzidas utilizando esse sistema de seleção.^{48,49}

O melhoramento genético se caracteriza pela formação de uma população base pelo cruzamento de indivíduos de diferentes origens.⁵⁰ Ao implantar um programa é necessário o conhecimento das características genéticas das populações fundadoras, a fim de obter a primeira geração com genes divergentes e evitar o excesso do compartilhamento de genótipos similares.⁵¹ Nesse sistema, as chances de diminuição da variabilidade são maiores, uma vez que os animais são selecionados com base nos valores genéticos obtidos pela informação familiar.⁵²

A endogamia pode colocar em risco um esquema de melhoramento, pela diminuição da variação genética aditiva,⁵³ sendo recomendado o acasalamentos de reprodutores diferentes geneticamente, visando a obtenção de prole mais heterozigótica, permitindo a manutenção da variabilidade nas gerações seguintes. O acompanhamento da endogamia é considerado vital nesse processo a fim de obter ganhos permanentes e contínuos.⁵⁴ O progresso genético não está somente ligado na eficiência da seleção, mas também na manutenção da variabilidade.⁵⁵ Um modo de minimizar as taxas de perda da variação genética é a utilização de grande número de reprodutores, aumentando o tamanho populacional efetivo e/ou reintroduzir anualmente novos indivíduos a população.⁵⁶

Diferentes metodologias estatísticas podem ser empregadas para se medir a variabilidade genética das populações, podendo ser utilizadas em diferentes níveis hierarquicos. Essas metodologias baseiam-se na frequência e na variância dos alelos das populações,⁴³ sendo o número médio de alelos, a heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) os parâmetros mais comuns para verificar a diversidade genética. A heterozigosidade geralmente é a avaliação principal e mais completa porque é proporcional à quantidade de variância genética em um locus e se presta prontamente a considerações teóricas sobre o efeito do tamanho da população na variação genética.⁵⁷

O equilíbrio de Hardy-Weinberg é a base inicial para o estudo mais aprofundado, considerando em uma população suficientemente grande e na ausência de seleção, migração e mutação atinge o equilíbrio após uma geração de acasalamento ao acaso.⁵⁸ O desequilíbrio nas frequências alélicas com relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg é frequentemente observado em sistemas de produção comercial, devido aos efeitos da deriva genética e seleção intencional.⁵⁰

O grau de diferenciação genética de populações pode ser avaliado utilizando os índices de fixação ou estatísticas de F .⁵⁹⁻⁶² O índice de fixação F_{is} determina a estrutura dentro de uma população, indicando a probabilidade de que dois alelos sejam derivados do mesmo gene de um ancestral comum, remetendo a um coeficiente de endogamia. O F_{st} determina a diferenciação genética entre grupos de indivíduos, variando em intervalo de zero a um e dividido em quatro categorias: baixa (0,00 – 0,05), moderada (0,05-0,15), alta (0,15 – 0,25) e elevada (>0,25).

Conjuntamente ao F_{st} , é possível verificar a diferenciação de grupo de indivíduos através de análises de distância genética, a qual representa a variação entre os genes de diferentes populações ou espécies.⁶³ Dentre os vários métodos empregados para

esse cálculo, a distância padrão de Nei é a medida mais utilizada, resultando em valor linear proporcional ao tempo de divergência.⁶³ Os dados obtidos na matriz de distância genética são representados graficamente, permitindo a interpretação dos resultados com maior facilidade.

Marcadores moleculares microssatélites

Estudos sobre genética populacional aplicados tanto na biologia conservativa, como em processos produtivos foram alavancados pelo desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*),⁶⁴ que facilitou a análise de ácidos nucleicos. Essa técnica envolve a replicação de locais específicos do DNA, sendo este inicialmente submetido ao processo de desnaturação, separando-se as fitas de sua molécula, tornando-as moldes para a síntese de novas estruturas. A utilização de enzimas denominadas DNA polimerases que por serem termoestáveis, facilitaram a aplicação da técnica. A análise dos produtos da PCR é favorecida, pois são realizados vários ciclos de replicação em etapas de desnaturação, anelamento e extensão, fazendo com que o DNA aumente de forma exponencial.

Foram desenvolvidos diversos marcadores moleculares baseados na aplicação da técnica de PCR, os quais têm contribuído em processos como verificação do parentesco genético, predição de heterose e na busca por grupos heteróticos.⁶⁵ Eles podem ser classificados em duas categorias: marcadores de DNA nuclear e DNA mitocondrial.

Os microssatélites, pertencentes ao grupo de marcadores VNTRs, também conhecidos como repetições de sequências simples (SSR – *Simple sequence repeat*), emergiram como uma das escolhas mais populares para esses estudos, em parte porque eles têm o potencial de prover estimativas contemporâneas da migração, da panmixia e podem estimar a relação entre os indivíduos.⁶⁶ Estudos demonstram que os microssatélites constituem grande fração de DNA não codificante, sendo herdados de uma forma mendeliana como marcadores codominantes.⁶⁷ Suas vantagens residem no fato de serem abundantes no genoma das espécies, apresentarem alto polimorfismo e facilidade de análise via PCR.⁶⁷

Os microssatélites são repetições de um a seis nucleotídeos, sendo que um locus geralmente varia em comprimento entre cinco a 40 repetições.⁶⁶ Os níveis muito elevados de variabilidade associados aos microssatélites, a velocidade de processamento e o

potencial de isolar grande número de *loci* fornecem um sistema marcador capaz de detectar diferenças entre populações intimamente relacionadas.⁶⁸

Melhoramento genético

A produção e as características fenotípicas dos animais são resultados de fatores genéticos e ambientais. O melhoramento é constituído por um conjunto de ações seletivas associadas ao direcionamento dos acasalamentos, objetivando aumentar a frequência de genes que favorecem características fenotípicas que apresentam algum interesse ao ser humano.⁶⁹

Antes de iniciar um programa de melhoramento, algumas questões básicas e teóricas devem ser esclarecidas. Primeiramente, deve ser definido qual o objetivo da implantação do programa, quais atributos devem ser melhorados, bem como definir as características fenotípicas que serão mensuradas a fim de atingir o alvo principal do programa. A escolha do objetivo e a definição dos critérios de seleção são os principais e mais importantes pontos de decisão, devendo resultar em uma seleção eficiente em relação ao objetivo.⁷⁰ Na escolha do critério de seleção, devem ser levadas em consideração características fenotípicas que possam ser facilmente registradas e que não apresentem alto custo de verificação.⁷¹

A constituição da população base é uma das etapas mais críticas de um programa de melhoramento. A utilização de indivíduos geneticamente diferentes é fundamental, visando a diminuição da expressão de genes deletérios provocados por genótipos homocigotos.⁷² O avanço genético só é possibilitado quando houver variabilidade genética, resultando em população com alta heterozigosidade em que a seleção e o acasalamento entre indivíduos com genótipos superiores possam ser realizados para a obtenção da próxima geração.

Dessa forma, para formação da primeira geração, geralmente aplica-se a reprodução cruzada entre as populações fundadoras, visando aumentar a variação e garantir o ganho genético, produtividade e resposta a seleção a longo prazo. Assim sendo, a delimitação do tamanho da população base do programa é resultado da variabilidade dos animais, permitindo a utilização de número mínimo de reprodutores necessários a fim de obter uma prole que possa garantir o ganho genético ao longo das gerações, bem como pela

limitação das instalações de produção que estão relacionadas ao número de famílias possíveis de serem mantidas no programa.⁷³

A predição dos valores genéticos realizados pela genética quantitativa é dependente da quantidade de informação, do modelo estatístico utilizado para descrever os dados e da adequação da metodologia analítica.⁷⁴ Tais valores são previstos com base em características fenotípicas dos animais e na relação genética entre os indivíduos da população, sendo que, quanto maior a acurácia dos valores genéticos previstos, maior será o ganho genético em qualquer nível de intensidade de seleção.⁷⁵

No processo de obtenção do valor genético, é imprescindível a determinação de um modelo estatístico que descreva a informação dos dados de forma adequada, levando em consideração os efeitos genético e ambiental e suas interações, que possam influenciar na variável resposta avaliada.⁷⁶ Em algumas situações, efeitos ambientais representam importante componentes de (co)variância entre os indivíduos, como membros de uma família mantida em conjunto (efeito comum) ou referente somente ao indivíduo (efeito ambiental permanente).⁷⁶

Para isso, devem ser considerados os fatores que estão diretamente relacionados com o resultado do critério de seleção escolhido para atingir o objetivo do programa, a fim de garantir maior precisão de predição do valor genético.⁷⁶ Vários efeitos podem ser considerados, mas somente aqueles em que a ausência causaria mudanças nos parâmetros de interesse das análises devem ser mantidos no modelo.⁷⁷ Ao iniciar a análise de dados, principalmente nas primeiras gerações dos programas de melhoramento ou ao avaliar novas características de interesse, são propostos diversos modelos com diferentes efeitos, sendo escolhido aquele que apresentar melhor resultando em relação a algum método de seleção de modelo.

Os parâmetros mais importantes na avaliação dos dados são a média, desvio-padrão ou coeficiente de variação, componentes de variância (ambiental, fenotípica e genética), herdabilidade e correlações fenotípicas e genéticas entre as características consideradas.⁷¹ Segundo Oliveira *et al.*⁷⁸ a estimação acurada dos componentes de variância é fundamental para diminuir o erro na predição dos valores genéticos, os quais são utilizados na seleção de reprodutores para formação de novas gerações.

A herdabilidade é um parâmetro populacional que indica a confiabilidade em que o valor fenotípico está vinculado ao valor genético.⁵³ Quanto maior for a herdabilidade, maior será a representação da variação fenotípica decorrente do efeito aditivo dos genes.⁵³ A correlação genética expressa a ação de um gene sobre mais de uma

característica, sendo importante em situações de baixa herdabilidade e de difícil coleta de dados, possibilitando a seleção para um determinado critério com resposta em outro geneticamente correlacionado.

As avaliações genéticas são realizadas por meio de técnicas estatísticas de modelos mistos e modelo animal, utilizando a metodologia conhecida por BLUP (Melhor Predição Linear Não Viesada), desenvolvida por Henderson em 1949.⁷⁹ O modelo animal é o procedimento mais utilizado para obtenção de valores do melhoramento, uma vez que maximiza a correlação entre os valores de procriação verdadeiros e preditos, utilizando informação de todos os animais registrados na geração atual e nas gerações anteriores, bem como dados do próprio indivíduo.⁷⁹ Portanto, é imprescindível o monitoramento da genealogia do estoque no decorrer do desenvolvimento do programa, uma vez que a estimação dos parâmetros genéticos é realizada por meio da covariância fenotípica entre parentes e fatores ambientais permanentes e aleatórios.⁵³

A inferência bayesiana tem sido amplamente utilizada no melhoramento genético, na estimação de componentes de variância, parâmetros genéticos e na seleção de modelos. Esse método estatístico possibilita a utilização de informação prévia, que é incluída na análise mediante o fornecimento de uma distribuição a priori dos parâmetros a serem analisados,⁸⁰ combinando essa informação e a função de verossimilhança, originando a distribuição *a posteriori*, conjunta de todos os parâmetros.⁷⁸ Além disso, leva em conta a incerteza existente sobre todos os parâmetros do modelo.

Programas de melhoramento genético têm contribuído ao longo dos anos com a disponibilização de linhagens que resultaram no aumento da produtividade de várias espécies terrestres e aquáticas, sendo baseados pela junção da genética quantitativa e molecular. Na aquicultura, as principais linhagens produzidas são das espécies de salmão do atlântico (*Salmo salar*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), baseando-se principalmente na obtenção de animais com maior crescimento.⁸¹ Além da genética superior para determinadas características, linhagens de indivíduos geneticamente melhorados são mais adaptados a manutenção em cativeiro, promovendo vantagem no processo de produção, uma vez que, animais provindos da natureza, quando acondicionados em sistemas de cultivo, sofrem maior efeito de estresse, e diminui o bem-estar e a produtividade.

