

## IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO NA REGIÃO - 204 A 590 DO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH) EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) FORMADAS POR SELEÇÃO MASSAL.

NATALIA OSSA HERNÁNDEZ<sup>1,2</sup>; HAROLD JULIÁN PEREZ GUTIERREZ<sup>2</sup>;  
FRANCINE BASTOS MAAGH<sup>2</sup>; CARLA GIOVANE AVILA MOREIRA<sup>2</sup>; NATALIA  
MENEZES CERQUEIRA<sup>3</sup>; HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Santa Rosa de Cabal/ Colômbia-nattio.biologia@gmail.com

<sup>2</sup> Laboratório de engenharia Genética Animal, Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do leão s/nº, caixa postal 354, CEP:96010-900, Pelotas RS; – hajupegu@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), San Gabriel RS.

<sup>4</sup> Professor adjunto do Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, – hedem.luiz@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) pertence ao gênero *Oreochromis* da família Cichlidae (MOREIRA et al., 2002). É um dos peixes mais cultivados em praticamente todo o mundo, por várias razões dentre elas, trata-se de um peixe que aceita uma variedade grande de alimentos, é resistente a doenças, pode ser cultivado em grande número, e tolera baixos níveis de oxigênio dissolvido (DOS SANTOS et al, 2006).

Para manter as características produtivas da espécie tais como tamanho, rápido crescimento e peso corporal, têm sido realizados programas de reprodução utilizando metodologias de criação seletiva, através de métodos de seleção que permitem conservar os indivíduos com melhor peso e tamanho. Uma das metodologias mais utilizadas é a seleção massal ou individual. Na maioria dos casos uma característica relacionada ao crescimento como o peso corporal é o objetivo desta seleção, sendo por sua vez uma característica de herdabilidade relativamente alta (GJEDREM; BARANSKI, 2009).

Com esta metodologia, existe um risco significativo de que grande parte dos reprodutores selecionados apresente alguma relação com suas famílias na hora de praticar a seleção. Com isso, é provável que ao longo da história da aquicultura muitos programas de reprodução tem fracassado, visto que a seleção intensiva em cada geração sem informação genealógica resulta em um aumento da endogamia, e com isso, na redução do ganho genético e a viabilidade dos indivíduos (GJEDREM; BARANSKI, 2009).

Além disso, a aplicabilidade de metodologias deste tipo não assegura o controle dos parâmetros genéticos na população gerando redução na variabilidade genética e aumento da consanguinidade, portanto, devem ser executadas pesquisas que permitam avaliar as condições genéticas das populações dos programas de reprodução (KOCOUR; KOHLMANN, 2011).

Isto pode ser alcançado pela avaliação de genes muito conservados nas espécies. Neste caso, genes relacionados ao crescimento, pelo que é a característica básica aplicada à seleção dos indivíduos nos programas de reprodução.

O Hormônio do crescimento (*GH*) em peixes e demais vertebrado promove o crescimento, regula a resposta imune, a reprodução e a homeostase. Estas ações são iniciadas pela união a seu receptor específico, o *GHR* (GAO et al., 2011). O *GH* é ativado pelo produto do gene do fator de transcrição específico à pituitária (*Pit-1*). Em tilápia o *GH* estimula a adaptação à água salgada e tem sido estudado amplamente para aplicações na aquicultura, mostrando que as regiões não codificantes do gene *GH* são polimórficos enquanto as regiões codificantes são altamente conservadas (MA et al., 2012). Estudos tem demonstrado que microssatélites em regiões promotoras de genes ligados ao crescimento afetam a expressão e consequentemente o crescimento dos peixes (STREELMAN; KOECHER, 2002).

Estes estudos podem ser desenvolvidos através da identificação de polimorfismos, microssatélites ou sequenciamento de DNA, utilizando a técnica da Reação em cadeia da polimerase PCR. Pelo anteriormente exposto o objetivo deste trabalho é identificar polimorfismos em um locus gênico do gene do hormônio de crescimento em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) formadas por seleção massal.

## 2. METODOLOGIA

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Engenharia Genética Animal da Universidade Federal de Pelotas período de Julho a outubro de 2013. Foram utilizados 225 exemplares de tilápia (*Oreochromis niloticus*) de um programa de melhoramento genético da empresa piscicultura AQUABEL.

