

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

POLIMORFISMO NO ÍNTRON 1-*Pst*I DO GENE DO  
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM LINHAGENS DE  
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Autora: Danielly Veloso Blanck  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Março-2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

POLIMORFISMO NO ÍNTRON 1-*Pst*I DO GENE DO  
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM LINHAGENS DE  
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Autor: Danielly Veloso Blanck  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Março-2008

“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos.

A gente pode dormir numa cama mais ou menos, comer um feijão mais ou menos, ter um transporte mais ou menos, e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro.

A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos...

Tudo bem!

O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum...  
é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos.

Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.”

*Chico Xavier*

Aos

meus pais, Rainhart e Laurenice,  
minha eterna gratidão, admiração e  
respeito pelo exemplo de dedicação, simplicidade,  
carinho e amor aos valores da vida

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao *Deus*, por me proporcionar valiosas oportunidades e por colocar em meu caminho pessoas fascinantes.

Aos meus *Pais*, **Rainhart Blanck e Laurenice Veloso**, por estarem sempre ao meu lado apoiando e mostrando-me os melhores caminhos a serem seguidos, nunca medindo esforços para meu sucesso pessoal.

Ao meu *Orientador*, prof. Dr. **Ricardo Pereira Ribeiro**, por depositar confiança no meu trabalho, pela orientação segura, atenção constante e amizade. Uma pessoa admirável, exemplo de caráter e honestidade.

À minha “*Orientadora extra-oficial*” e *amiga*, profa. Dra. **Eliane Gasparino**, por todo o profissionalismo, competência e dedicação fundamentais ao sucesso deste trabalho. Uma pessoa essencial na minha vida acadêmica-científica, sem a qual, dificilmente teria o pouco do conhecimento sobre Biologia Molecular que hoje tenho.

À profa. Dra. **Maria Amélia Menck Soares**, da UNIOESTE, pela orientação prática auxiliando a implementação da técnica PCR-RFLP e pela paciência durante os ensinamentos.

À *amiga* **Débora Sommer Marques**, pela valiosa contribuição tanto intelectual como na execução prática do trabalho, assim como pelos momentos de descontração.

Aos *colegas de laboratório* **Rejane, Alessandra, Michele e Denise**, que muito contribuíram na execução do trabalho.

Aos *colegas e amigos* do grupo PeixeGen, **Alexandra, Luiz Alexandre, Darci e Ana Cláudia** pelos bons momentos de bate-papo, troca de conhecimentos e auxílio na parte de campo deste trabalho.

Aos meus grandes *amigos* **Rodrigo de Souza e Rúbia Nunes Pereira**, pela fiel amizade, pelas cervejinhas no fim do dia e pelos lanchinhos nos fins de semanas que me internei no laboratório.

Aos *funcionários* da estação de piscicultura, **Vitor, Geraldo e Cleiton** e à *técnica de laboratório* **Zeni**, que muito me ajudaram.

Aos meus *professores* durante o mestrado, em especial o prof. Dr. **Elias Nunes Martins**, pelos valiosos ensinamentos.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ) e Departamento de Zootecnia (DZO).

Aos funcionários do PPZ e do DZO.

Ao *CNPq* (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa concedida.

*...Enfim, agradeço a todos que encontrei nesta caminhada, mesmo que o nome eu não tenha mencionado, e que de alguns nem recorde os nomes, rostos e atos...Todos os encontros me proporcionaram uma mudança na minha vida...Portanto...*

***Muito Obrigada a Todos!!!***

## BIOGRAFIA

DANIELLY VELOSO BLANCK, filha de Rainhart Blanck e Laurenice Veloso. Nasceu no município de Cascavel, Estado do Paraná, aos 21 dias do mês de janeiro de 1983.

Em fevereiro de 2006 concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá, tendo realizado maior parte dos seus estudos na área de Biologia Molecular aplicada à produção animal.

Em fevereiro do mesmo, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Piscicultura.

No dia 31 de março de 2008, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.



## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE QUADROS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
I. INTRODUÇÃO GERAL .....	5
1.1. Aqüicultura mundial e brasileira .....	5
1.2. Breve histórico sobre as tilápias no Brasil .....	6
1.3. Marcadores genéticos .....	8
1.4. Hormônio do crescimento em peixes .....	10
1.5. Gene do hormônio do crescimento de peixes .....	12
1.6. Polimorfismos do gene GH e sua associação às características de produção .....	13
1.7. Referências .....	14
II. OBJETIVOS GERAIS .....	18
III. VARIABILIDADE DO GENE GH1 DE LINHAGENS DE TILÁPIA NILÓTICA ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	19
Abstract .....	19
Introdução .....	19
Material e Métodos .....	20
Resultados .....	23
Discussão .....	25

Agradecimentos .....	27
Referências .....	27
IV. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GH1- <i>PstI</i> DE LINHAGENS DE TILÁPIA DO NILO AS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO .....	30
Abstract .....	30
Introdução .....	31
Material e Métodos .....	32
Resultados e Discussão .....	35
Conclusões .....	39
Referências .....	39

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição dos alelos <i>GH1-PstI</i> e frequências genóticas entre as linhagens de tilápia do Nilo e valores de probabilidade (P) do teste Qui-quadrado para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg...	24
Tabela 2. Valores de $F_{IS}$ e $F_{ST}$ calculados para o loco <i>GH1-PstI</i> das linhagens Chitralada e GIFT de tilápia do Nilo .....	24
Tabela 1'. Médias e coeficientes de variação (CV) das características de desempenho das linhagens de tilápia do Nilo e dos genótipos <i>GH1-PstI</i> .....	37
Tabela 2'. Médias para o rendimento de filé (RF) obtidas pelo efeito de interação entre os genótipos <i>GH1-PstI</i> e as linhagem de tilápia do Nilo .....	37

## LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. <i>Primers</i> desenhados para as ampliações de PCR do gene GH1 de tilápia do Nilo .....	33

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Análise em gel de agarose 1,0% corado em brometo de etídeo do fragmento amplificado do gene GH1 de tilápia do Nilo .....	23
Figura 1'. Figura esquemática representando a posição do par de <i>primers</i> GH1-1 (indicada pelas setas) para a amplificação de um fragmento de 652 pb do gene GH1 de tilápia do Nilo e sítio de restrição <i>PstI</i> conforme sequência referência .....	34
Figura 2. Análise em gel de agarose 1,0% corado em brometo de etídeo da amplificação dos pares de <i>primers</i> desenhados para amplificar diferentes regiões do gene GH1 de tilápia do Nilo .....	36

## RESUMO

Os estudos em genética molecular estão se tornando mais comuns na tilapicultura, pois a tilápia do Nilo apresenta grande potencial em termos de engenharia genética voltada ao melhoramento dos estoques. Com o desenvolvimento de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) têm aumentado a necessidade de identificá-las, visando a manutenção e certificação da qualidade do material genético de linhagens melhoradas adquiridas pelos produtores. Melhoria das taxas de crescimento natural de peixe na aquicultura tem sido um dos aspectos mais importantes para a produção de tilápia em sistemas de produção intensivos. Este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade genética de linhagens de tilápia do Nilo, visando a identificação e certificação do material genético utilizado na produção de tilápia em sistemas de produção intensivos. Para isso, foram coletadas amostras de tilápia do Nilo em diferentes regiões do Brasil e analisadas por técnicas de genética molecular. Os resultados obtidos indicam a existência de alta diversidade genética entre as linhagens analisadas, o que sugere a necessidade de maior controle e certificação do material genético utilizado na produção de tilápia em sistemas de produção intensivos. Este trabalho contribui para a melhoria da qualidade do material genético utilizado na produção de tilápia em sistemas de produção intensivos, visando a obtenção de peixes com maior produtividade e resistência a doenças.