Referências

1. McGonigle P, Ruggeri B. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. *Biochem Pharmacol* 2014;87:162-171.
2. van Meer PJK, Graham ML, Schuurman H-J. The safety, efficacy and regulatory triangle in drug development: Impact for animal models and the use of animals. *Eur J Pharmacol* 2015;759:3-13.
3. Bassols A, Costa C, Eckersall PD, Osada J, Sabrià J, Tibau J. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *PROTEOMICS - Clin Appl* 2014;8:715-731.
4. Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, Kalueff A V. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci* 2014;37:264-278.
5. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirúrgica Bras* 2005;20:28-34.
6. Paigen K, Eppig JT. A mouse phenome project. *Mamm Genome* 2000;11:715-717.
7. Scholz J, LaLiberté C, van Eede M, Lerch JP, Henkelman M. Variability of brain anatomy for three common mouse strains. *Neuroimage* 2016;142:656-662.
8. Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MFW, *et al.* Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* 2000;24:23-25.
9. Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Rev Sci Tech* 2005;24:503-513.
10. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007;8:353-367.
11. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013;496:498-503.
12. Kinth P, Mahesh G, Panwar Y. Mapping of Zebrafish Research: A Global Outlook. *Zebrafish* 2013;10:510-517.
13. Vilella AJ, Severin J, Ureta-Vidal A, Heng L, Durbin R, Birney E. EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Res* 2008;19:327-335.
14. Collins JE, White S, Searle SMJ, Stemple DL. Incorporating RNA-seq data into the zebrafish Ensembl genebuild. *Genome Res* 2012;22:2067-2078.
15. Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Peer Y Van de. Genome duplication, a trait shared by 22 000 species of ray-finned fish. *Genome Res* 2003;13:382-390.
16. Adatto I, Krug L, Zon LI. The Red Light District and Its Effects on Zebrafish Reproduction. *Zebrafish* 2016;13:226-229.
17. Castranova D, Lawton A, Lawrence C, Baumann DP, Best J, Coscolla J, *et al.* The Effect of Stocking Densities on Reproductive Performance in Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 2011;8:141-146.
18. Nasiadka A, Clark MD. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR J* 2012;53:161-168.
19. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev* 2007;83:13-34.
20. Menon A. Check list – fresh water fishes of India. *Occas Pap n° 175* 1999;366:234-259.
21. Monson CA, Sadler KC. Inbreeding Depression and Outbreeding Depression Are Evident in Wild-Type Zebrafish Lines. *Zebrafish* 2010;7:189-197.
22. Kishi S, Slack BE, Uchiyama J, Zhdanova I V. Zebrafish as a Genetic Model in

- Biological and Behavioral Gerontology: Where Development Meets Aging in Vertebrates - A Mini-Review. *Gerontology* 2009;55:430-441.
23. Anchelin M, Murcia L, Alcaraz-Pérez F, García-Navarro EM, Cayuela ML. Behaviour of telomere and telomerase during aging and regeneration in zebrafish. *PLoS One* 2011;6.
 24. Yu L, Tucci V, Kishi S, Zhdanova I V. Cognitive Aging in Zebrafish. Miall C, (ed.),. *PLoS One* 2006;1:e14.
 25. Ruhl T, Jonas A, Seidel NI, Prinz N, Albayram O, Bilkei-Gorzo A, *et al.* Oxidation and Cognitive Impairment in the Aging Zebrafish. *Gerontology* 2015;62:47-57.
 26. Mizgirev I, Revskoy S. Generation of clonal zebrafish lines and transplantable hepatic tumors. *Nat Protoc* 2010;5:383-394.
 27. Santoriello C, Zon LI. Science in medicine Hooked ! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 2012;122:2337-2343.
 28. Goessling W, Sadler KC. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. *Gastroenterology* 2015;149:1361-1377.
 29. Lawrence C, Best J, James A, Maloney K. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture* 2012;368-369:103-108.
 30. Cruz FF, Leite CE, Pereira TCB, Bogo MR, Bonan CD, Battastini AMO, *et al.* Assessment of mercury chloride-induced toxicity and the relevance of P2X7 receptor activation in zebrafish larvae. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 2013;158:159-164.
 31. Davis DJ, Bryda EC, Gillespie CH, Ericsson AC. Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. *Behav Brain Res* 2016;311:219-227.
 32. Roberts AC, Bill BR, Glanzman DL. Learning and memory in zebrafish larvae. *Front Neural Circuits* 2013;7.
 33. Baek JS, Fang L, Li AC, Miller YI. Ezetimibe and Simvastatin Reduce Cholesterol Levels in Zebrafish Larvae Fed a High-Cholesterol Diet. *Cholesterol* 2012;2012:1-5.
 34. Patowary A, Purkanti R, Singh M, Chauhan R, Singh AR, Swarnkar M, *et al.* A Sequence-Based Variation Map of Zebrafish. *Zebrafish* 2013;10:15-20.
 35. Coe TS, Hamilton PB, Griffiths AM, Hodgson DJ, Wahab MA, Tyler CR. Genetic variation in strains of zebrafish (*Danio rerio*) and the implications for ecotoxicology studies. *Ecotoxicology* 2009;18:144-150.
 36. Lawrence C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 2007;269:1-20.
 37. Meyer BM, Froehlich JM, Galt NJ, Biga PR. Inbred strains of zebrafish exhibit variation in growth performance and myostatin expression following fasting. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 2013;164:1-9.
 38. Tallafuss A, Gibson D, Morcos P, Li Y, Seredick S, Eisen J, *et al.* Turning gene function ON and OFF using sense and antisense photo-morpholinos in zebrafish. *Development* 2012;139:1691-1699.
 39. Romiguier J, Gayral P, Ballenghien M, Bernard A, Cahais V, Chenuil A, *et al.* Comparative population genomics in animals uncovers the determinants of genetic diversity. *Nature* 2014;515:261-263.
 40. Osure GO, Phelps RP. Evaluation of reproductive performance and early growth of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) with different histories of domestication. *Aquaculture* 2006;253:485-494.
 41. Zenger KR, Khatkar MS, Cavanagh JAL, Hawken RJ, Raadsma HW. Genome-

- wide genetic diversity of Holstein Friesian cattle reveals new insights into Australian and global population variability, including impact of selection. *Anim Genet* 2007;38:7-14.
42. Barros EA, Brasil LH de A, Tejero JP, Delgado-Bermejo JV, Ribeiro MN. Population structure and genetic variability of the Segureña sheep breed through pedigree analysis and inbreeding effects on growth traits. *Small Rumin Res* 2017;149:128-133.
 43. Willoughby JR, Fernandez NB, Lamb MC, Ivy JA, Lacy RC, DeWoody JA. The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. *Mol Ecol* 2015;24:98-110.
 44. Langen K, Schwarzer J, Kullmann H, Bakker TCM, Thünken T. Microsatellite Support for Active Inbreeding in a Cichlid Fish. Hansson B, (ed.),. *PLoS One* 2011;6:e24689.
 45. Pinsky ML, Palumbi SR. Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. *Mol Ecol* 2014;23:29-39.
 46. Frost LA, Evans BS, Jerry DR. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 2006;261:1056-1064.
 47. Ortega-Villaizan M del M, Noguchi D, Taniguchi N. Minimization of genetic diversity loss of endangered fish species captive broodstocks by means of minimal kinship selective crossbreeding. *Aquaculture* 2011;318:239-243.
 48. Rodriguez-Rodriguez MDP, Lopera-Barrero NM, Vargas L, Albuquerque DM, Goes ES dos R, Prado OPP do, *et al.* Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microssatélites. *Pesqui Agropecuária Bras* 2013;48:1385-1393.
 49. Ponzoni RW, Khaw HL, Nguyen NH, Hamzah A. Inbreeding and effective population size in the Malaysian nucleus of the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 2010;302:42-48.
 50. Petersen RL, Garcia JE, Mello G, Liedke AM rubini, Sincero TCM, Grisard EC. Análise da diversidade genética de tilápias cultivadas no Estado de Santa Catarina (Brasil) utilizando marcadores microssatélites. *Bol do Instituto Pesca* 2012;38:313-321.
 51. Doyle RW, Perez-Enriquez R, Takagi M, Taniguchi N. Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations. *Genetica* 2001;111:291-304.
 52. Hill WG, Caballero A, Dempfle L. Prediction of response to selection within families. *Genet Sel Evol* 1996;28:379-383.
 53. Falconer D. Introdução À Genética Quantitativa. UFV, Viçosa, 1987.
 54. Domingos JA, Smith-Keune C, Jerry DR. Fate of genetic diversity within and between generations and implications for DNA parentage analysis in selective breeding of mass spawners: A case study of commercially farmed barramundi, *Lates calcarifer*. *Aquaculture* 2014;424-425:174-182.
 55. Dupont-Nivet M, Vandeputte M, Haffray P, Chevassus B. Effect of different mating designs on inbreeding, genetic variance and response to selection when applying individual selection in fish breeding programs. *Aquaculture* 2006;252:161-170.
 56. O'Reilly PT, Kozfkay CC. Use of microsatellite data and pedigree information in the genetic management of two long-term salmon conservation programs. *Rev Fish Biol Fish* 2014;24:819-848.
 57. Allendorf F, England P, Luikart G, Ritchie P, Ryman N. Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends Ecol Evol* 2008;23:327-337.

58. Altukhov Y. Population Genetics: Diversity and Stability. Harwood Academic, 1990.
59. Cockerham C, Weir B. Variance of actual inbreeding. *Theor Popul Biol* 1983;23:85-109.
60. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution (N Y)* 1965;19:395-420.
61. Wright S. The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 1951;15:323-354.
62. Weir B, Cockerham C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution (N Y)* 1984;38:1358-1370.
63. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, 1987.
64. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
65. Cruz CD, Ferreira FM, Pessoni LA. *Biometria Aplicada Ao Estudo Da Diversidade Genética*. 1º (Cruz CD Ferreira FM and Pessoni LA, (eds.)). Suprema, Visconde do Rio Branco, 2011.
66. Selkoe KA, Toonen RJ. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 2006;9:615-629.
67. Cheng L, Liu L, Yu X, Wang D, Tong J. A linkage map of common carp (*Cyprinus carpio*) based on AFLP and microsatellite markers. *Anim Genet* 2010;41:191-198.
68. Abdul-Muneer PM. Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genet Res Int* 2014;2014:1-11.
69. Xu K, Duan W, Xiao J, Tao M, Zhang C, Liu Y, *et al.* Development and application of biological technologies in fish genetic breeding. *Sci China Life Sci* 2015;58:187-201.
70. Gjedrem T. Improvement of Productivity through Breeding Schemes. *GeoJournal* 1985;10:233-241.
71. Gjedrem T. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquac Res* 2000;31:25-33.
72. Lind CE, Ponzoni RW, Nguyen NH, Khaw HL. Selective breeding in fish and conservation of genetic resources for aquaculture. *Reprod Domest Anim* 2012;47:255-263.
73. Matusse NRD, Pita A, Pérez M, Inés Trucco M, Peleteiro JB, Presa P. First-generation genetic drift and inbreeding risk in hatchery stocks of the wreckfish *Polyprion americanus*. *Aquaculture* 2016;451:125-136.
74. Valente BD, Silva MA, Silva LOC, Bergmann JAG, Pereira JCC, Fridrich AB, *et al.* Estruturas de covariância de peso em função da idade de animais Nelore das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* 2008;60:389-400.
75. Turra EM, de Oliveira DAA, Valente BD, Teixeira E de A, Prado S de A, de Melo DC, *et al.* Estimation of genetic parameters for body weights of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* using random regression models. *Aquaculture* 2012;354-355:31-37.
76. Rosa A do N, Martins EN, Menezes GR de O, Silva LOC da. *Melhoramento Genético Aplicado Em Gado de Corte: Programa Geneplus-Embrapa*. Embrapa, Brasília, 2013.
77. Misztal I. BLUPF90 family of programs.
78. Oliveira CAL de, Yoshida GM, Oliveira SN de, Kunita NM, Santos AI dos, Alexandre Filho L, *et al.* Avaliação genética de tilápias-do-nilo durante cinco anos

- de seleção. *Pesqui Agropecuária Bras* 2015;50:871-877.
79. Neira R, Díaz NF, Gall GAE, Gallardo JA, Lhorente JP, Manterola R. Genetic improvement in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). I: Selection response and inbreeding depression on harvest weight. *Aquaculture* 2006;257:9-17.
 80. Resende M. Inferência Bayesiana e simulação estocástica (amostragem de Gibbs) na estimação de componentes de variância e de valores genéticos em plantas perenes. *Embrapa Florestas* 2000;46.
 81. Guan J, Hu Y, Wang M, Wang W, Kong J, Luan S. Estimating genetic parameters and genotype-by-environment interactions in body traits of turbot in two different rearing environments. *Aquaculture* 2016;450:321-327.

II – OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a variabilidade genética e as características reprodutivas de diferentes estoques de zebrafish (*Danio rerio*).

Iniciar um programa de melhoramento genético dessa espécie de peixe e estimar os parâmetros genéticos e determinar o critério de seleção para obtenção de indivíduos com maior crescimento.

III - GENETIC VARIABILITY AND REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF ZEBRAFISH STOCKS*

Abstract

Specimens of zebrafish (*Danio rerio*) acquired from different locations may show genetic variability and alteration in allele frequency due to selective pressure in a captive environment, resulting in the differentiation of productive and reproductive characteristics. The objective of this study was to evaluate the genetic variability and reproductive characteristics of zebrafish specimens from six fish farms. A deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium was observed in all evaluated stocks. Differentiation was observed in the variability degree within the stocks for the observed heterozygosity and the Fis index results. Genetic distance between stocks was determined through the Fst index, and the formation of four distinct groups was observed by plotting the dendrogram based on Nei's genetic distance. Differences were observed for reproductive parameters such as hatchability. Hatchability was shown to be related to the inbreeding level of the population, and no effect was found for the spawning frequency. Zebrafish stocks from different locations present genetic and phenotypic variability, with the genetic structure mainly influencing mainly the fertilization. This finding should be considered when studies are performed requiring an evaluation of reproductive indexes.

Keywords: *Danio rerio*, genetic distance, hatchability, heterozygosity, inbreeding, reproduction

Introduction

Zebrafish (*Danio rerio*) is used widely in scientific research because of its genetic similarity with humans^{1,2} as well as its attributes that favor the species' use and maintenance in laboratories.³ Among these attributes, the reproductive capacity and the characteristics of the embryos and larvae are important factors to consider. Under controlled environmental conditions, mainly water temperature (26-28°C) and photoperiod (14-h light – 10-h dark cycle), the zebrafish can reproduce throughout the year, with weekly spawning, producing more than 700 eggs per female.⁴ The transparency of the embryos and larvae allows the monitoring of all development stages, enabling observation and manipulation under optical microscopy.⁵

Zebrafish specimens used in studies may originate from lines produced in laboratories, such as the AB and TU lines, mainly maintained and made available by the Zebrafish International Resource Center (ZIRC).⁶ Methodologies such as transgenesis and mutagenesis are also applied to produce individuals with specific genetic and

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista **Zebrafish** (ISSN: 1557-8542).

phenotypic traits for the purpose of the study.⁷ In addition, the acquisition of individuals from fish farms or animal stores is common for research in various scientific areas.⁸

The zebrafish naturally inhabits the Asian continent⁹ but is widespread in several countries around the world¹⁰ due to its use as a research tool or as an ornamental fish. Individuals from different regions may present genetic and phenotypic variations, resulting in the formation of subpopulations in both natural and captive environments.¹¹ Studies are being conducted to determine the variation in traits such as growth,¹² behavioral factors,⁸ physiological,¹³ and genetic variability¹⁴ in zebrafish from different origins. The inbreeding level is one of the main factors in the divergent genetics between stocks.¹⁵

The mating of related individuals generates offspring with higher homozygosity, increase the appearance of phenotypes characteristic of recessive alleles.¹⁶ Decreased genetic variability is common in individuals kept in captivity, such as fish farms or laboratories, due to the use of fewer individuals for breeding and the resulting common ancestry. Phenotypes resulting from recessive alleles are usually associated with decreased productivity, which is affected by the growth and survival and the increase in body deformities.¹⁷ In the zebrafish case, Brown *et al.*¹⁸ emphasized that the relation between genetics and phenotypic characteristics should be analyzed, since these factors can disrupt research using this animal model as a tool for studying the translation of human diseases.

In this work, the genetic variability and structure were evaluated in six zebrafish stocks acquired from Brazilian fish farms. Molecular genetics analyses were performed by testing microsatellite markers, including determination of the heterozygosity, Hardy-Weinberg equilibrium, and F_{is} and F_{st} indices, in addition, we evaluated reproductive parameters such as egg quantity, spawning frequency, and hatchability in these stocks.

Material and methods

Ethics committee

The manipulations and experiments with the animals were carried out in accordance with the regulations established by the Ethics Committee of the State University of Maringá, with project approved under protocol number 6359231115.

Animals and research locations

The study was conducted with zebrafish animals purchased from six Brazilian fish farms from three different states. The inventories were identified according to their place of origin, with one stock from Paraná (PR), four from São Paulo (SP-1, SP-2, SP-3, and SP-4), and one from Minas Gerais (MG) (Fig. 1). Genetic analyses were performed at the Molecular Biology Laboratory, whereas the reproductive evaluations were carried out at the Zebrafish Laboratory, both belonging to the Animal Science Department of the Maringá State University.

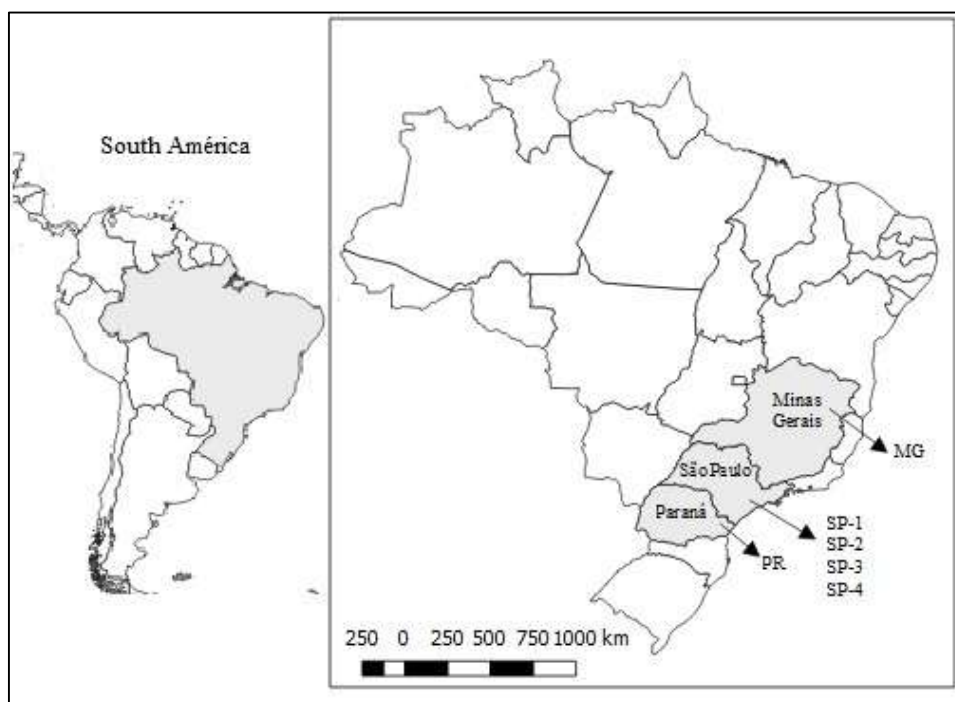


FIG. 1. Maps of zebrafish stocks source

Analysis of genetic variability and structure

For determination of variability and genetic structure, the caudal fin of 30 fish of each origin was collected, totaling 180 samples, and these samples were stored in 70% ethanol. DNA extraction was performed according to the methodology described by Lopera-Barrero *et al.*¹⁹ Subsequently, total DNA was measured with a PICODROP® spectrophotometer (Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom), and the sample concentration was standardized to 10 ng/μL. The DNA integrity was evaluated on a 1% agarose gel stained with SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by electrophoresis conducted in 0.5X TBE buffer (250 mM Tris-HCL, 30 mM boric acid,

and 41.5 mM EDTA) for 2 h at 90 volts. The gel was visualized using a transilluminator, and the image was captured by the software L-PIX HE (Loccus Biotechnology, Sao Paulo, Brazil).

Then, the DNA samples amplification was performed using 13 μ L of Mix and 2 μ L of genomic DNA (20 ng) in a total final reaction volume of 15 μ L. The mix was prepared with 1.5 μ L buffer (1x), 0.45 μ L MgCl₂ (1.5 mM), 1.2 μ L dNTPs (0.2 mM), 0.3 μ L of each primer (0.2 mM), 0.1 μ L Taq DNA polymerase (0.5 U per reaction), 2 μ L of genomic DNA, and 9.15 μ L ultrapure H₂O. The PCR amplification protocol consisted of the following steps: initial denaturation at 94°C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 58°C (temperature for all primers) for 1 min, extension of 72°C for 1 min 30 s; and finally, the last extension cycle of 72°C for 10 min. This process was carried out in a Veriti® thermocycler (Applied Biosystems®, Austin, TX, USA)

In the amplification process, 10 microsatellite primers specific for *D. rerio* and described by Shimoda *et al.*²⁰ (Table 1) were tested.

TABLE 1 - SEQUENCE OF PRIMERS USED IN THE DNA AMPLIFICATION

<i>Identification</i>	<i>Forward sequence</i>	<i>Reverse sequence</i>
Z-160	CGCTACCTGAAGGACACCAT	CTGCTATTGCTATACTTGTGGGG
Z-5033	CACCAGGAAGAAATCGATGCG	GACGTTTACCCACCAAGAACCC
Z-4188	GTAGTTGAATGCCGAATTGGCC	GAACACCTGCGCATCCACAG
Z-5395	CAGCCCCCTCAGTCACGACT	CGCGCCCTCTCTGAGAACAT
Z-1531	CATCAGCACTGTGCGTACCT	CGCTGCTGCCTTCTGTCT
Z-4425	ACACGACAGGAGGGGAGGA	CCCAAATGGCTGTGCTACAGG
Z-4003	AGCAGGGGGATTCCCTGCATT	AAGTTGGCCAATATGGTCTGCG
Z-4586	GGTCCTCCAGGAACATGGTTG	TCTGCTGCAGGTCAAACAGAGC
Z-5649	TCAGAGTTGCGGTCAAAACATC	AATGCATCATCACCAGGCTG
Z-1402	GATCAGGGTGCATGTACTIONGAA	TCTGCTTTCTGTCAGGGGAT

Amplified samples were subjected to 10% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis conducted in a buffer at 180 volts for 7 h. For visualization of the microsatellite alleles, the gels were stained with silver nitrate and subsequently photographed. Allele size was calculated using 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Evaluation of reproductive performance

During the period of reproductive evaluation, the animals were kept in individual structures with 750 mL of water, constant aeration, and a 14-h light:10-h dark photoperiod and were fed twice daily with commercial diet Bernaqua, containing 57% PB and granulometry of 300 to 500 μm . The mating was performed weekly at eight-day intervals for six weeks. A ratio of 1:1 (male:female) was used between couples of different origins, selected according to their sexual dimorphism. The animals had six months of age and had a mean weight and total length of $0.455\pm 0.10\text{g}$ and $14.64\pm 3.21\text{mm}$, respectively.

