

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Caracterização da frequência de um polimorfismo no gene do hormônio do crescimento em tilápias do Nilo da linhagem Saint Peter

André Luiz Seccatto Garcia¹, Guilherme Pereira Schuroff¹, Maria Del Pilar Rodriguez-Rodriguez², Stefania Caroline Claudino da Silva², Fernanda Tanamati², Eliane Gasparino³

¹Graduação em Zootecnia — UEM, Maringá - Pr. e-mail: andreseccatto@hotmail.com, chiko-schuroff@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEM, Maringá - Pr. Bolsistas da CAPES. e-mail: rodrigpilar@gmail.com, stefaniacaroline@gmail.com, ftanamati@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, são eles GH1 e GH2. Buscar polimorfismos nesses genes tem uma importância muito grande, pois esses podem estar associados com características quantitativas, ligadas a cadeia produtiva. Para a realização deste trabalho, utilizou-se 80 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 e dupla de acordo com o padrão da amplificação. Os primers utilizados nesse trabalho, foram desenhados com base em regiões cujos dois genes apresentam uma diferença de apenas 04 pb, porém, o produto da amplificação encontrado mostra diferença maior, o que sugere a presença de um novo polimorfismo.

Palavras chave: GH1, GH2, *Oreochromis niloticus*

Characterization of a polymorphism frequency in the growth hormone in Nile tilapia of Saint Peter strain

Abstract: In *Oreochromis niloticus*, there is the presence of two genes encoding growth hormone, are they GH1 and GH2. Search polymorphisms in these genes have a very great importance, as these may be associated with quantitative traits related production chain. For this work, we used 80 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 and double band in accordance with the pattern of amplification. The primers used in this work were designed based on regions, whose two genes show a difference of 04 bp, but we found a bigger difference, which suggests the presence of a new polymorphism.

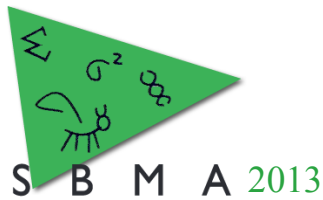
Keywords: GH1; GH2; *Oreochromis niloticus*

Introdução

Em programas de melhoramento genético os genes relacionados ao crescimento corporal são de grande interesse, como o gene do hormônio do crescimento (Kato et al., 2008). Em tilápias da espécie *Oreochromis niloticus* observa-se a presença de dois genes que codificam para o GH, chamados de GH1 e GH2. Polimorfismos nestes genes podem estar associados a características quantitativas, como observado por Blanck et al. (2009). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a existência de polimorfismo para os genes GH1 e GH2 em tilápia do Nilo da linhagem “Saint Peter” chamada de tilápia vermelha, e verificar a frequência do mesmo para esta linhagem.

Material e Métodos

Foram utilizados 80 animais com idade aproximada de 70 dias, provenientes de um piscicultura comercial da cidade de Maringá – Pr. Fragmentos de nadadeira caudal foram coletados, acondicionados em etanol 90% e armazenadas 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



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

específicos (5' –CAGCGGTGTTTTTTCATGT-3' e 5' –CGTTCCCTTGACATCAAAT-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 100pb. Foram avaliados as frequências dos frgmentos amplificados, sendo estes os primeiros dados deste polimorfismo descritos na literatura para esta linhagem de tilápia.

Resultados e Discussão

Os primers desenhados para amplificar o gene do hormônio do crescimento (GH) da tilápia foram eficientes produzindo fragmentos de aproximadamente 652pb e 700pb, sendo que o fragmento de aproximadamente 700pb não havia sido descrito até então na literatura. Os fragmentos obtidos pela técnica de PCR 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 1).

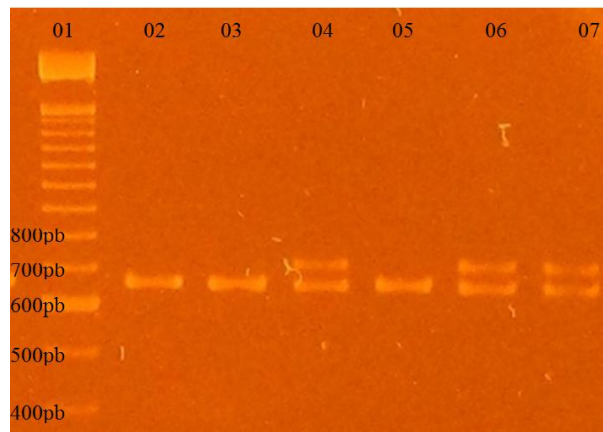


Figura 1. Polimorfismo do gene GH1 e GH2. Canaletas 02, 03 e 05 banda simples. Canaletas 04, 06 e 07 banda dupla. Canaleta 01 Padrão de 100pb.

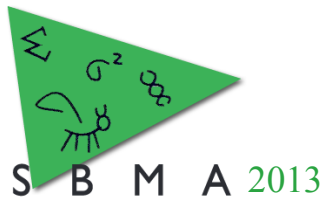
Dos 80 animais da linhagem Saint Peter avaliados 37,5% apresentaram amplificação para os dois fragmentos, e classificados como animais de banda dupla. Nesta população, 62,5% dos animais apresentaram amplificação apenas para o fragmento de 652pb, e classificados como animais de banda simples.

Diferente da maioria das espécies, a tilápia do Nilo possui dois genes que codificam o hormônio do crescimento. Estes dois genes, chamados GH1 e GH2, são uma consequência de um evento de duplicação relativamente recente, sendo ambos altamente homólogos, e codificam um polipeptídeo idêntico (Ber & Daniel, 1992; 1993).

Os primers para o GH nesse estudo foram desenhados em uma região onde os dois genes apresentam uma diferença de 04 pares de base, devendo os fragmentos amplificados apresentar 648 ou 652pb. Entretanto, uma diferença maior em pares de bases foi verificada (Figura 1), sugerindo a existência de um novo polimorfismo na região alvo do gene GH em tilápias do Nilo.

Conclusões

Com base no tamanho dos fragmentos encontrados, novos estudos são necessários para verificar se ambos os genes ainda codificam um polipeptídeo idêntico, como descrito por Ber & Daniel (1992; 1993), uma vez que os primers foram desenhados flanqueando 2 éxons.



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

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

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.

BLANCK, D.V.; GASPARINO, E.; RIBEIRO, R.P. et al. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia do Nilo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.44, p.599-604, 2009.

KATOH, K.; KOUNO, S.; OKAZAKI, A. et al. Interaction of GH polymorphism with body weight and endocrine functions in Japanese black calves. **Domestic Animal Endocrinology**, v.34, p.25-30, 2008.

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.