O DNA foi extraído utilizando nadadeira caudal seguindo o protocolo de Cloreto de sódio (NaCl). O DNA foi verificado utilizando gel de Agarose 1%, corado com *Gelred* (Biotium) e visualizado em foto-documentador L-Pix (Loccus Biotecnologia). Foram desenhados primers usando o programa Primer 3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>), com a finalidade de amplificar a região desde o nucleotídeo 204 até o nucleotídeo 590 do gene do Hormônio de crescimento (M84774.1), a partir da sequência depositada no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). O tamanho do amplicom corresponde a 386 pb. A temperatura de anelamento para a realização da PCR foi de 57,1°C. Para detectar diferenças ou alterações na sequência de nucleotídeos das 225 amostras foi feito pela técnica de Polimorfismo de conformação de cadeia simples (PCR- SSCP) no qual os produtos de PCR foram desnaturados colocando 2 µl de buffer de desnaturação em 2 µl de produto de PCR colocadas por 10 minutos a 95° e aplicados em gel de poliacrilamida ao 10%, realizando um tingimento com nitrato de prata e visualizados em Transiluminador de luz branca (Clare chemical,USA) e fotografados para registro.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os indivíduos amplificaram no tamanho esperado, na figura 1 podem se observar alguns dos indivíduos amplificados. Na PCR-SSCP foram encontrados quatro padrões de bandas, os quais apresentaram alta frequência nos 225 indivíduos avaliados. Na figura 2 se observam os quatro padrões de bandas identificados. Estes padrões foram enviados para o sequenciamento para confirmar a presença de polimorfismos e o tipo de polimorfismo encontrado na região avaliada.

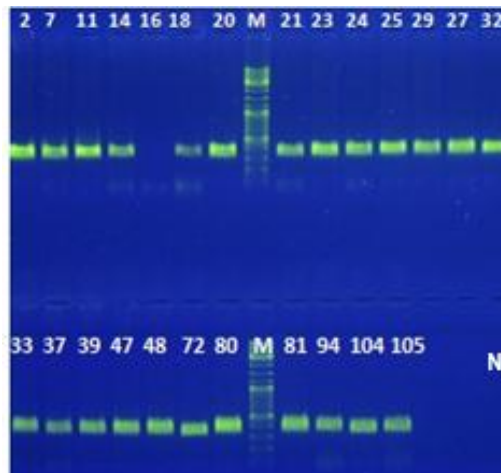


Figura 1. Indivíduos amplificados com os primers desenhados. M- Marcador. N- Controle negativo. Numeração-etiqueta dos indivíduos.

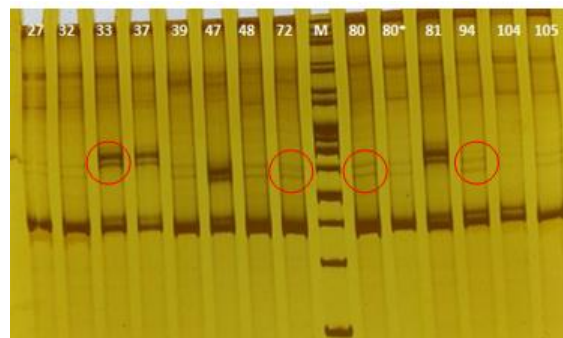


Figura 2. Padrões de bandas identificados pela técnica PCR-SSCP (Em círculos os quatro padrões de bandas). Numeração- Etiqueta dos indivíduos. M- Marcador.

#### 4. CONCLUSÕES

Estudos de polimorfismos de genes conservados nas espécies são importantes porque permitem dar uma ideia da variabilidade genética presente em indivíduos cultivados e estes resultados, confrontados com dados de crescimento e peso corporal podem determinar os efeitos causados pelas metodologias de seleção sem controle genético sobre genes muito conservados nas espécies. Este tipo de informação pode ser utilizado para estabelecer estratégias de manejo para a conservação da diversidade das espécies e a diminuição da endogamia nestes programas de melhoramento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOS SANTOS, Vander Bruno; FIRETTI, Ricardo; SALES, Dalton Skajko. As tilápias não todas são iguais. Instituto FNP. ANUALPEC. n.11. p. 284-286. 2006.

GAO, Y. F., LU, M. X., YE, X., HUANG, H. Z., WANG, H., ZHU, H. P., YANG, L. P. Identification and expression analysis of two growth hormone receptors in zanzibar tilapia (*Oreochromis hornorum*). *Fish Physiol Biochem* v. 37. p 553–565. 2011.

GJEDREM, T., BARANSKI, M. Structure of breeding programs. In *Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction. Reviews: Methods and Technologies in Fish Biology and Fisheries*. Cap. 12. P 131-141. 2009

KOCOUR, M., KOHLMANN, K. Growth Hormone gene polymorphisms in tech, *Tinca Tinca l.* *Aquaculture*.v 310. p 298-304. 2011

MA, Q., LIU, S., ZHUANG, Z., LIN, L., SUN, Z., LIU, C., MA, H., SU, Y., TANG, Q. Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the growth hormone (*GH*) gene in female and male Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Gene*. v 493, p 92–104. 2012.

MOREIRA, H, L, M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R, P.; ZIMMERMANN, S.; **Fundamentos da moderna Aquicultura**. Canoas: Ed: Ulbra, 2002.

STREELMAN, J.T.; KOECHER, T.D. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia. *Physiol. Genomics*, vol. 9, n.1, p,1-4, 2002.