The reproduction was evaluated weekly in five pairs of animals per group, totaling 360 individuals, for the whole evaluated period. Breeders were kept in breeding structures in the afternoon, remaining there until mid-morning of the next day. Then, they were returned to their individual structures. When the spawning occurred, the eggs were collected, counted, and stored in structures separated according to the reproducers pair; at capacity, these structures held 1 L of water, which was kept at a temperature of approximately 28°C . On the third day after fertilization, hatched larvae were counted per spawning. Thus, the reproductive parameters evaluated were the spawning frequency (SF), total number of eggs (TE), mean number of eggs (ME) per female and hatchability (HA).

Statistical analyses

The genetics parameters evaluated were the number of alleles (N_a), observed heterozygosity (H_o), and expected heterozygosity (H_e) by locus and population. Likewise, the Hardy-Weinberg equilibrium (H-W) and the F_{is} inbreeding coefficient were determined. F_{st} index analysis was performed taking into account the level of genetic differentiation—small (0.00-0.05), moderate (0.05-0.15), high (0.15-0.25) and very high (>0.25)—as defined by Wright.²¹ A dendrogram was created by the UPGMA method using Nei's genetic distance. They were analyzed using the software GenAlEx 6.5,²² whereas the dendrogram plotting was carried out using the packages adegenet²³ and poppr²⁴ (R Foundation for Statistical Computing Vienna, 2011).

STRUCTURE v.2.3.3²⁵ was used to identify the formation of groups (K) formation of genetically similar populations, following the mixed model of clusters with a length period of 500000 and 2000000 replicates. Estimates of K (number of clusters) were

obtained from simulations performed with K ranging from one to five (K = 1-6), reproducing 20 runs for each hypothetical K value according to Evanno *et al.*²⁶.

The means of the reproductive parameters SF, TE, and ME were submitted to analysis of variance and Tukey's test at 5% significance using Proc GLM (SAS Institute, Cary, NC, USA). For binomial distribution and logit link function, the means of HA were tested by the T-test ($p < 0.05$) by Proc GENMOD (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Results

Genetic variability analysis

From the total number of primers used in the study, only six allowed samples amplification and data analysis. The marker Z-1402 presented only nonspecific bands, whereas for Z-5033, Z-1531 and Z-4586 they did not allow the clear visualization of the alleles, even after performing tests in the amplification protocol.

The mean number of alleles ranged from six (SP-1) to 7.1 (PR) (Table 2). The observed heterozygosity ranged from 0.43 to 0.53, whereas the expected heterozygosity ranged from 0.71 to 0.76. The Z-4003 locus was highlighted as being more polymorphic, presenting higher values for the evaluated parameters.

For SP-1 and PR, the Hardy-Weinberg equilibrium deviation ($p < 0.05$) was observed in all evaluated loci. No deviation was observed only at the Z-160, Z-5395, and Z-4003 loci for the stocks MG, SP-2 and SP-3, and SP-4, respectively.

TABLE 2. GENETIC DIVERSITY MEASUREMENTS AT SIX MICROSATELLITE LOCI OF SIX ZEBRAFISH STOCKS

<i>Stocks</i>	<i>Variables</i>	<i>Locus</i>					<i>Total</i>	
		<i>Z-5395</i>	<i>Z-160</i>	<i>Z-4003</i>	<i>Z-4425</i>	<i>Z-4188</i>		<i>Z-5649</i>
SP-1	Na	3	6	9	5	6	5	6
	Ho	0.37	0.60	0.83	0.77	0.33	0.27	0.53
	He	0.60	0.72	0.74	0.74	0.79	0.76	0.72
	H-W	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
SP-2	Na	6	4	10	6	9	4	6.5
	Ho	0.67	0.43	0.67	0.37	0.53	0.53	0.53
	He	0.76	0.58	0.82	0.72	0.76	0.74	0.73
	H-W	0.11	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	
SP-3	Na	5	4	12	5	8	4	6.3
	Ho	0.63	0.37	0.73	0.40	0.30	0.33	0.46
	He	0.68	0.63	0.88	0.74	0.74	0.59	0.71
	H-W	0.00	0.01	0.20	0.00	0.00	0.00	
SP-4	Na	7	3	8	9	7	7	6.8
	Ho	0.60	0.37	0.77	0.40	0.33	0.27	0.45
	He	0.82	0.51	0.84	0.80	0.77	0.82	0.76
	H-W	0.00	0.03	0.23	0.00	0.00	0.00	
MG	Na	7	3	8	11	4	8	6.8
	Ho	0.43	0.53	0.63	0.73	0.63	0.27	0.54
	He	0.81	0.40	0.81	0.88	0.61	0.84	0.72
	H-W	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00	
PR	Na	4	6	9	8	8	8	7.1
	Ho	0.43	0.23	0.63	0.60	0.40	0.30	0.43
	He	0.65	0.77	0.84	0.76	0.79	0.84	0.77
	H-W	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	

Na, number of alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity, H-W, Hardy-Weinberg equilibrium (p-value).

The inbreeding coefficient F_{is} showed a large variation (-0.325 to 0.70) (Table 3), with no negative values being observed only at the Z-5395 and Z-5649 loci. Regarding the general average, the PR stock showed inbreeding, with an index of 0.439. On the other hand, the MG, SP-1, and SP-2 showed less value, with values of 0.197, 0.269, and 0.272, respectively.

TABLE 3. VALUE OF THE FIS INBREEDING COEFFICIENT BETWEEN THE DIFFERENT LOCI AND STOCKS OF ZEBRAFISH

<i>Stocks</i>	<i>Locus microsatélites</i>						<i>Média</i>
	<i>Z-5395</i>	<i>Z-160</i>	<i>Z-4003</i>	<i>Z-4425</i>	<i>Z-4188</i>	<i>Z-5649</i>	
SP-1	0.383	0.167	-0.122	-0.041	0.582	0.645	0.269
SP-2	0.118	0.259	0.183	0.486	0.303	0.284	0.272
SP-3	0.074	0.413	0.170	0.459	0.595	0.441	0.359
SP-4	0.268	0.275	0.083	0.500	0.571	0.671	0.395
MG	0.469	-0.325	0.222	0.170	-0.033	0.679	0.197
PR	0.338	0.701	0.250	0.211	0.494	0.643	0.439

Regarding F_{st} , all comparisons among the six groups were different ($p < 0.01$). The SP-1 stock showed high differentiation for SP-2 (0.189) and SP-3 (0.188). The other comparisons show a moderate genetic differentiation between the stocks, with F_{st} values ranging from 0.05-0.15 (Table 4).

TABLE 4. ESTIMATES OF GENETIC DIFFERENTIATION (F_{st}) AMONG THE SIX STOCKS OF ZEBRAFISH

	SP-1	SP-2	SP-3	SP-4	MG	PR
SP-1						
SP-2	0.189					
SP-3	0.188	0.054				
SP-4	0.124	0.127	0.099			
MG	0.125	0.113	0.136	0.070		
PR	0.132	0.133	0.098	0.084	0.133	

The genetic identity was also visualized by the UPGMA dendrogram obtained from Nei's genetic distance, where the formation of four groups among the stocks was determined (Fig. 2).

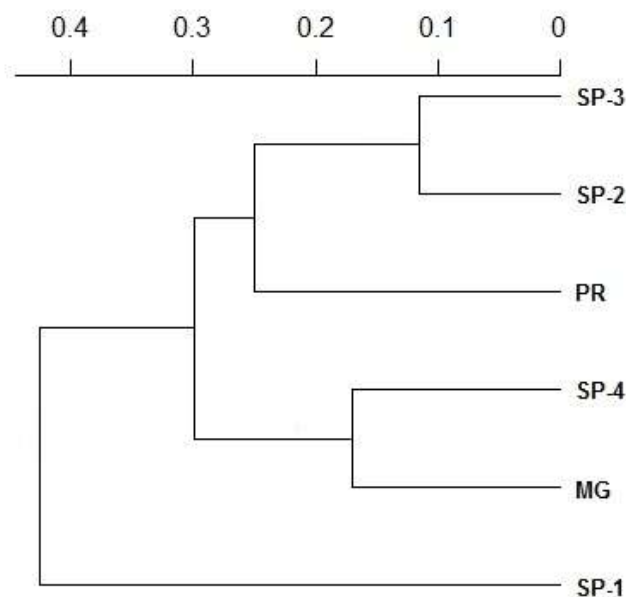


FIG. 2. Dendrogram of genetic identity between zebrafish stocks.

The result of the Bayesian grouping analysis carried out in the structure program report the probability of individuals belonging to a single genetic cluster, with a value of $K = 5$ (Fig. 3). A similar grouping was found between populations 3 and 4, which represent the SP-2 and SP-3.

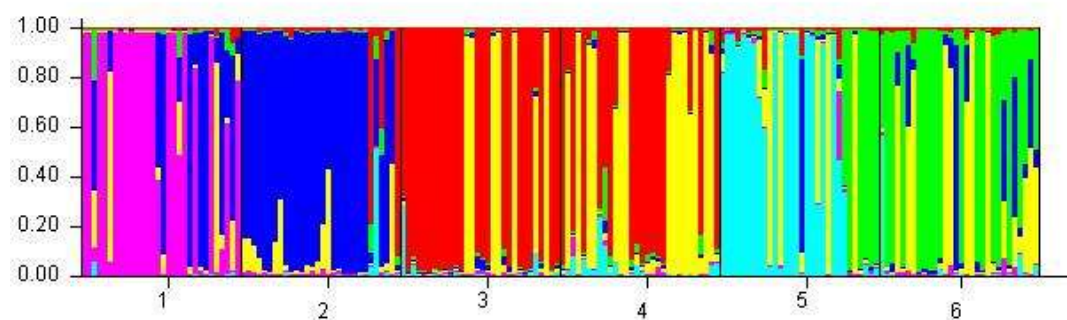


FIG. 3. Assignment test for zebrafish individuals from six populations ($K = 5$), being represented by the colored vertical bars. The same color in different populations indicates that they belong to the same group. Different colors in the same bar indicate the genome percentage shared with each group. In the Y axis are the values of Q: coefficient of individual participation in a given group, and in the X-axis, populations (1=SP-1; 2=MG; 3=SP-2; 4=SP-3; 5=PR and 6=SP-4).

Evaluation of reproductive performance

The average spawning frequency per female was 2.57 ± 1.33 , with females producing a maximum of four times in six weeks. The mean and total number of eggs were the parameters that presented the highest variation according to the standard deviation information (Table 5).

TABLE 5. DESCRIPTIVE STATISTICS OF THE REPRODUCTIVE PARAMETERS OF ZEBRAFISH STOCKS

<i>Reproductive parameters</i>	<i>Mean+SD</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
Spawning frequency	2.57 ± 1.33	0	4.00
Eggs per female (total)	659.43 ± 443.00	0	1935.00
Eggs per female (average)	260.61 ± 117.66	0	550.00
Hatchability (%)	57.17 ± 25.13	0	92.22

SD, standard deviation.