com base na seqüência-referência disponível do GenBank (acesso M97766). Os produtos de PCR gerados foram digeridos com a enzima *PstI*, com sítio de restrição localizado no íntron 1 do gene GH1. As freqüências alélicas, genótípicas, índices de heterozigosidade, teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e estatística F foram determinadas com o auxílio do programa Popgen 1.31. A análise de associação entre o polimorfismo e as características de desempenho foi avaliada pelo procedimento GLM do SAS. Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) foi utilizado para as variáveis que apresentaram efeito de interação entre linhagem e genótipo. Os três pares de *primers* desenhados amplificaram satisfatoriamente nas duas linhagens, produzindo fragmentos de 652, 441 e 396 pb. Para o fragmento de 652 pb, observou-se os três padrões de digestão possíveis tanto para a linhagem Chitralada como para a GIFT, correspondendo aos genótipos  $PstI^{+/+}$ ,  $PstI^{+/-}$  e  $PstI^{-/-}$ . As freqüências genótípicas encontradas para a linhagem Chitralada foram 0,707, 0,282 e 0,011, respectivamente para os genótipos  $PstI^{+/+}$ ,  $PstI^{+/-}$  e  $PstI^{-/-}$  e para a linhagem GIFT, 0,930, 0,075 e 0,005 para os mesmos genótipos. As freqüências alélicas obtidas neste estudo (GH1-*PstI*) mostram que o  $PstI^+$  é dominante na tilápia do Nilo. A linhagem Chitralada ( $H_o=0,282$ ) apresentou maior heterozigosidade que a linhagem GIFT ( $H_o=0,065$ ), tendo, portanto maior variabilidade para o loco em questão. O índice de diferenciação ( $F_{ST}$ ) das linhagens foi de 0,038. As freqüências alélicas nas duas linhagens se mostraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quanto a análise de associação dos polimorfismos as características de produção, não houve correlação somente para CC e RF. Sendo que as maiores médias foram verificadas para os animais portadores do genótipo heterozigoto. Somente para a característica RF houve efeito de interação entre genótipo e linhagem, ao ponto que a linhagem GIFT com genótipo homozigoto  $PstI^{+/+}$  foi 2,72% superior em relação ao genótipo heterozigoto  $PstI^{+/-}$ . Dentro de cada genótipo, a linhagem Chitralada foi superior. Com os resultados aqui obtidos, sugere-se que a associação das características de desempenho de linhagens de tilápia do Nilo ao polimorfismo genético do GH1 pode ser devido ao efeito da regulação do próprio gene do hormônio do crescimento. Posteriores identificações detalhadas da estrutura dos polimorfismos GH1-*PstI* podem revelar ligação entre os RFLPs descritos e as características controladas pelo GH, a qual pode contribuir para a aplicação de MAS no programa de melhoramento genético de tilápias.

**Palavras-chave:** enzima de restrição, hormônio do crescimento, PCR-RFLP, seleção, variabilidade

## ABSTRACT

Molecular genetics studies are becoming more common in tilapicultura, because the Nile tilapia shows great potential in genetic engineering dedicated to the improvement stocks. With the development of different Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains have been increased the need to identify them, aimed the maintenance and the certification of genetic material quality of improved strains acquired by the producers. Improvement of fish natural growth rates in aquaculture has been widely explored, with gains resulting from improvements in livestock production, nutrition and genetic selection. Due to the high impact of GH in growth regulation and by being involved in several other metabolic functions, the GH gene is a potential target for genetic variation studies and its association with characteristics of fish growth. Thus, this study aimed to: describe the gene intron 1 variability of the growth hormone (GH1) of strains Chitralada and GIFT (Genetically Improvement Farmed Tilapia) from the Nile tilapia through molecular marker PCR-RFLP; study the association of this gene polymorphisms with strains performance characteristics; and seek a molecular marker that could be used in the strains identification and as a selection tool for growth characteristics in genetic improvement programs for the Nile tilapia. 200 animals were used of each strain from witch it was collected fragments of tail fin and the following measurements: total length (CT), standard length (CP), height (AL), width (LA), head length (CC), slaughter weight (PA), fillet weight (PF), fillet yield (RF) and the carcass weight (PC). From collected fin, it was done the genomic material extraction using saturated NaCl (5M). For PCR-RFLP analysis, it was necessary a specific pair of primer design based on the available sequence-reference in the GenBank (access M97766). The generated PCR products were digested with enzyme PstI, with restriction locus located in the intron 1



of the gene GH1. Allelic frequencies, genotypic, rates of heterozygosity, test of the Hardy-Weinberg equilibrium and estatistic F were determined with Popgen 1.31 program. The analysis of the association between the polymorphisms and the performance characteristics were evaluated by the SAS GLM procedure. Duncan test ( $p < 0.05$ ) was used for the variables that showed effect of interaction between genotype and lineage. The three pairs of primers designed amplified satisfactorily in the two strains, producing fragments of 652, 441 and 396 bp. For 652 bp fragment, it was observed the three digestion standard possible for both strains, Chitralada and GIFT, corresponding to the genotypes  $PstI^{+/+}$ ,  $PstI^{+/-}$  and  $PstI^{-/-}$ . The genotypic frequencies found for the Chitralada strain were 0.707, 0.282 and 0.011 respectively for the genotypes  $PstI^{+/+}$ ,  $PstI^{+/-}$  and  $PstI^{-/-}$  and the GIFT strain, 0.930, 0.075 and 0.005 for the same genotypes. The allelic frequencies obtained in this study (GH1- $PstI$ ) show that the  $PstI^+$  is dominant in the Nile tilapia. The Chitralada strain ( $H_o = 0.282$ ) showed greatest heterozygosity to GIFT strain ( $H_o = 0.065$ ), having therefore a higher variability to the locus in question. The index of differentiation ( $F_{ST}$ ) of the strains was 0.038. The allelic frequencies in the two strains were in Hardy-Weinberg equilibrium. About the association analysis of polymorphisms for production characteristics, there was no correlation only for CC and RF. So the major averages were recorded for animals that carriers the heterozygous genotype. Only to the RF characteristic there was an interaction effect between genotype and strain, to the point that the GIFT strain with homozygous genotype  $PstI^{+/+}$  was 2.72 percent higher than the genotype heterozygous  $PstI^{+/-}$ . Within each genotype, the Chitralada strain was higher. With the results obtained here, it is suggested that the combination of performance characteristic of the Nile tilapia strains to the genetic polymorphisms of GH may be due to the effect of the gene regulation of growth hormone. Later detailed identifications of polymorphisms GH1- $PstI$  structure may prove link between RFLPs described and the characteristics controlled by GH, which can contribute to the implementation of MAS in the tilapia genetic programs improvement.

