

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Polimorfismo no gene do hormônio do crescimento (GH) em tilápias GIFT

Stefania Caroline Claudino da Silva¹, Fernanda Tanamati¹, Grazyella Massako Yoshida¹, Maria Del Pilar Rodriguez-Rodriguez¹, Carlos Souza do Nascimento², Eliane Gasparino³

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEM, Maringá-Pr. e-mail: stefaniacaroline@gmail.com, ftanamati@hotmail.com, grazyoshida@hotmail.com, rodrigopilar@gmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFV, Viçosa. e-mail: carsouza_rj@hotmail.com

³Departamento de Zootecnia – UEM, Maringá-Pr. e-mail: egasparino@uem.br

Resumo: Nas tilápias da espécie *Oreochromis niloticus*, há presença de dois genes que codificam para o hormônio do crescimento (GH1 e GH2). Para a realização deste trabalho, utilizou-se 200 animais com idade de aproximadamente 70 dias. O DNA foi extraído de amostras de nadadeira caudal, por meio de extração alcalina. Foram obtidos dois fragmentos com 652 e aproximadamente 700 pares de base, sendo que os fragmentos com 700 pb, ainda não haviam sido descritos na literatura. Os fragmentos foram classificados como banda simples (88,78%) e dupla (11,22%) de acordo com o padrão da amplificação. O produto da amplificação encontrado mostra diferença maior do que o descrito na literatura, o que sugere a presença de um novo polimorfismo.

Palavras chave: GH1, GH2, *Oreochromis niloticus*

Search polymorphism in the growth hormone in tilapia GIFT

Abstract: In *Oreochromis niloticus*, there is the presence of two genes encoding growth hormone (GH1 and GH2). For this work, we used 200 animals with approximately 70 days of age. For extraction of genomic DNA were used fragments of caudal fin and alkaline extraction. We found fragments with 652 and 700 base pairs approximately, and the fragments with 700 bp, had not yet been described in literature. The fragments were classified as single (88.78%) and double (11.22%) band in accordance with the pattern of amplification. The amplification product generated has fragment size bigger than described in the literature, suggesting the presence of a new polymorphism.

Keywords: GH1; GH2; *Oreochromis niloticus*

Introdução

Em tilápias, um evento relativamente recente promoveu a duplicação do gene que codifica o hormônio do crescimento (GH). O transcrito secundário GH2 é codificado por 1662 pb, e é 4 pb mais curto que o transcrito primário GH1, que contém 1666 pb. Por apresentarem 99% de homologia, acredita-se que GH1 e GH2 codifiquem um polipeptídeo idêntico (Ber & Daniel, 1992; 1993). Ao comparar as duas sequências, a única diferença em tamanho observada deriva de uma região localizada dentro do íntron 2, em que existe uma diferença na quantidade de uma repetição de CTGT (Ber & Daniel, 1992; 1993). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi buscar polimorfismos dentro da região com divergência de 4 pb para GH1 e GH2 em tilápias GIFT.

Material e Métodos

Foram utilizados 200 animais com idade aproximada de 70 dias, provenientes da estação de piscicultura da Universidade Estadual de Maringá – Pr. Fragmentos de nadadeira caudal foram coletados, acondicionados em etanol 90% e armazenados em freezer a -20°C. A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de extração alcalina, descrito por (Rudbeck & Dissing, 1998), com adaptações. Um par de primers específicos (5' –CAGCGGTGTTTTTCATGT-3' e 5' –CGGTTCCCTTGACATCAAAT-3') foi desenhado, flanqueando os éxons 1 e 2, conforme sequência depositada no GenBank (número de acesso M97766). A amplificação do DNA foi feita para um volume final de reação de 15 µL e programa de amplificação específico (desnaturação a 95°C por quatro minutos, 35 ciclos de 30 s a 95°C, dois minutos de anelamento a 68°C e 1 minuto e 30 s de extensão a 72°C. Uma extensão final de 72°C por 4 min também será realizada). Os produtos da amplificação foram avaliados em gel de agarose a 2,0%, revelada com 0,5 µg/mL de brometo de etídio, e comparados ao

padrão de peso molecular de 100 pb. Foram observados diferentes tamanhos de fragmentos e avaliada a frequência em que estes fragmentos amplificados apareceram, sendo estes os primeiros dados deste polimorfismo descritos na literatura para tilápia GIFT.

Resultados e Discussão

Os primers utilizados foram desenhados para amplificar GH1 e GH2, em uma região que abrange os éxons um e dois, e uma diferença de 4 pb do íntron dois (Figura 1).