For reproductive parameters and stocks, SP-1 presented a higher total number of eggs per female and hatchability relative to the other groups. On the other hand, PR presented lower hatchability (36.75%), showing a sharp fall relative to other stocks (Fig. 4).

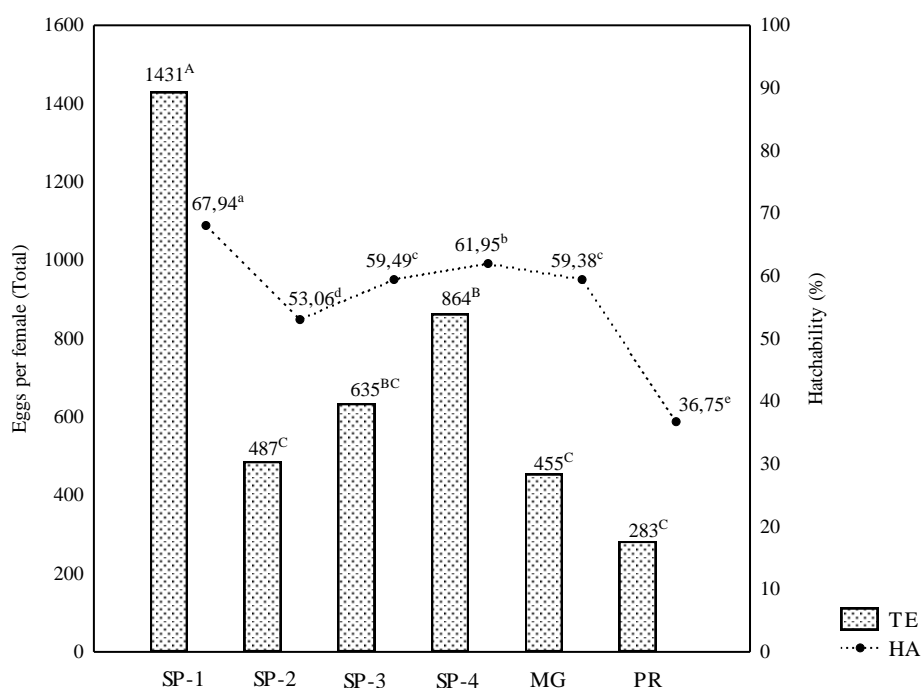


FIG. 4. Total number of eggs and hatchability of zebrafish stocks.

The SP-1 stock differed from SP-3, SP-4, and PR in the average number of eggs per female, presenting a higher value (450). However, the stocks did not differ in spawning frequency during the evaluated period (Fig. 5).

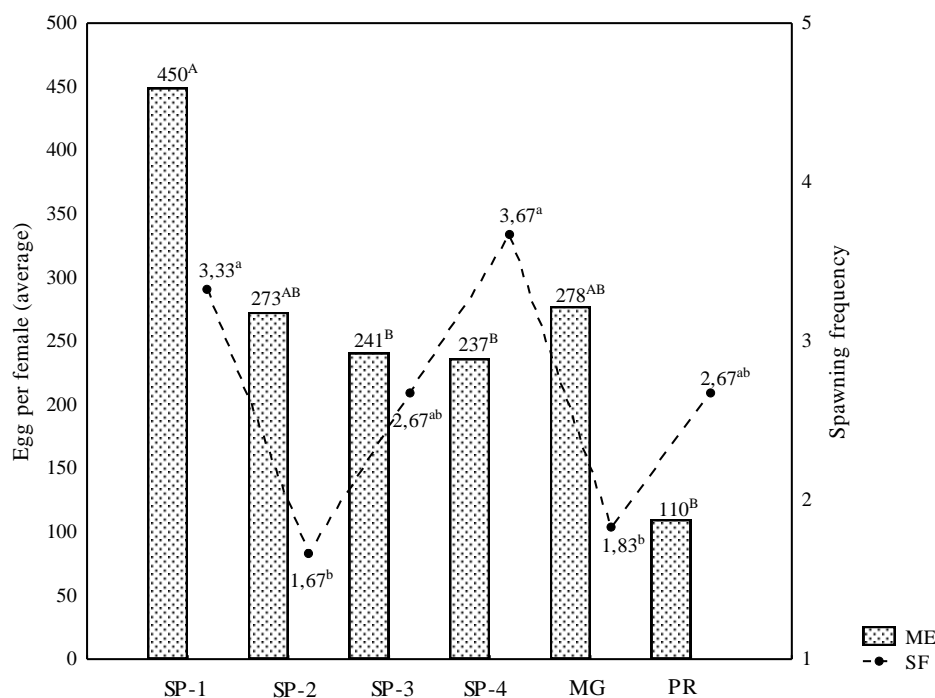


FIG. 5. Average number of eggs spawned and spawning frequency of zebrafish stocks.

Discussion

Genetic variability

The PR stock presented higher number of alleles; however, lower heterozygosity was observed, indicating a lower genetic variability of this group compared to the others. The alleles present in their genotypes as homozygotes. The heterozygosity analysis is the basis for stock assessment, and the higher the index, the greater the genetic differentiation within the group.²⁷ The results found in the present study for alleles number and heterozygosity corroborate the results of other studies that evaluated zebrafish specimens produced in fish farms.^{14,28} However, these values were higher than observed in the isogenic lines standardized and consolidated in research, such as the AB and TU,¹⁶ and were lower than those values for samples collected in individuals in their natural environment on the Asian continent.²⁸

The occurrence of greater genetic polymorphism in natural populations is expected, as crosses are usually randomized, and the possibility of inbreeding is lower. On the other

hand, the process of domestication and production of captive animals generally causes a reduction in the genetic variability of the stocks, which is reflected in the decrease in allelic richness and heterozygosity. This decrease in variability is verified in production systems of several species of fish and is usually caused by a lack of control among the breeding groups, including the use of few breeders with high kinship among them, as well as the lack of parent's replacement over the production course.²⁹

The use of a few progenitors contributes to an allelic frequency in the offspring that is not representative of the total population, resulting in deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, as observed in the present study. Deviation in allele frequency is commonly observed in animals kept in captivity, especially when there is reduced stock and the occurrence of selection. The results of the Fis Fixation Index were in accordance with the observed heterozygosity values, where SP-3, SP-4, and PR were more inbred, particularly PR, with a value of 0.43.

Some fish species have a delicate larval phase, with high mortality contributing even more to a decrease in genetic variability³⁰ because fewer individuals are likely to become parents, potentially causing a genetic bottleneck. This fact is evident in the zebrafish, which presents a larval phase with high mortality,⁶ and in association with this characteristic, the zebrafish is a highly prolific species, able to reproduce over the entire year under ideal environmental conditions. Thus, depending on the conditions, only few individuals can be used to meet the production demand. Therefore, the use of a few brood stock to produce offspring in each generation contributes to a decrease in the genetic variability of the stock and consequently the heterozygosity and inbreeding.

Under laboratory conditions, a decrease in genetic variability and alteration of zebrafish stock genotypes is more significant because many research institutions have a limited number of breeders and limited availability of housing structures for individuals, preventing the maintenance of a large number of animals to produce new offspring. Although inbreeding is an important factor in some studies, inappropriate reproductive management is a risk to the maintenance of laboratory stocks. In this sense, Brown *et al.*¹¹ reported on the substructure of zebrafish populations, such as AB and TU, distributed among different laboratories, distinguishing both the genotype and the phenotype.

In addition to observations made on the genetic variability within the stocks, differentiation in the animals was evaluated, demonstrated by the Fst Index and visualized by the dendrogram, where the six stocks formed four distinct groups. SP-2 and SP-3 showed lower genetic differentiation, followed by MG and SP-4, which are from different

states. The major difference observed between stocks purchased in the same state (SP-1 x SP-2 and SP-1 x SP-3) indicates that, even in areas of a certain geographical proximity, genetic distinction between individuals may be observed, occurring due to reproductive management and isolation.²⁹

Reproductive performance

Considering all populations, the average spawning frequency was 2.57, with a maximum value of four spawnings in six weeks of evaluation. This result corroborates with Castranova *et al.*³¹ for zebrafish specimens not produced in the laboratory and showing an eight-day interval between mating. The values of total and average number of eggs per female were higher than reported in both the inbred lineages and the animals purchased from the commercial stores.³¹

Variation existed in the reproductive parameters relative to the stocks, mainly regarding hatchability and the total number of eggs. The total number of eggs was related to the average number of eggs released per female and the frequency of spawning. The average weekly spawning of zebrafish is 200-300 eggs per female,⁹ indicating that the animals evaluated were within the standards described in the literature. The PR stock, with lower observed heterozygosity and Fis, presented a lower mean number of eggs (110). However, this value was different only for SP-1, which presented a high mean number of eggs (450) and high spawning frequency (3.33), resulting in a higher total number of eggs per female (1431) compared to other stocks.

Studies have shown that inbreeding decreased the gonadosomatic index and the number of eggs of female as salmon (*Oncorhynchus kitsutch*)³² and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*),³³ respectively. However, these species have reproductive characteristics that differ from zebrafish, which is an iteroparous fish with multiple spawning and asynchronous oocyte development. In a study carried out with zebrafish in 1979, which evaluated the reproduction of full siblings, half-siblings, and unrelated individuals, the influence of inbreeding was verified only for the number of fertilized eggs and not according to the average number of eggs produced.³⁴ Research has shown a greater effect of inbreeding on the gonadosomatic males⁴³ and quantity and quality of fish sperm.³⁵⁻³⁷

The lower semen quality in inbred animals negatively affects the fertilization and consequently the hatching rate. Monson and Sadler³⁸ showed a lower number of embryos

(fertilized eggs) in inbred matings among zebrafish laboratory lines (AB and TU). In the present study, eggs from PR animals had lower hatchability compared to other stocks (36.75%). Embryos and larvae of zebrafish are widely used in studies related to embryology and toxicology, as well as in studies where procedures such as transgenesis and mutagenesis are performed.⁴ In these studies, the hatchability is an important parameter evaluated.³⁹⁻⁴¹ The results obtained in this study show the need to use individuals from only one location to avoid or reduce the effects of genetic and phenotypic variation on the reproductive parameters results. However, this practice is difficult when using specimens from pet shops, which in turn can buy animals from different producers.

The spawning frequency varied among the stocks but was not influenced by the genetic variability, as MG presented lower inbreeding according to the Fis index and did not differ from PR in the total number of eggs, given its low spawning frequency (1.83). Likewise, despite the greater inbreeding of PR individuals, the spawning frequency did not differ from the other stocks. This fact corroborates a study by Fessehaye *et al.*⁴² evaluating Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), where the authors verified that kinship had no significant effect on the spawning occurrence.

Conclusion

Zebrafish specimens from different locations present genetic variability and divergence as well as distinct reproductive characteristics. When studies are conducted with zebrafish, these variations need to be considered because they can potentially confuse the results in studies carried out to understand diseases in humans, especially those studies that evaluate zebrafish reproductive parameters such as hatchability.

Acknowledgments

The author are grateful to CAPES for the financial support.