**Key-words:** restriction enzyme, growth hormone, PCR-RFLP, selection, variability

## I. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Aqüicultura mundial e brasileira

A aqüicultura, provavelmente o setor com crescimento mais rápido para produção de alimentos, já responde por quase 50% da alimentação mundial e os peixes são considerados como tendo o maior potencial para satisfazer a procura crescente por alimentos de origem aquática. A aqüicultura mundial cresceu consideravelmente durante os últimos cinquenta anos, partindo de uma produção com menos de um milhão de toneladas, no início dos anos 1950, para 59,4 milhões de toneladas até 2004 (correspondendo ao valor de US\$ 70,3 bilhões de dólares). Nesse período, a aqüicultura mundial cresceu a uma taxa anual de 8,8%, sendo que a América Latina e a região do Caribe tiveram o maior crescimento médio anual, correspondendo a 21,3% (FAO, 2006).

A tilapicultura é uma das mais rápidas e crescentes formas de aqüicultura mundial. As tilápias (família Cichlidae) são peixes de água doce e são nativas do continente Africano (El-Sayed, 2006). No entanto, no ano de 2002, aproximadamente 100 países já praticavam a tilapicultura, sendo que destes, apenas seis dominavam a produção mundial (China, Egito, Filipinas, Indonésia, Tailândia e Taiwan)(FAO, 2006).

Entre os países da América do Sul, o Brasil apresenta o maior crescimento na produção de tilápias e representa o 7º maior produtor de tilápia cultivada no mundo. Durante o período de 1995-2002, a produção de tilápias aumentou de 12.000 para 42.000 toneladas, correspondendo a uma média anual de 20% na taxa de crescimento (FAO, 2004). Em 2004, a produção brasileira atingiu mais de 69 mil toneladas (FAO,

2006) e pode chegar a produzir 125 mil toneladas para o ano 2010, segundo projeções de Ranzani-Paiva et al. (2004).

Dentre as tilápias, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a principal espécie produzida, sendo importante em muitos países por possuir características desejáveis (rusticidade, tolera águas turvas e rasas; razoável resistência a doenças e a parasitas; crescimento rápido, grande adaptação alimentar, boa conversão alimentar e ganho de peso; carne de bom paladar, textura e facilidade na filetagem) e por serem adaptáveis a uma larga extensão de sistemas de cultivo; desde tanques de pequena escala com alimentação deficiente até sistemas de cultivo intensivos.

Este rápido avanço da tilapicultura no Brasil e no mundo tem provocado a intensificação dos sistemas de cultivos, a qual vem associada à demanda por pesquisas nas áreas de genética, nutrição, reprodução e manejo. Uma das conseqüências desta intensificação é a busca por linhagens de desempenho superior. Várias linhagens de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) têm surgido no mundo contribuindo para a competitividade do mercado, dentre as quais se destacam a Chitralada, a Vermelha, a GST (*GenoMar Supreme Tilapia*) e recentemente a linhagem GIFT (*Genetically Improvement Farmed Tilapia*), desenvolvida pelo WorldFish Center.

## 1.2. Breve histórico sobre as tilápias no Brasil

A utilização de espécies introduzidas na aquicultura não é uma prática recente, não havendo registro quanto ao momento em que a carpa comum, nativa da China, chegou à Indonésia. O mesmo aconteceu com a tilápia moçâmbica na Indonésia. Entretanto, com os transportes aéreos e o aumento do comércio global, a taxa de introduções aumentou nos últimos anos (FAO, 2006).

A tilápia foi introduzida no Brasil na década de 50, passando por um período em que era indesejável e foi até considerada como praga. Contudo, na década de 90, fundamentada em novas tecnologias de exploração e melhor orientação técnica, sua criação vem se expandido, especialmente nos estados de São Paulo e Paraná (Moreira, 1999).

Segundo Castagnolli (1992) a primeira espécie do grupo das tilápias introduzida no Brasil foi a *Tilapia rendalli*, em 1953, a qual foi obtida no Congo, na África, e foi utilizada para povoamento da represa “Light”, no estado de São Paulo, e do lago

Paranoá, em Brasília. No entanto, a primeira introdução de tilápias do Nilo em território nacional se deu no ano de 1971, através do DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas) em Pentecostes, Ceará (Castagnolli, 1992; Moreira, 1999). Aproximadamente 100 fundadores foram importados de Bouaké, na Costa do Marfim, África. Tal linhagem ficou comumente conhecida como “Nilótica” ou “Bouaké”.

Em 1996, por meio da Alevinopar (Associação de Produtores de Alevinos do Estado do Paraná) e SEAB-PR (Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Paraná), ocorreu a segunda introdução oficial de exemplares da espécie *O. niloticus*. Conforme Moreira (1999) foram importados 20.800 exemplares do *Agricultural and Aquatic Systems*, do AIT (*Asian Institute of Technology*) na Tailândia, sendo que o estoque deste centro foi formado por importação proveniente do Japão e este formado com fundadores do Egito, na África. A linhagem, entretanto, ficou popularmente conhecida como “Tailandesa” ou “Chitralada” devido ao seu melhoramento ter sido realizado no Palácio Real de Chitralada (Tailândia).

Em 2002 foi introduzida uma nova linhagem de tilápia nilótica, a GST. Esta linhagem foi introduzida no Brasil pela Piscicultura Aquabel, de Rolândia-PR, vinda de uma empresa Norueguesa, denominada GENOMAR, a qual, desde 1999 vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético nesta linhagem e difundindo alevinos revertidos a diversos países. (Zimmermann, 2003; Cyrino *et al.*, 2004).

A última introdução oficial de exemplares de *O. niloticus* no país ocorreu em 2005. Com os objetivos de difundir a linhagem na América Latina e implantar um programa de melhoramento genético de tilápias para as condições de cultivo brasileiras, a Universidade Estadual de Maringá (Departamento de Zootecnia) importou do World Fish Center, na Malásia, 600 reprodutores (divididos em 30 famílias) da linhagem GIFT. Para a importação da linhagem a Universidade recebeu financiamento e apoio da SEAP-PR (Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca do Paraná) e do ITAM (Instituto de Tecnologia Agropecuária de Maringá). A linhagem, de acordo com Bentsen (1998) e Gupta (2004) foi desenvolvida a partir do cruzamento de quatro linhagens silvestres de tilápias capturadas em 1988-1989 no Egito, Gana, Quênia e Senegal, com quatro linhagens confinadas, introduzidas nas Filipinas de 1979 a 1984, oriundas de Israel, Singapura, Tailândia e Taiwan.

### 1.3. Marcadores genéticos

A contribuição da genética para a piscicultura abrange tanto a aplicação da metodologia clássica, que envolve práticas de seleção, hibridação e de análise dos níveis de endocruzamento, como o emprego de técnicas utilizadas em biotecnologia e engenharia genética como: manipulação cromossômica, reversão sexual, utilização de marcadores moleculares em nível de DNA e transferência de genes entre diferentes organismos e peixes (Toledo-Filho *et al.*, 1996).