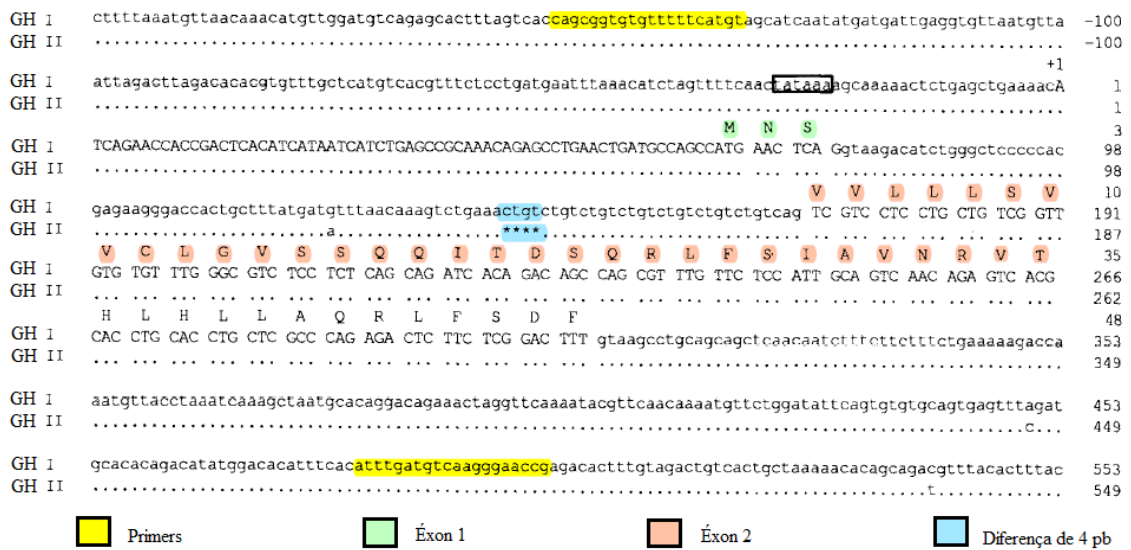


Figura 1. Adaptado de Ber & Daniel, 1993. Em amarelo - Região de anelamento dos primers. Em verde - Éxon um. Em vermelho - Éxon dois. Em azul - diferença de 4 pb entre GH1 e GH2.

A amplificação via PCR produziu fragmentos de aproximadamente 652pb e 700pb, sendo que o fragmento de aproximadamente 700pb não havia sido descrito até então na literatura. Os fragmentos obtidos foram classificados como banda simples, quando houve apenas um fragmento amplificado com 652pb, e banda dupla quando o animal apresentou os dois fragmentos, de 652 e 700pb, respectivamente (Figura 2), sugerindo a existência de um novo polimorfismo na região alvo do gene GH em tilápias do Nilo.

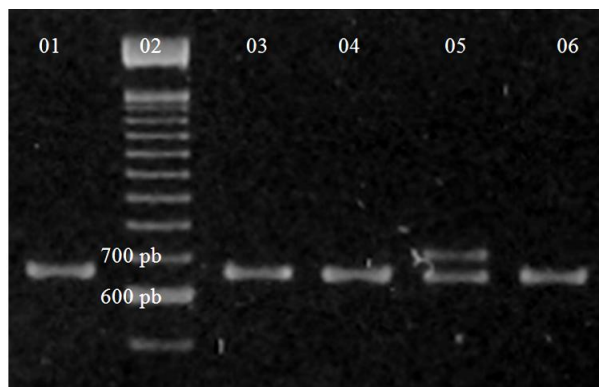
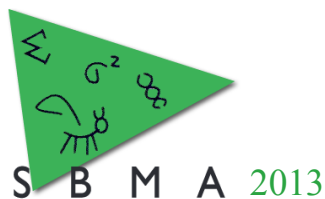


Figura 1. Polimorfismo do gene GH1 e GH2. Canaletas 01, 03, 04 e 06 banda simples. Canaleta 05 banda dupla. Canaleta 02 Padrão de 100pb.



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Dos 200 animais da linhagem GIFT avaliados 11,22% apresentaram amplificação para os dois fragmentos, sendo classificados como animais de banda dupla. Nesta população, 88,78% dos animais apresentaram amplificação apenas para o fragmento de 652pb, e foram classificados como animais de banda simples. A estrutura do gene que codifica o GH em tilápias é semelhante à de salmonídeos, com um íntron e um éxon a mais que carpas e mamíferos. O transcrito principal é, no entanto, cerca de metade do tamanho da dos salmonídeos.

A duplicação de genes desempenha uma função importante no processo evolutivo (Ohno, 1970). Muitas vezes, a segunda cópia de um gene é livre de pressão selectiva e sofre mutações mais rápido que um gene funcional ao longo de gerações de organismos, porém sem efeitos deletérios ao animal. Entretanto, algumas duplicações podem ser funcionais, e produzir transcritos diferentes, como descrito por Lafont et al, (2007), podendo, quando conveniente, ser usados em programas de seleção para o melhoramento genético.

Conclusões

A presença deste polimorfismo até então não descrito possibilita a realização de novos estudos para validação do mesmo, além de pesquisas de variação genética e de sua associação com características de crescimento em tilápias.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES e ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia-UEM

Literatura citada

Apresentar na **Literatura Citada** (seis referências, no máximo) em ordem alfabética, seguindo as normas da Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, que pode ser acessada pelo Portal da Sociedade Brasileira de Zootecnia (http://www.sbz.org.br/files/normas_pt/9.pdf).

BER, R AND DANIEL, V. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. **Gene**, v.15-113(2), p.245-50, 1992.

BER, D.; DANIEL, V. Sequence analysis suggests a recent duplication of the growth hormone-encoding gene in *Tilapia nilotica*. **Genetics**, v.125, p.143-150, 1993.

OHNO, S. **Evolution by Gene Duplication**, Springer. 1970.

LAFONT, A.G.; DUFOUR, S.; FOUCHEREAU-PERON, M. Evolution of the CT/CGRP family: comparative study with new data from models of teleosts, the eel, and cephalopod molluscs, the cuttlefish and the nautilus. **General and comparative endocrinology**, v.153(1-3), p.155-69, 2007.

RUDBECK, L.; DISSING, J.; Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. **BioTechniques** 25, 588–92p, 1998.