References

1. Vilella AJ, Severin J, Ureta-Vidal A, Heng L, Durbin R, Birney E. EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Res* 2008;19:327-335.
2. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013;496:498-503.
3. Best J, Adatto I, Cockington J, James A, Lawrence C. A Novel Method for Rearing First-Feeding Larval Zebrafish: Polyculture with Type L Saltwater Rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Zebrafish* 2010;7:289-295.
4. Mizgirev I, Revskoy S. Generation of clonal zebrafish lines and transplantable hepatic tumors. *Nat Protoc* 2010;5:383-394.
5. Goessling W, Sadler KC. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. *Gastroenterology* 2015;149:1361-1377.
6. Nasiadka A, Clark MD. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR J* 2012;53:161-168.
7. Santoriello C, Zon LI. Science in medicine Hooked ! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 2012;122:2337-2343.
8. Vignet C, Bégout M-L, Péan S, Lyphout L, Leguay D, Cousin X. Systematic Screening of Behavioral Responses in Two Zebrafish Strains. *Zebrafish* 2013;10:365-375.
9. Menon A. Check list – fresh water fishes of India. *Occas Pap no 175 1999*;366:234-259.
10. Kint P, Mahesh G, Panwar Y. Mapping of Zebrafish Research: A Global Outlook. *Zebrafish* 2013;10:510-517.
11. Brown AR, Bickley LK, Ryan TA, Paull GC, Hamilton PB, Owen SF, *et al.* Differences in sexual development in inbred and outbred zebrafish (*Danio rerio*) and implications for chemical testing. *Aquat Toxicol* 2012;112-113:27-38.
12. Meyer BM, Froehlich JM, Galt NJ, Biga PR. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Inbred strains of zebrafish exhibit variation in growth performance and myostatin expression following fasting. *Comp Biochem Physiol Part A* 2013;164:1-9.
13. Monroe JD, Manning DP, Uribe PM, Bhandiwad A, Sisneros JA, Smith ME, *et al.* Hearing sensitivity differs between zebrafish lines used in auditory research. *Hear Res* 2016;341:220-231.
14. Coe TS, Hamilton PB, Griffiths AM, Hodgson DJ, Wahab MA, Tyler CR. Genetic variation in strains of zebrafish (*Danio rerio*) and the implications for ecotoxicology studies. *Ecotoxicology* 2009;18:144-150.
15. Nakadate M, Shikano T, Taniguchi N. Inbreeding depression and heterosis in various quantitative traits of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Aquaculture* 2003;220:219-226.
16. Willoughby JR, Fernandez NB, Lamb MC, Ivy JA, Lacy RC, DeWoody JA. The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. *Mol Ecol* 2015;24:98-110.
17. Kause A, Ritola O, Paananen T, Wahlroos H, Mäntysaari EA, Mäntysaari EA. Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2005;247:177-187.
18. Brown-Peterson NJ, Wyanski DM, Saborido-Rey F, Macewicz BJ, Lowerre-Barbieri SK. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Mar Coast Fish* 2011;3:52-70.

19. Lopera-Barrero NM, Povh JA, Ribeiro RP, Gomes PC, Jacometo CB, da Silva TL. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: Modified salt (NaCl) extraction. *Cienc e Investig Agrar* 2008;35:65-74.
20. Shimoda N, Knapik EW, Ziniti J, Sim C, Yamada E, Kaplan S, *et al.* Zebrafish Genetic Map with 2000 Microsatellite Markers. *Genomics* 1999;58:219-232.
21. Wright D. *Evolution and Genetics of Population*. 1978.
22. Peakall R, Smouse PE. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 2012;28:2537-2539.
23. Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 2008;24:1403-1405.
24. Kamvar ZN, Brooks JC, Gränwald NJ. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Front Genet* 2015;6:1-10.
25. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000;155:945-959.
26. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 2005;14:2611-2620.
27. Moreira AA, Hilsdorf AWS, Silva JV da, Souza VR de. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. *Pesqui Agropecuária Bras* 2007;42:521-526.
28. Gratton P, Allegrucci G, Gallozzi M, Fortunato C, Ferreri F, Sbordoni V. Allozyme and microsatellite genetic variation in natural samples of zebrafish, *Danio rerio*. *J Zool Syst Evol Res* 2004;42:54-62.
29. Silva D, Cortinhas MC, Kersanach R, Proietti M, Dumont LFC, D'Incao F, *et al.* Genetic structuring among silverside fish (*Atherinella brasiliensis*) populations from different Brazilian regions. *Estuar Coast Shelf Sci* 2016;178:148-157.
30. Rodriguez-Rodriguez M del P, Lopera-Barrero NM, Ribeiro RP, Povh JA, Vargas L, Sirol RN, *et al.* Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microssatélites. *Pesqui Agropecuária Bras* 2010;45:56-63.
31. Castranova D, Lawton A, Lawrence C, Baumann DP, Best J, Coscolla J, *et al.* The Effect of Stocking Densities on Reproductive Performance in Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 2011;8:141-146.
32. Gallardo JA, García X, Lhorente JP, Neira R. Inbreeding and inbreeding depression of female reproductive traits in two populations of Coho salmon selected using BLUP predictors of breeding values. *Aquaculture* 2004;234:111-122.
33. Su G-S, Liljedahl L-E, Gall GAE. Effects of inbreeding on growth and reproductive traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 1995;142:139-148.
34. Mrakovcic M, Haley LE. Inbreeding depression in the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton Buchanan). *Aquaculture* 2004;234:111-122.
35. Mehlis M, Frommen JG, Rahn AK, Bakker TCM. Inbreeding in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): effects on testis and sperm traits. *Biol J Linn Soc* 2012;510-520.
36. Langen K, Bakker TCM, Baldauf SA, Shrestha J, Thünken T. Effects of ageing and inbreeding on the reproductive traits in a cichlid fish I: the male perspective. *Biol J Linn Soc* 2017;120:752-761.
37. Langen K, Bakker TCM, Baldauf SA, Shrestha J, Thünken T. Effects of ageing and inbreeding on the reproductive traits in a cichlid fish II: the female perspective. *Biol J Linn Soc* 2017;120:762-770.

38. Monson CA, Sadler KC. Inbreeding Depression and Outbreeding Depression Are Evident in Wild-Type Zebrafish Lines. *Zebrafish* 2010;7:189-197.
39. Bai W, Zhang Z, Tian W, He X, Ma Y, Zhao Y, *et al.* Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *J Nanoparticle Res* 2010;12:1645-1654.
40. Pamanji R, Yashwanth B, Venkateswara Rao J. Profenofos induced biochemical alterations and in silico modelling of hatching enzyme, ZHE1 in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016;45:123-131.
41. Liang X, Souders CL, Zhang J, Martyniuk CJ. Tributyltin induces premature hatching and reduces locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae at environmentally relevant levels. *Chemosphere* 2017;189:498-506.
42. Fessehaye Y, Bovenhuis H, Rezk MA, Crooijmans R, van Arendonk JAM, Komen H. Effects of relatedness and inbreeding on reproductive success of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 2009;294:180-186.

IV - ZEBRAFISH BREEDING PROGRAM: GENETIC PARAMETERS ESTIMATES FOR GROWTH TRAITS*

Abstract

The objective of this study was to evaluate the genetic parameters of two generations of zebrafish breeding program. The program aimed to obtain individuals with increased growth in order to facilitate and optimize the zebrafish use as an animal model. The base population was formed by crossing individuals of six commercial stocks of zebrafish, resulting in a nucleus with 60 families. Two generations were evaluated, with a total of 780 and 781 individuals for the first and second generation, respectively. The selection was made based on the mean genetic value of each family, followed by mass selection of the breeders. Mathematical models that considered the effects of additive genetics, family and residual effects, sex, age, larval stage and generation were evaluated. Weight and total length were used as response variables. Total length was the best selection criterion because it had a higher heritability (0.30) than weight (0.22). There was a high family effect, especially in the first generation of animals. For second-generation data, a heritability was 0.26 for total length, as well as a lower family effect for length and the higher genetic value were observed. The genetic and phenotypic correlations for weight and length were 0.87 and 0.75, respectively. These results indicate that genetic breeding using total length as the selection criterion may produce a larger and heavier zebrafish strain.

Keywords: components of variance, *Danio rerio*, total length, heritability, weight

Introduction

The zebrafish (*Danio rerio*) is an animal model that is widely used in various fields including neurophysiology, embryology, genetics, and toxicology.¹⁻⁵ It is a valuable model due to its genetic similarity with humans, as well as its productive traits and low cost of maintenance.^{6,7} Specimens destined for research can have different origins and are either produced in laboratories or acquired from fish farms or animal shops. Among the existing lines, the AB and TU lines stand out.⁶ In addition, the development of mutant and transgenic lines has increased in recent years due to the advance of genetic engineering and the transparency of the embryos and larvae.⁸

Among other factors, an ideal animal model should provide reliable and representative results compared to other organisms.⁹ To achieve this goal, the individuals standardization is required to increase the reliability of the genetic and phenotypic responses to a specific evaluation. However, the results variation due to different lines of zebrafish has generated concern in the scientific community, where studies have

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista **Zebrafish** (ISSN: 1557-8542).

demonstrated that the phenotypic expression resulting from a specific treatment may differ with animal origin.¹⁰⁻¹² This problem is exacerbated when individuals are used from sources lacking information on genetics, behavioral factors, and age.

The zebrafish productive cycle is not yet fully understood,¹³ which makes it challenging to maintain fish in laboratories and reduces the efficiency of some procedures. Larvae culture is a major hindrance to production and has high mortality rates. This is because the larval mouth size is small, preventing the ingestion of live food with high nutritional value, such as *Artemia nauplii*.¹⁴ The production of individuals with increased growth would be valuable, allowing faster development via the intake of larger food in a shorter amount of time.

Genetic breeding consists of joint selection and directed crossing, with the goal to increase the alleles frequency that allow the phenotypic expression of interest traits.^{15,16} In this process, several steps are fundamental, such as defining the program objectives and selection criteria,¹⁷ as well as the formation of the base or initial population.¹⁸ The base population is obtained by crossing individuals of different origins, increasing the frequency of heterozygotes, and thus guaranteeing genetic gain, productivity and response to long-term selection.¹⁹

Genetic breeding program lines are produced by mating individuals with high genetic value for a certain selection criterion, allowing specimens to present high phenotypic standardization in relation to the objective of the program. Several lines of animal species are described, primarily to improve phenotypic traits related to production and commercialization, including increased growth, disease resistance and meat quality.²⁰⁻²² However, genetic breeding can also be used to produce genetic lines that are not destined for consumption, such as zebrafish, to obtain animals with specific characteristics and phenotypic standardization.

In this study, we present information of zebrafish population under selection. There were estimated genetic parameters and covariance components for total length and weight of two Zebrafish generations.

Materials and methods

Ethics Committee

Manipulations and experiments with animals were carried out in accordance with the regulations established by the Ethics Committee of the Maringá State University, with project approved under protocol number 6359231115).

Genetic breeding program

The zebrafish (*D. rerio*) breeding program of Maringá State University (UEM), Paraná, Brazil was started in 2015. It has planned to produce a genetic line with superior growth and high phenotypic standardization. Two generations of animals were assessed compounding a nucleus of 60 families maintained at each cycle.

The families were kept in separate structures throughout the production process. Because of the small size of the fish, it was impossible to mark individuals at early stages of development. The program consisted of obtaining families, maintenance of the young (larvae and juveniles) and adults, collection and evaluation of the data, design of mating and the selection of breeders.

Family production and data collection

The families were formed from the reproduction of couples, which enabled the collection of information on the offspring's genealogy. Breeders were kept in individual structures and mated only on the date scheduled for breeding. The pairs were housed in 1.5 L structures with a screened bottom to allow the eggs to pass and prevent predation by the breeders. The animals were conditioned to these structures after 4 pm In the following day, spawning occurrences were observed, and the fish were separated individually.

The nucleus program productive cycle involved three structures, being for reproduction, larvae and juveniles production and a recirculating aquaculture system for the maintenance of mature/adults animals. The management adopted during the process of obtaining families was described in figure 1. The reproduction, production of larvae,

juveniles and adults, data collection, estimation of genetic parameters, design of mating and selection (Fig. 1).