Os estudos em genética molecular estão tornando mais comuns, pois a tilápia do Nilo apresenta grande potencial em termos de engenharia genética voltada ao melhoramento dos estoques. Considera-se, pois que a ampliação dos conhecimentos a respeito da genética das tilápias poderia permitir a determinação das similaridades e distâncias genéticas entre as diferentes linhagens, ou mesmo entre indivíduos, otimizando a escolha de progenitores para acasalamentos, com vistas às características de interesse zootécnico (Suganuma, 2004).

Com o desenvolvimento de diferentes linhagens de tilápia do Nilo têm aumentado a necessidade de identificá-las, visando a manutenção e certificação da qualidade do material genético de linhagens melhoradas adquiridas pelos produtores, assim, o uso de marcadores genéticos parece ser uma boa ferramenta para este fim.

Trabalhar com marcadores genéticos significa utilizar características herdáveis em indivíduos de uma dada população, considerando que todos os marcadores refletem diferenças nas seqüências de DNA (Sunnucks, 2000). As variantes genéticas podem ser aplicadas como marcadores para diversos estudos em populações de peixes, na identificação de espécies e de híbridos, estabelecimento da filogenia, medida do nível de variação genética em populações cultivadas e selvagens, determinação do impacto da introdução de indivíduos de populações cultivadas em populações selvagens (Ferguson *et al.*, 1995) determinação da qualidade do patrimônio genético de espécies de interesse econômico e como ferramenta auxiliar em programas de melhoramento genético.

Uma importante ferramenta molecular eficaz na identificação de variação genética e que fornece marcadores genéticos para o uso no melhoramento de peixes, são as reações em cadeia pela polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) associadas aos polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLPs – *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) que torna possível a seleção assistida por marcadores

(MAS) podendo aumentar o ganho genético ao passo que afeta a acurácia e o tempo de seleção.

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1995) os marcadores RFLP foram estudados pela primeira vez por Grodzicker e colaboradores em 1974, em um experimento que visava a detecção de mutação em DNA de vírus. A partir de então, muitos pesquisadores propuseram a utilização da técnica em análises genômicas, tornando-a de grande utilidade e importância nos estudos biológicos. Estes marcadores, por serem uniloco, são caracteristicamente co-dominantes, ou seja, em um indivíduo diplóide, ambos os alelos de um determinado loco são identificados, tornando-os altamente informativos.

O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase foi, segundo Regitano (2001), uma marcante contribuição ao estudo de marcadores moleculares. A técnica foi desenvolvida pelo bioquímico Kary Mullis em 1983, e consiste na duplicação *in vitro* de uma fita molde de DNA. Para tanto, é necessário oferecer condições ótimas para ocorrer esta duplicação, devendo-se submeter o DNA a um *mix* contendo os *primers* que irão delimitar a região genômica a ser estudada, os nucleotídeos, um co-fator enzimático (geralmente o  $Mg^{2+}$ ), enzima DNA polimerase e tampão. Ao longo de aproximadamente 30 ciclos de amplificação há um aumento

entretanto, os marcadores são geralmente escolhidos em genes conhecidos como reguladores metabólicos que controlam as características quantitativas de interesse, sendo ainda necessário encontrar formas alternativas do gene, resultantes de mutações de ponto na seqüência do gene. Assim, é preciso seqüenciar um grupo de indivíduos para encontrar os polimorfismos na seqüência do gene de interesse.

Marcadores de genes candidatos podem ser usados similarmente aos marcadores anônimos, mas eles estão localizados mais precisamente e podem detectar variações em genes conhecidos ou com função inferida que relata direta ou indiretamente características de interesse (Lynch e Walsh, 1997). As variantes alélicas encontradas no gene candidato podem ser utilizadas como um marcador para alelos que podem possuir efeitos positivos ou negativos para a característica de interesse. Assim, uma vez que esse marcador já possui seqüência definida, torna-se possível a seleção de indivíduos que possuem alelos favoráveis para os genes que controlam as características em questão. Tal seleção, baseada na avaliação direta de seu DNA é denominada de seleção assistida por marcador (MAS).

A associação estatística entre alelos moleculares específicos em genes candidatos e a característica de interesse é admitida como uma evidência de que o gene está diretamente envolvido no controle genético da característica (Lynch e Walsh, 1997).

#### 1.4. Hormônio do crescimento em peixes

Melhoria das taxas de crescimento natural de peixe tem sido amplamente explorada na aqüicultura, com os ganhos decorrentes de melhorias na produção animal, nutrição e seleção genética (Fjalestad *et al.*, 2003; Pennel e Barton, 1996). O crescimento adicional pode proporcionar vantagens para a aqüicultura encurtando o tempo de produção, aumentando a eficiência e conversão alimentar e controlando a disponibilidade dos produtos. Além disso, a taxa de crescimento é uma característica quantitativa poligênica (Falconer, 1987) em que possivelmente o gene do hormônio do crescimento (GH) seja um gene de efeito maior.

O GH possui um papel importante em todos os vertebrados, contudo, os efeitos fisiológicos deste hormônio resultam da regulação transcricional do gene do GH. Este hormônio é um polipeptídeo sintetizado nas células somatotrópicas hipofisárias e, segundo Kawauchi e Yasuda (1989) junto com a prolactina e a somatolactina, constitui

a família de hormônios hipofisários com estrutura semelhante e função que parecem ter originado de um gene ancestral comum antes da evolução dos peixes.

Os efeitos do GH sobre outros processos, como o metabolismo, parecem operar diretamente em um determinado alvo. Tanto em peixes como nos mamíferos, o GH é uma proteína anabolizante, promovendo simultaneamente um desarranjo de lipídios e carboidratos (Norbeck *et al.*, 2007). Este hormônio ainda possui função osmorreguladora que promove eficientemente a adaptação de peixes de água doce em águas salinas (Sakamoto *et al.*, 1991; Gross e Nilsson, 1995).

Métodos endócrinos para controlar o crescimento também são amplamente explorados, principalmente a aplicação de somatotropinas como o hormônio do crescimento (GH), prolactina, fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), hormônios da tireóide e esteróides sexuais (Donaldson e Devlin, 1996; Donaldson *et al.*, 1979; McCormick *et al.*, 1992; McLean e Devlin, 2000). Muitos ganhos significativos no crescimento podem ser alcançados em peixes com aplicação destes fatores de crescimento, mas a possibilidade de administrar os compostos através de injeção ou via oral em doses suficientes e eficazes sustentadas ao longo de um determinado período com aplicação permitida na aquicultura tem sido um pouco problemático (Devlin *et al.*, 2004). Mais recentemente, a liberação controlada de formulações foi utilizada (Devlin *et al.*, 2001; Garber *et al.*, 1995; McLean *et al.*, 1997), que pode proporcionar um crescimento adicional durante muitos meses em espécies de salmonídeos.

O efeito lipolítico do GH em peixes foi pela primeira vez demonstrado no fígado e tecido adiposo de juvenis de salmão coho (Sheridan, 1986). O autor relatou que o crescimento de peixes tratados com hormônios exibiu esgotamento lipídico resultante da ativação da enzima triacilglicerol lipase. Animais hipofisectomizados indicaram lipólise reduzida, sendo este um efeito que poderia ser resgatado por reposição do GH.

Posteriormente, o GH mostrou estimular diretamente a lipólise no fígado isolado de trutas (O'Connor *et al.*, 1993) e tecido adiposo isolado de seabream (Albalat *et al.*, 2005). O hormônio do crescimento também demonstrou ser hiperglicêmico em várias espécies de peixes e também aumentou a atividade glicogeniolítica, glicolítica, e fluxo gliconeogênico em vários tecidos, incluindo fígado, cérebro e lamelas (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2005).



## 1.5. Gene do hormônio do crescimento de peixes

Em um programa de melhoramento genético de tilápias do Nilo, características de crescimento são, sem dúvida, de maior relevância econômica. Segundo Sánchez-Ramos et al. (2006) a totalidade de genes que afetam as características de crescimento ainda é desconhecida, porém, já se têm definidos uma série de genes candidatos, como o gene do hormônio do crescimento (GH), da prolactina (PRL), da somatolactina (SL), do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e da miostatina (MSTN).

Um número de diferentes formas do gene GH está presente em várias espécies de vertebrados e a duplicação do gene, divergência ou mutação e variação alélica parece ser responsável por estas diferentes formas (Wallis, 1996). Para compreender a filogenia molecular do GH, muitos esforços foram concentrados na caracterização dos GHs em peixes. Dentro da Superordem Euteleostei, a seqüência aminoacídica do GH foi determinada em espécies das ordens Cypriniformes, Siluriformes, Salmoniformes, Gadiformes, Scorpaeniformes, Perciformes, Pleuronectiformes e Tetraodontiformes (Marins et al., 2003).

A principal estrutura do GH foi determinada em várias espécies piscícolas por seqüenciamento direto ou inferidas de clones cDNA (Chang *et al.*, 1992; Rand-Weaver *et al.*, 1993).

A estrutura do gene GH de tilápias do Nilo foi determinada por Ber e Daniel (1992). Segundo os autores, o gene GH da tilápia do Nilo possui 3165 pb e está formado por seis éxons e cinco íntrons, similarmente a outros teleósteos como o linguado *Paralichthys olivaceus* (Tanaka *et al.*, 1995) a dourada *Sparus aurata* (Sánchez-Ramos et al., 2004) e salmónídeos como o salmão do Atlântico *Salmo salar* (Joahnsen *et al.*, 1989) e a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Agellon *et al.*, 1988).

Ao comparar as seqüências no ponto inicial da transcrição do gene GH de tilápia, carpa, truta arco-íris e salmão do Atlântico, Ber e Daniel (1992), observaram uma região de alta homologia na porção precedente ao *TATA Box*. Esta homologia parece não se estender ao longo do gene GH de peixes e não é observada na região correspondente nos genes GH de mamíferos.

Ber e Daniel (1993) determinaram as seqüências nucleotídicas de dois genes que codificam para o GH de tilápia do Nilo. Assim como a tilápia, outras espécies de peixes como os salmónídeos (Agellon et al., 1988; Rentier-Delrue et al., 1989) apresentam

duas formas do gene GH. Os dois genes GH da tilápia nilótica são altamente homólogos, tendo um arranjo similar de íntrons e éxons, e ambos codificam polipeptídeos idênticos. A similaridade da seqüência se estende até -628 pb ao ponto de partida da transcrição, a partir de então, as seqüências dos dois genes não estão relacionadas. A presença de dois genes GH no genoma de tilápia é sugerida como uma consequência de um evento de duplicação relativamente recente (Ber e Daniel, 1993).

As tilápias, assim como os salmonídeos, contêm um íntron extra quando comparados com a estrutura do gene GH dos mamíferos. Sugere-se que na Superordem Teleostei, a inserção do íntron 5 teve lugar após a separação evolutiva da Cyprinoidea, mas antes Isospondyli (salmonídeos) e Acanthopterygii (tilápias) foram separadas. Assim, conforme relatado por Ber e Daniel (1993) o íntron adicional, que é provavelmente presente em muitos peixes teleósteos, pode ser um excelente marcador para a evolução natural e estudos de classificação.

## 1.6. Polimorfismos do gene GH e sua associação às características de produção

De acordo com Gross e Nilsson (1999) em função do alto impacto do GH na regulação do crescimento e por estar envolvido em diversas outras funções metabólicas, o gene GH é um alvo potencial para estudos de variação genética e sua associação com características de crescimento de peixes.

A ocorrência de polimorfismos para o gene GH já foi descrita para muitas outras espécies de peixes como *Salmo trutta* (Gross e Nilsson, 1995), *Salmo salar* (Park *et al.*, 1995), *Oncorhynchus kisutch* (Forbes *et al.*, 1994), *Alburnus alburnus* (Schlee *et al.*, 1996) e *Abramis brama* (Gross *et al.*, 1996) sendo que a maioria destes polimorfismos ocorrem na região não-codificadora do gene GH conforme foi verificado por diversos autores (Forbes *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1996; Schlee *et al.*, 1996; Gross e Nilsson, 1999; Kang *et al.*, 2002). Fato este que não significa necessariamente que esta variação seja estritamente neutra, uma vez que, conforme Gross e Nilsson (1999) é possível a existência de efeitos de ligação.

Variações no gene GH se mostraram associadas à várias características quantitativas (crescimento, produção de ovos, produção de leite, resistência a doenças, etc.) em animais de produção (Feng *et al.*, 1997; Kuhnlein *et al.*, 1997; Di Stasio *et al.*,

2003; Paz *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2006; Katoh *et al.*, 2008). Em peixes, alguns estudos de associação de polimorfismos em genes do eixo GH com o peso já tem sido relatados. Gross e Nilson (1999) estudaram a variação dentro de um fragmento de 1825 pb do gene GH1 do salmão do Atlântico com a enzima *TaqI* e concluíram que, de acordo com as frequências dos genótipos e haplótipos, houve indícios de associação de polimorfismos no gene GH1 com o crescimento da progênie durante o primeiro ano de vida. Já Kang *et al.* (2002) realizaram seus estudos em progênies do linguado, encontrando polimorfismos do tipo GH-*Sau3AI* associados ao crescimento. Sánchez-Ramos *et al.* (2006) investigaram polimorfismos no gene GH da dourada (enzimas *HaeIII* e *HpaII*) e sua associação com o peso e a altura, encontrando correlação significativa entre as variáveis e os genótipos.

Fica evidente, portanto, a carência em estudos de associação de polimorfismos no gene GH as diversas características de interesse produtivo em diferentes ambientes de cultivo.