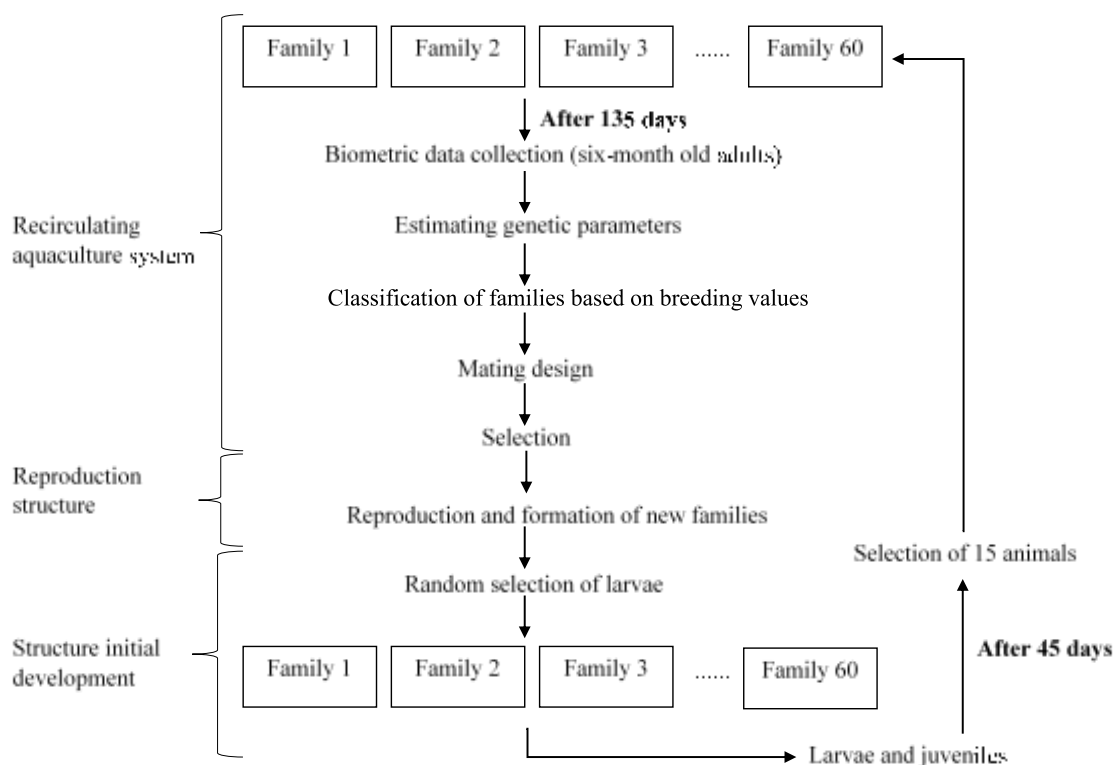


FIG.1. Scheme of the productive cycle to obtain the families from the nucleus of the genetic improvement program.

The two generations varied in terms of the breeders number, egg collection period, and structures used for larvae and juveniles production (volume and period of permanence) (Table 1). The structure volume for the young forms production was 10 L and 2 L for the first and second generation, respectively. The larvae were conditioned in the structure to form the quantity hatched, thus differing the stocking density for each family and generation. Each family was kept in separated structure (aquarium) from spawning to the end of evaluation period. Subsequently, 15 juveniles per family were randomly selected and were transferred to tanks with a recirculation system and a volume of 5.4 L. During the entire productive cycle, the fish were kept at a 14-h light – 10-h dark cycle with a temperature between 24 and 28°C.

TABELA 1. GENERAL INFORMATION ON THE EVALUATED GENERATIONS

<i>Characteristics</i>	<i>Generation</i>	
	<i>G1</i>	<i>G2</i>
N sires	26	59
N dams	26	60
N total	781	780
N males	318	287
Nfemales	463	493
Eggcollection (days)	45	23
Structure of production of Young forms (L)	10	2

N, number.

The weight (g), total length (TL) (mm) and sex of the animals were recorded when the last family reached six months for age. Generation 1 (G1) was obtained by crossing individuals from six stocks of Brazilian fish farms, which constituted the base population, or G0. Generation 2 (G2) was obtained from G1 individuals. A mating system was performed among families of G1, based on their mean genetic value, which was ranked as superior, average and inferior. Thus, when the negative assortative mating was performed for families classified as inferior other families were mated using positive assortative system. Additionally, it was avoided to mate family genetic related (cousins, half and full siblings). After the mating determination, the breeders of each family were selected using the phenotypic information. Breeders were then removed from the recirculation system aquariums and placed into individual structures, enabling to determine the genealogy of the offspring.

Evaluation of quantitative genetic parameters

Two data evaluations were performed. The first was an estimation of the genetic parameters using the weight and total length of the G1 animals. Next, the trait that presented the greatest heritability was chosen as the selection criterion. For the second evaluation, the dataset contained the G1 and G2 information (G1G2), different models were proposed, and it was used the previously chosen trait as the selection criterion.

In all models, the animal effect, common family effect and sex were included. The larval phase density and age were tested as covariates with linear and quadratic effects (Table 2). These effects were considered in the two evaluations, and the generation effect

was only added in the G1G2 analysis. There was adopted the deviation information criterion (DIC)²³ to select the most appropriate model for the trait (Table 2).

TABELA 2. DESCRIPTION OF EFFECTS TESTED ON DIFFERENT MODELS AND DIC VALUES

<i>Model</i>	<i>Systematic effects</i>					<i>DIC</i>
	<i>Age</i>		<i>Density</i>		<i>Generation</i>	
	<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>L</i>	<i>Q</i>		
1	X	X	X	X	X	6933.36
2	X	X	X	X		6940.00
3	X		X	X	X	6941.77
4			X	X	X	6953.08
5	X	X	X		X	6977.77
6	X	X			X	6965.13
7	X				X	6968.80
8			X		X	6989.37

L, linear; Q, quadratic; DIC, deviation information criterion

The analyses were performed using the animal model methodology and Bayesian Inference using GIBBS1F90 program.²⁴ For the G1 evaluation, 1,000,000 rounds were required, whereas for the G1G2 analyses, 6,000,000 rounds were performed, both with 10% discard as burn-in. The convergence of the generated chains was verified by the Heidelberger and Welch²⁵ criteria using the R CODA package²⁶ (R Foundation for Statistical Computing Vienna 2011).

After choosing the model, the components of variance for additive genetics (σ^2_a), family effect (c^2), residual effect (σ^2_e), heritability (h^2), genetics (ra) and the phenotype (rp) correlation between weight and TL were assessed. Subsequent analyses and credibility intervals of 95% probability were performed using POSTGIBBSF90 from the BLUPF90 program family.²⁴ The trait genetic values were predicted considering the components of variance and genetic parameters estimated previously.

Results

Descriptive statistics

The data collection was conducted over 203 and 202 days for G1 and G2, respectively (Table 3). However, the mean age of the G1 animals was lower than that of G2 because of the reproductive period duration during family formation. G2 presented

larger individuals, with values of 0.38 ± 0.11 g and 33.13 ± 2.91 mm for weight and total length, respectively. The weight was the phenotypic trait that presented the highest variation coefficient and the biggest range. In G1, the heaviest individual (0.74g) was eight times heavier than the lightest individual (0.09g). In contrast, the length of the animals within the two generations was similar. In addition, it was observed that females were larger and heavier than males in both generation ($p < 0.05$).

Due to the different structures volumes used between generations, the larvae density differed; it was observed a maximum of 4.35 and 35.00 larvae/L for G1 and G2, respectively (Table 3).

TABELA 3. DESCRIPTIVE STATISTICS OF COLLECTED INFORMATION

<i>Características</i>	<i>N</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>CV (%)</i>
G1						
Age (days)	10	168.00	203.00	183.52	10.70	5.83
Density (Larvae/L)	43	0.30	4.35	1.95	1.25	64.36
Weight (g)	781	0.09	0.74	0.32	0.08	26.91
Male weight (g)	318	0.09	0.46	0.27	0.06	23.43
Female weight (g)	463	0.16	0.74	0.35	0.08	23.76
Total length (mm)	781	20.22	39.87	29.90	2.65	8.87
Male total length (mm)	318	20.22	35.03	29.05	2.47	8.51
Female total length (mm)	463	22.10	39.87	30.49	2.61	8.57
G2						
Age (days)	10	182	202	193.76	6.39	3.30
Density (Larvae/L)	33	5	35	25.1	8.83	35.21
Weight (g)	780	0.12	0.92	0.38	0.11	28.64
Male weight (g)	287	0.12	0.51	0.32	0.06	19.76
Female weight (g)	493	0.14	0.92	0.42	0.11	27.43
Total length (mm)	780	21.97	46.51	33.13	2.91	8.79
Male total length (mm)	287	22.15	39.76	32.29	2.38	7.37
Female total length (mm)	493	21.97	46.51	33.61	3.07	9.15

N, total observations; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

Genetic parameters

The selection criteria included the weight and total length, which were based on data from the first generation. The most appropriate model for total length used the animal effect, common effect of family, sex and linear age effects. For the weight, the effect of density was shown to be better than the age as a covariate according the DIC values.

The common family effect was similar between the total length and weight and was 0.23 and 0.22, respectively. However, the length heritability was higher at 0.30, whereas

it was 0.22 for weight (Table 4). Thus, the total length was determined as the selection criterion of Zebrafish Breeding Program of Maringá State University - (ZBP-UEM).

The model that was most suitable to estimate genetic parameters and variance components for total length was model 1, with a DIC of 6933.3650. The age and density most included as covariate (linear and quadratic effects) and the generation effect as well.

The total length in G1G2 dataset, presented moderate heritability (0.26 ± 0.13) and a common family effect (0.17 ± 0.05) (Table 4). The breeding value mean for length was bigger in the second generation (0.085) than in the first. The genetic correlation between the weight and length from the G1G2 data was 0.87, whereas the phenotypic correlation was 0.75.

TABELA 4. MEANS AND STANDARD DEVIATIONS OF THE GENETIC PARAMETERS OF THE BEST MODELS FOR G1 AND G1G2.

<i>Genetic parameters</i>	<i>G1</i>		<i>G1+G2</i>
	<i>Total length</i>	<i>Weight</i>	<i>Total length</i>
σ^2_a	2.26 (1.49) (0.16-5.86)	0.001 (0.0008) ($9.4e^{-05}$ -0.003)	1.89 (1.05) (0.35-4,52)
σ^2_p	7.16 (0.73) (5.99-8.86)	0.005 (0.0005) (4.8^{-03} -0.006)	7.13 (0.45) (6.38-8.16)
c^2	0.23 (0.07) (0.09-0.39)	0.22 (0.06) (0.11-0.36)	0.17 (0.05) (0.07-0.27)
h^2	0.30 (0.17) (0.02-0.69)	0.22 (0.06) ($1.71e^{-02}$ -0.53)	0.26 (0.13) (0.05-0.57)
Vg	0.046 (0.94)	$-5.7e^{-03}$ (0.01)	0.085 (0.75)

σ^2_a , additive genetic variance; σ^2_p , phenotypic variance; c^2 , common family effect; h^2 , heritability; Vg, genetic value.

Discussion

Descriptive statistics

It was observed that the females were larger than the males in the two investigations, primarily by weight. The oocyte development in females increases their weight.²⁷ Zebrafish can reach sexual maturity after three months of age after which the female coelomic cavity is filled with a large numbers of eggs. Our data collections were performed when the animals were six months old, then the females, probably, were already in the reproductive period. The high ratio of females observed in the two generations was also observed by other authors.^{13,28}

Genetic parameters

It was observed a high family common effect on the weight and TL, which were higher than those observed for other fish such as sole (*Scophthalmus maximus* L.)²⁹ Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)³⁰⁻³² and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).³³ Sang *et al.*²¹ also observed a high family effect in several traits in catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), including the length, with a c^2 value of 0.19-0.23. These authors hypothesized that the increase in the family common effect was because the animals were separated for a long period before individual marking.