## 1.7. Referências

- Agellon LB, Davies SL, Lin C-M, Chen TT and Powers DA (1988) Rainbow trout has two genes for growth hormone. *Mol Reprod Dev* 1:11–17.
- Albalat A, Gómez-Requeni P, Rojas P, Médale F, Kaushik S, Vianen GJ, Van den Thillart G, Gutiérrez J, Pérez-Sánchez J and Navarro I (2005) Nutritional and hormonal control of lipolysis in isolated gilthead seabream (*Sparus aurata*) adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R259–R265.
- Bentsen HB, Eknath AE, Vera MSP, Danting JC, Bolivar HL, Reyes RA, Dionisio EE, Longalong FM, Circa AV, Tayamen MM and Gjerd B (1998) Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 160:145-173.
- Ber D, Daniel V (1992) Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. *Gene* 13:245-250.
- Ber D, Daniel V (1993) Sequence analysis suggests a recent duplication of the growth hormone-encoding gene in *Tilapia nilotica*. *Gene* 125:143-150.
- Castagnolli N (1992) Piscicultura de Água Doce. FUNEP, Jaboticabal, 189 pp.
- Chang YS, Liu CS, Huang FL and Lo TB (1992) The primary structures of growth hormones of three cyprinid species: bighead carp, silver carp, and grass carp. *Gen Comp Endocrinol* 87: 385-393.
- Cyrino JEP, Urbinati EC, Fracalossi DM, Castagnolli N (2004) Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva (eds). São Paulo: TecArt. 345 pp.
- Devlin RH, Biagi CA and Yesaki TY (2004). Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains. *Aquaculture* 236:607–632.
- Devlin RH, Biagi CA, Yesaki TY, Smailus DE and Byatt JC (2001) Growth of domesticated transgenic fish. *Nature* 409:781–782.

- Donaldson EM and Devlin RH (1996) Uses of biotechnology to enhance production. In: Pennel W and Barton BA (eds), Principles of Salmonid Culture. Elsevier, Amsterdam, pp. 969–1020.
- Di Stasio L, Brugiapaglia A, Destefanis G, Albera A and Sartore S (2003) GH1 as candidate gene for variability of meat production traits in Piemontese cattle. *J Anim Breed Genet* 120:358–361.
- Donaldson EM, Fagerland UHM, Higgs DA and McBride JR (1979). Hormonal enhancement of growth. In: Hoar WS, Randall DJ and Brett JE (eds), Fish Physiology. Bioenergetics and Growth. Academic Press, New York, pp. 455-597.
- El-Sayed AFM (2006) Tilapia Culture. Cambridge: Cambridge University. 277 pp.
- Falconer DS (1987) Introdução à genética quantitativa. Viçosa, MG: UFV. 279 pp.
- Faria DA, Guimarães SEF, Lopes PS, Pires AV, Paiva SR, Sollero BP, Wenceslau AA (2006) Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. *Genet Mol Biol* 29:634-640.
- Feng XP, Kuhnlein U, Aggrey SE, Gavora JS and Zadworny D (1997) Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a white leghorn strain. *Poul Sci* 76:1770–1775.
- Ferguson A, Taggart JB, Prodöhl PA, McMeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P and Hynes RA (1995) Population and conservation. *J Fish Biol* 47:103-126.
- Ferreira MAJ (2003) Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas. Boa Vista: Embrapa Roraima. 63 pp.
- Ferreira ME and Grattapaglia D (1995) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA. 3rd edition, 220 pp.
- Fjalestad KT, Moen T and Gomez-Raya L (2003) Prospects for genetic technology in salmon breeding programmes. *Aquac Res* 34:397–406.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations (2004) The State of World Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. Roma, www.fao.org.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations (2006) The State of World Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper.
- Forbes SH, Knudsen KL, North TW and Allendorf FW (1994) One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 1628–1631.
- Garber MJ, Deyonge KG, Byatt JC, Lellis WA, Honeyfield DC, Bull RC, Schelling GT and Roeder RA (1995) Dose-response effects of recombinant bovine somatotropin (Posilac-TM) on growth performance and body composition of two-year-old rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Anim Sci* 73: 3216-3222.
- Gross R, Schlee P, Stein H and Rottmann O (1996) Detection of allelic variation within the growth hormone gene in common bream using heteroduplex analysis. *J Fish Biol* 48:1283–1287.
- Gross R and Nilsson J (1995) Application of heteroduplex analysis for detecting variation within the growth hormone 2 gene in *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 74: 286–295.
- Gross R and Nilsson J (1999) Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. *Aquaculture* 173:73-80.
- Gupta MV and Acosta BO (2004) From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. *NAGA, WorldFish Center Quarterly*. pp. 4-14.
- Johansen B, Johmsen OC, Valla S (1989) The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from Atlantic salmon. *Gene* 77:317–324.

- Kang JH, Lee SJ, Park RS and Ryu HY (2002) DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Sci* 68:494-498.
- Katoh K, Kouno S, Okazaki A, Suzuki K and Obara Y (2008) Interaction of GH polymorphism with body weight and endocrine functions in Japanese black calves. *Domest Anim Endocrinol* 34:25–30.
- Kawauchi H and Yasuda A (1989) Evolutionary aspects of growth hormone from nonmammalian species. In: Muller et al., (eds) *Advances in growth hormones and growth factor research*. Pythagora Press, Rome/Milan and Springer-Verlag, Berlin, pp 51-68.
- Kuhnlein U, Weigend S, Ni L, Gavora JS, Fairfull W and Zadworny D (1997) DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. *Anim Genet* 28:116-123.
- Lynch M and Walsh M (1997) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Assoc Inc., Sunderland, MA, USA. pp. 980.
- Marins LF, Levy JA, Folch JM and Sanchez A (2003) A growth hormone-based phylogenetic analysis of euteleostean fishes including a representative species of the Atheriniformes Order, *Odontesthes argentinensis*. *Genet Mol Biol* 26:295-300.
- McCormick SD, Kelley KN, Young G, Nishioka RS and Bern HA (1992) Stimulation of coho salmon growth by insulin-like growth factor I. *Gen Comp Endocrinol* 86:398-406.
- McLean E, Devlin RH, Byatt JC, Clarke WC and Donaldson EM (1997) Impact of a controlled release formulation of recombinant bovine growth hormone upon growth and seawater adaptation in coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) salmon. *Aquaculture* 156:13–128.
- McLean E and Devlin RH (2000) Application of biotechnology to enhance growth of salmonids and other fish. In: Fingerman M, Nagabhushnam R and Thompson MF (eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp. 17–55.
- Moreira HLM (1999) Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microsatélite. Doctor Tesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Norbeck LA, Kittilson JD and Sheridan MA (2007) Resolving the growth-promoting and metabolic effects of growth hormone: Differential regulation of GH-IGF-I system components. *Gen Comp Endocrinol* 151: 332–341.
- O'Connor PK, Reich B and Sheridan MA (1993) Growth hormone stimulates hepatic lipid mobilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Comp Physiol Biol* 163:427–431.
- Park LK, Moran P and Dightman DA (1995) A polymorphism in intron D of the chinook salmon growth hormone 2 gene. *Anim Genet* 26:285.
- Paz CCP, Packer IU, Freitas AR, Tambasco-Talhari D, Regitano LCA, Alencar MM and Cruz GM (2004) Ajuste de modelos não-lineares em estudos de associação entre polimorfismos genéticos e crescimento em bovinos de corte. *Rev Bras Zootec*, 33:1416-1425.
- Pennel W and Barton BA (1996) *Principles of Salmonid Culture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 969– 1020.
- Rand-Weaver M, Kawauchi H and Ono M (1993) Growth hormone and prolactin. In: Schreibman MP, Scanes CG and Pang PKT (eds). *The Endocrinology of Growth*,

- Development, and Metabolism in Vertebrates. Academic Press, New York, NY, pp. 13-42.
- Ranzani-Paiva MJT, Takemoto RM and Lizama MAP (2004) Sanidade de Organismos Aquáticos. São Paulo: Editora Varela. 426 pp.
- Regitano LCA (2001) Introdução à análise de marcadores moleculares. In: Regitano LCA and Coutinho LL. Biologia molecular aplicada à produção animal. Brasília: Embrapa. pp. 25-39.
- Rentier-Delrue F, Swennen D, Mercier L, Lion M, Benrubi O and Martial JA (1989) Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: Expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. DNA (N.Y.) 8: 109–117.
- Sakamoto T, Iwata M and Hirano T (1991) Kinetic studies of growth hormone and prolactin during adaptation of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, to different salinities. Gen Comp Endocrinol 82:184-191.
- Sánchez-Ramos I, Cross I and Rebordinos L (2004) Determination of RFLP's in genes related to growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In: Adams S and Olafsen JA (eds). Biotechnologies for Quality: Extended Abstracts and Short Communications. European Aquaculture Society. Barcelona, pp. 713-714.
- Sánchez-Ramos I, Barrios M, Cross I and Rebordinos L (2006) Identificación de RFLP en genes relacionados con el crecimiento en dorada *Sparus aurata* L., 1758. Bol Inst Esp Oceanogr 21:253-259.
- Schlee P, Fuchs H, Blusch J, Werner T, Rottmann O and Stein H (1996) Genetic polymorphism in the intron of the growth hormone gene of the bleak. J. Fish Biol 48: 1275–1277.
- Sangiao-Alvarellos S, Miguez JM, Soengas JL. 2005. Actions of growth hormone on carbohydrate metabolism and osmoregulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol 141:214–225.
- Sheridan MA (1986) Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone, and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Gen Comp Endocrinol 64:220–238.
- Suganuma CH (2004) Caracterização de estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de microssatélites. Msc Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. Tree 15:199-203.
- Tanaka M, Toma Y, Ohkubo T, Sudo S and Nakashima K (1995) Sequence of the flounder growth hormone encoding gene and its promoter region. Gene 165:321–322.
- Toledo-Filho AS, Foresti F and Almeida-Toledo LF (1996) Biotecnologia Genética Aplicada à Piscicultura. Cadernos de Ictiogenética 3. CCS/USP, São Paulo. 59 pp.
- Wallis M (1996) The molecular evolution of vertebrate growth hormones: a pattern of near-stasis interrupted by sustained bursts of rapid change. J Mol Evol 43:93-100.
- Zimmermann S (2003) Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. Panorama da Aqüicultura, 13:69.
- Zhou GL, Jin HG, Liu C, Guo SL, Zhu Q and Wu YH (2005) Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. J Biosci 30:595–598.

## II. OBJETIVOS GERAIS

Detectar a variabilidade do íntron 1-*Pst*I do gene do hormônio do crescimento (GH1) das linhagens Chitralada e GIFT (*Genetically Improvement Farmed Tilapia*) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do marcador molecular PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment LenGHt Polymorphic*).

Estudar a associação de polimorfismos no íntron 1 do gene GH1 ao comprimento total, comprimento padrão, altura, largura, peso de abate, peso de filé, rendimento de filé e peso de carcaça em ambas as linhagens.

Buscar um marcador molecular a ser utilizado como ferramenta de seleção para características de crescimento em programas de melhoramento genético de tilápias do Nilo.

### III. VARIABILIDADE DO GENE GH1 DE LINHAGENS DE TILÁPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*)

#### GH1 GENE VARIABILITY FROM TILAPIA NILOTICA (*Oreochromis niloticus*) STRAINS

##### **Abstract**

Analysis of genetic variability is an important step for the establishment of a genetic improvement program for Nile tilapia, and to determine strategies for genetics conservation. The objective of this study was to analyze the GH1 gene variability of Chitralada (non-selected) and GIFT (selected) strains, and seek for a PCR-RFLP marker to identify them. The amplifications products of the gene GH1 were submitted to digestion with the restriction enzyme *Pst*I and genetic variability was determined with the Popgen 1.31 program. There were the three possible genotypes for the two strains, but no one of them were specific. Chitralada strain found the genotypic frequencies of 0.707, 0.282 and 0.011 respectively for *Pst*I<sup>+/+</sup>, *Pst*I<sup>+/-</sup> and *Pst*I<sup>-/-</sup> and for GIFT 0.930, 0.065 and 0.005 for the same genotypes. The two populations showed up at the Hardy-Weinberg equilibrium, but the GIFT strain, according to the values of heterozygosity ( $H_o = 0.065$  and  $H_e = 0.073$ ) and  $F_{IS}$  (0.109) showed excess of homozygotes, probably as a function of this locus can be under selection. The index  $F_{ST}$  was significant and showed low differentiation between the lines (0.038), suggesting, therefore, the possibility of the two strains have a common ancestral gene on the GH1 and stocks formation.

**Key-words:** genetic differentiation, growth hormone, molecular marker direct, *Oreochromis niloticus*

##### **Introdução**

A utilização de espécies introduzidas na aqüicultura mundial não é recente. Segundo Osure e Phelps (2006) a maioria da produção mundial de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) está baseada em seis origens: Costa do Marfim, Gana, Egito-Manzala, Egito-Ismália, Sudão-Nilo e Lago George (Uganda) sendo estes estoques fundadores geralmente iniciados de um número limitado de peixes selvagens.

A primeira introdução de tilápias do Nilo em território brasileiro se deu no ano de 1971, com a importação de aproximadamente 60 fundadores de Bouaké, na Costa do Marfim. Em 1996, ocorreu a segunda introdução oficial de exemplares da espécie. Foram importados 20.800 exemplares do AIT (Asian Institute of Technology) na Tailândia, sendo que o estoque deste centro foi formado por importação proveniente do Japão e este formado com fundadores do Egito, na África (Moreira, 1999). A última introdução oficial de exemplares de *O. niloticus* no país ocorreu em 2005 através da



Universidade Estadual de Maringá (Departamento de Zootecnia). Foram importados do World Fish Center, na Malásia, 600 reprodutores (divididos em 30 famílias) da linhagem GIFT (*Genetically Improvement Farmed Tilapia*).

A domesticação frequentemente resulta em menor diversidade genética (Osure e Phelps, 2006), assim, análises de variabilidade genética em plantéis de tilápia nilótica, é sem dúvida, uma etapa importante para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético da espécie e para manutenção e certificação da qualidade do material genético de linhagens adquiridas pelos produtores. Para tanto, o uso de marcadores genéticos PCR-RFLP parece ser uma boa ferramenta auxiliar.

A combinação das técnicas moleculares de PCR e RFLP tem sido amplamente utilizada em pesquisas de diferenciação de populações de peixes (Wolf *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2000) e identificação de espécies de peixes (Sotelo *et al.*, 2001; Jérôme *et al.*, 2003). A técnica também tem se mostrado eficaz na detecção de polimorfismos para o gene do hormônio do crescimento (GH) em muitas espécies de peixes como *Salmo trutta* (Gross e Nilsson, 1995), *Oncorhynchus kisutch* (Forbes *et al.*, 1994), *Alburnus alburnus* (Schlee *et al.*, 1996) e *Abramis brama* (Gross *et al.*, 1996), *Salmo salar* (Gross e Nilsson, 1999), *Sparus aurata* (Sánchez-Ramos *et al.*, 2006) e *Paralichthys olivaceus* (Kang *et al.*, 2002), entretanto, em tilápias, este tipo de estudo ainda não foi detectado.