In the present study, the animals were not individually marked due to their small size in the early stages of development. Thus, the families were separated throughout development. The heritability of these traits was within the values described previously for other species.³¹⁻³³ Because of breeders selection in the present study and also because heritability represents the extent to which the phenotypic trait is linked to genetics³⁴ it was determined that the best selection criterion for obtaining larger zebrafish is the TL. When evaluating the TL data from G1G2, the model one more accurately predicted the response variable, considering the DIC, where models with smaller values indicate a more accurate description of the length.²⁵ In addition to the effects present in each model (animal, family and sex), there were linear and quadratic effects on the generations and the two covariates (age and density).

The genetic values for TL was higher considering the G1G2 data. This result may indicate that the selection process was effective in the production of genetically superior individuals.²³ Accordingly, the variation in the culture environment during early development may have increased the genetic value and decreased the common family effect for this characteristic, which was 17%. G2 fish remained in the water recirculation system for a longer period, which allowed the maintenance of similar environmental conditions for different families¹⁵ thus reducing the value of c^2 . Thus, it is crucial to minimize the common effect of family in a breeding program to incur less bias in the genetic parameters estimation.³⁵

The heritability for total length (G1G2) had an average value of 0.26. This result was higher than that observed in sole (*S. maximus* L.)³⁶ and catfish (*P. hypophthalmus*)²¹ and lower than that for the Nile tilapia (*O. niloticus*).³¹ The genetic correlation estimated between weight and length (0.87) using the dataset G1G2, pointed out a strong genetic

association between both traits, the phenotypic correlation (0.75) as well. The positive correlation between these two traits, both genetic and phenotypic, was also confirmed in other species of fish.^{21,31,36} The degree of correlation indicates how two or more phenotypic traits result from the expression of the same group of genes.³⁴ Thus, these traits are the result of the same additive genetic action, as stated by Guan *et al.*²⁹ These results indicated a positive correlated response in weight selecting by total length.

Genetic improvement is a valuable tool to produce zebrafish lines with known genetic structure, phenotypic standardization, and an ideal response to a specific trait. Thus, animals with superior growth may favor the collection of different biological materials, which is often hampered because of their small size. Additionally, because zebrafish larvae are small, (averaging 3.9mm at day 12 and 6.3mm at 30 days after fertilization (data not shown)), they have difficulty to ingest exogenous food, which leads to high mortality rates in the larval phase.³⁷ Individuals with increased growth could consume more food in a shorter period of time, improving the larvae survival rates and reaching the adult weight and length in less time.

In addition, the production of a phenotypically and genetically standardized lineage can be obtained through targeted mating to families of the nucleus with a high TL genetic value and degree of kinship.

Conclusion

The total length can be used as a selection criterion to obtain larger individuals due to its moderate heritability estimate and genetic and phenotypic correlation with weight. The results obtained in the present study demonstrate the efficiency in the use of genetic improvement for the production of zebrafish line, and can continue in subsequent generations.

Acknowledgments

The author are grateful to CAPES for the financial support.

References

1. Acosta D da S, Danielle NM, Altenhofen S, Luzardo MD, Costa PG, Bianchini A, et al. Copper at low levels impairs memory of adult zebrafish (*Danio rerio*) and affects swimming performance of larvae. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 2016;185-186:122-130.
2. Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 2002;3:717-724.
3. Monroe JD, Manning DP, Uribe PM, Bhandiwad A, Sisneros JA, Smith ME, et al. Hearing sensitivity differs between zebrafish lines used in auditory research. *Hear Res* 2016;341:220-231.
4. He J-H, Gao J-M, Huang C-J, Li C-Q. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicol Teratol* 2014;42:35-42.
5. Kalueff A V, Echevarria DJ, Stewart AM. Gaining translational momentum: More zebrafish models for neuroscience research. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2014;55:1-6.
6. Nasiadka A, Clark MD. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR J* 2012;53:161-168.
7. Vilella AJ, Severin J, Ureta-Vidal A, Heng L, Durbin R, Birney E. EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Res* 2008;19:327-335.
8. Yakulov TA, Walz G. Zebrafish Database: Customizable, Free, and Open-Source Solution for Facility Management. *Zebrafish* 2015;12:462-469.
9. Ribas L, Piferrer F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Rev Aquac* 2014;6:209-240.
10. Monroe JD, Manning DP, Uribe PM, Bhandiwad A, Sisneros JA, Smith ME, et al. Hearing sensitivity differs between zebrafish lines used in auditory research. *Hear Res* 2016;341:220-231.
11. Vignet C, Bégout M-L, Péan S, Lyphout L, Leguay D, Cousin X. Systematic Screening of Behavioral Responses in Two Zebrafish Strains. *Zebrafish* 2013;10:365-375.
12. Meyer BM, Froehlich JM, Galt NJ, Biga PR. Inbred strains of zebrafish exhibit variation in growth performance and myostatin expression following fasting. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 2013;164:1-9.
13. Lawrence C, Best J, James A, Maloney K. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture* 2012;368-369:103-108.
14. Lawrence C. New frontiers for zebrafish management. In *Methods in Cell Biology*. pp. 483-508, Vol 135. Elsevier Ltd, 2016.
15. Turra EM, de Oliveira DAA, Valente BD, Teixeira E de A, Prado S de A, de Melo DC, et al. Estimation of genetic parameters for body weights of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* using random regression models. *Aquaculture* 2012;354-355:31-37.
16. Xu K, Duan W, Xiao J, Tao M, Zhang C, Liu Y, et al. Development and application of biological technologies in fish genetic breeding. *Sci China Life Sci* 2015;58:187-201.
17. Gjedrem T. Improvement of Productivity through Breeding Schemes. *GeoJournal* 1985;10:233-241.

18. Eknath AE, Bentsen HB, Ponzoni RW, Rye M, Nguyen NH, Thodesen J, *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: Composition and genetic parameters of a synthetic base population of *Oreochromis niloticus* for selective breeding. *Aquaculture* 2007;273:1-14.
19. In V Van, Sang V Van, O'Connor W, Van PT, Dove M, Knibb W, *et al.* Are strain genetic effect and heterosis expression altered with culture system and rearing environment in the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*)? *Aquac Res* November 2016:1-12.
20. Garcia ALS, de Oliveira CAL, Karim HM, Sary C, Todesco H, Ribeiro RP. Genetic parameters for growth performance, fillet traits, and fat percentage of male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Appl Genet* 2017;58:527-533.
21. Sang N Van, Klemetsdal G, Ødegård J, Gjøen HM. Genetic parameters of economically important traits recorded at a given age in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquaculture* 2012;344-349:82-89.
22. Yáñez JM, Lhorente JP, Bassini LN, Oyarzún M, Neira R, Newman S. Genetic co-variation between resistance against both *Caligus rogercresseyi* and *Piscirickettsia salmonis*, and body weight in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 2014;433:295-298.
23. Spiegelhalter DJ, Best NG, Carlin BP, van der Linde A. Bayesian measures of model complexity and fit. *J R Stat Soc Ser B Statistical Methodol* 2002;64:583-639.
24. Misztal I, Tsuruta S, Lourenco DAL, Aguilar I, Legarra A, Vitezica Z. Manual for BLUPF90 Family Programs. University of Georgia, Athens, 2015.
25. Heidelberger P, Welch P. Simulation run length control in the presence of an initial transient. *Oper Res* 1983;31:1109-1144.
26. Plummer M, Best N, Cowles K, Vines K. CODA: convergence diagnosis and output analysis for MCMC. *R News* 2006;6:7-11.
27. Lawrence C, Ebersole JP, Kesseli R V. Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Biol Fishes* 2007;81:239-246.
28. Lawrence C, Mason T. Zebrafish Housing Systems: A Review of Basic Operating Principles and Considerations for Design and Functionality MS [Aquatic Resources Program Manager] and Boston Children's Hospital.
29. Guan J, Hu Y, Wang M, Wang W, Kong J, Luan S. Estimating genetic parameters and genotype-by-environment interactions in body traits of turbot in two different rearing environments. *Aquaculture* 2016;450:321-327.
30. de Oliveira CAL, Ribeiro RP, Yoshida GM, Kunita NM, Rizzato GS, de Oliveira SN, *et al.* Correlated changes in body shape after five generations of selection to improve growth rate in a breeding program for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in Brazil. *J Appl Genet* 2016;57:487-493.
31. Nguyen NH, Ponzoni RW, Abu-Bakar KR, Hamzah A, Khaw HL, Yee HY. Correlated response in fillet weight and yield to selection for increased harvest weight in genetically improved farmed tilapia (GIFT strain), *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 2010;305:1-5.
32. Khaw HL, Ponzoni RW, Yee HY, Aznan Bin Aziz M, Bijma P, Aziz MA bin, *et al.* Genetic and non-genetic indirect effects for harvest weight in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 2016;450:154-161.
33. Janhunen M, Kause A, Vehviläinen H, Nousiainen A, Koskinen H. Correcting within-family pre-selection in genetic evaluation of growth—A simulation study on rainbow trout. *Aquaculture* 2014;434:220-226.

34. Falconer D. Introdução À Genética Quantitativa. UFV, Viçosa, 1987.
35. Bentsen HB, Gjerde B, Nguyen NH, Rye M, Ponzoni RW, Palada de Vera MS, *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: Genetic parameters for body weight at harvest in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during five generations of testing in multiple environments. *Aquaculture* 2012;338-341:56-65.
36. Lyu D, Wang W, Luan S, Hu Y, Kong J. Estimating genetic parameters for growth traits with molecular relatedness in turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus). *Aquaculture* 2017;468:149-155.
37. Mizgirev I, Revskoy S. Generation of clonal zebrafish lines and transplantable hepatic tumors. *Nat Protoc* 2010;5:383-394.

V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A falta de padronização dos exemplares de zebrafish e a produção de linhagens destinadas ao uso laboratorial tem gerado grandes discussões na comunidade científica. Por exemplo, os roedores que são os modelos animais mais utilizados, são produzidos em laboratórios, em condições controladas, com padronização genética e fenotípica. Isso nem sempre acontece com o zebrafish, que muitas vezes são adquiridos em pisciculturas ou pet shops, sem o conhecimento de fatores como genética, idade, características comportamentais, entre outros.

Dependendo da pesquisa realizada, a semelhança entre os animais do lote é fundamental para obter resultados satisfatórios e concisos, possibilitando a publicação dos dados em revistas científicas de alto impacto. A falta desse produto no mercado nacional, faz com que muitos pesquisadores brasileiros tenham que recorrer a linhagens produzidas no exterior, principalmente nos Estados Unidos (EUA), encarecendo e dificultando o processo, tendo em vista todos os trâmites de importação.

Os resultados deste trabalho demonstram que os exemplares de zebrafish adquiridos em diferentes locais do Brasil apresentam variação genética e que isso pode influenciar na sua capacidade reprodutiva, devendo ser levado em consideração principalmente em pesquisas que visam a avaliação de algum efeito específico em parâmetros como ovos liberados por fêmea e produção de larvas.

O melhoramento genético pode ser empregado na produção de uma linhagem brasileira. Em conjunto, é possível obter animais com padronização fenotípica e maior crescimento, em virtude das características testadas (peso e comprimento total) e seus resultados. Animais maiores podem promover o aumento da eficiência do zebrafish em pesquisas que são realizadas coletas de sangue, além poder melhorar a sobrevivência na fase larval, o qual é o grande entrave do ciclo produtivo desse peixe. No entanto, é

necessário a continuidade de estudos que avaliem o crescimento dos animais e larvas obtido pelo melhoramento genético nesses parâmetros.