A tilápia do Nilo apresenta dois genes que codificam para o GH, os quais são altamente homólogos, com arranjo similar de íntrons e éxons que codificam polipeptídeos idênticos. A presença de dois genes GH (GH1 e GH2) no genoma de tilápia, segundo Ber e Daniel (1993) pode ser consequência de um evento de duplicação relativamente recente.

Visto que programas de seleção estão voltados para características de crescimento da tilápia do Nilo (Dey e Gupta, 2000; Gupta e Acosta, 2004) e que o gene do GH pode ser um gene de efeito maior na determinação destas características, com o presente estudo objetivou-se determinar a variabilidade do gene GH1 das linhagens Chitralada e GIFT de tilápia nilótica, bem como buscar um marcador direto para identificação das mesmas.

## **Material e Métodos**

Foram utilizados neste experimento 400 animais, onde 200 exemplares pertenciam à linhagem Chitralada e 200 à Linhagem GIFT. A linhagem Chitralada foi obtida de

uma piscicultura localizada em Palotina-PR (11ª geração no Brasil) e a linhagem GIFT (1ª geração no Brasil) obtida da Estação Experimental de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá UEM/CODAPAR e pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético de Peixes da mesma universidade.

Amostras de nadadeiras caudais destes animais foram coletadas e acondicionadas em microtubos com etanol 90% e direcionadas ao Laboratório de Biologia Molecular (UEM-DZO) para a realização das análises.

Para as extrações do material genômico propôs-se um protocolo que utiliza NaCl saturado (5M). No entanto, para a realização do procedimento, foi necessário: três lavagens das amostras com etanol 70%, adicionando-nas posteriormente 550 µL de tampão de lise (50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl e 1% de SDS) e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL), incubando-as em banho-maria a 55°C por 12 horas; após esse período, adicionou-se 600 µL de NaCl (5M) em cada amostra, as quais foram centrifugadas a 12400xg por 10 minutos; de cada amostra, coletou-se 800 µL de sobrenadante, transferindo-o para outro microtubo, adicionando-se 700 µL de etanol absoluto a 4°C e incubando-as a -20°C por uma hora; após esse período o DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% e depois de seco em estufa a 37°C, ressuspendidos em 100 µL de tampão TE (10mM de Tris pH 8.0 e 1mM de EDTA) e mantidos por uma hora em banho-maria a 37°C.

A extração e a integridade das amostras de DNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8%, revelado com 0,5µg/mL de brometo de etídeo e visualizado em transiluminad Tw6TEz Pisravim . °C.

A reação de amplificação foi conduzida em volume de 25 $\mu$ L contendo tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20mM pH 8,4 e KCl 50mM), 2,0mM de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,50 $\mu$ M de *primer*, 250 $\mu$ M de dNTPs, 0,6 unidade de *Taq* DNA Polimerase Platinum e 50ng de DNA molde. Depois da desnaturação inicial por quatro minutos a 95°C os fragmentos foram amplificados por meio de 35 ciclos, que consistiram por 30 segundos a 95°C, dois minutos a 68°C e um minuto e trinta segundos a 72°C. A extensão final foi de quatro minutos. As reações de PCR foram testadas em gel de agarose 1,0% e o tamanho de fragmento comparado com padrão de peso molecular de 1Kb Plus (Invitrogen).

A variabilidade do gene GH1 foi determinada através da técnica PCR-RFLP, a qual consistiu na digestão dos produtos de PCR com o uso da enzima de restrição *Pst*I, sob o sítio de restrição 5'-CTGCA↓G-3', localizado no íntron 1 (posição 1915 da seqüência referência). As reações de digestão dos produtos de PCR corresponderam a 12  $\mu$ L, sendo 1/10 do volume de reação de tampão 10X, 2,0 $\mu$ L de DNA amplificado e uma unidade de enzima de restrição. A digestão foi realizada em termocicladores programados em dois ciclos, um a 37°C por quatro horas e outro para a inativação da enzima a 65°C a 20 minutos.

Os fragmentos de restrição foram avaliados em gel de poliacrilamida desnaturante a 10% revelado pelo método de coloração com nitrato de prata conforme proposto por Bassam *et al.* (1991). As variantes alélicas foram avaliadas por comparação com o padrão de peso molecular de 1 Kb Plus (Invitrogen).

As frequências alélicas foram determinadas pela ausência ou presença de sítios de restrição no fragmento do gene GH1, calculadas pelo programa Popgen 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). Para tanto, foi construída uma planilha em que, “AA” correspondeu ao genótipo com o mesmo sítio de restrição nos dois cromossomos (homozigoto), “AB” o genótipo heterozigoto com sítio de restrição em somente uma das fitas e “BB” o genótipo homozigoto onde não houve digestão em função de mutações nos sítios de restrição dos dois cromossomos. Os dados perdidos foram assumidos como “..”

Ainda por este programa foram calculados os índices de heterozigosidade observada e esperada, teste Qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e homogeneidade dos alelos e estatística F de Wright (1978). O teste Qui-quadrado foi realizado para determinar a significância dos valores  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ .

## Resultados

O par de *primers* desenhado para este estudo apresentou amplificação positiva de um fragmento específico de 652 pb conforme esperado. Das 400 amostras submetidas ao PCR, somente 26 (6,5%) não apresentaram a banda. O padrão da amplificação dos *primers* pode ser avaliado na Figura 1.

Conforme a seqüência do gene GH1 publicada por Ber e Daniel (1993) a enzima de restrição *PstI* digeriu o fragmento em um único sítio, gerando dois fragmentos, um com 468 pb e outro com 184 pb. Dessa forma, tanto na linhagem Chitralada como na GIFT, foram obtidos dois alelos ( $PstI^+$  e  $PstI^-$ , com e sem o sítio de restrição, respectivamente) e três padrões genotípicos,  $PstI^{+/+}$  (AA),  $PstI^{+/-}$  (AB) e  $PstI^{-/-}$  (BB).

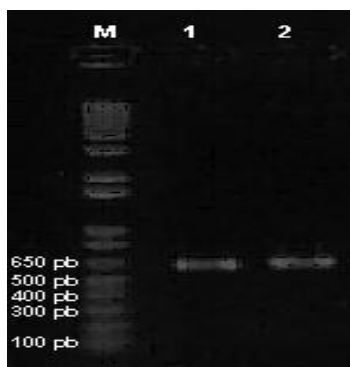


Figura 1. Análise em gel de agarose 1,0% corado em brometo de etídeo do fragmento amplificado do gene GH1 de tilápia do Nilo. As canaletas 1 e 2 representam a amplificação do fragmento de 652 pb do gene GH1 para as linhagens Chitralada e GIFT, respectivamente, e M representa o padrão de peso molecular de 1 Kb Plus.

A distribuição dos alelos do gene GH1, as freqüências genotípicas entre as linhagens de tilápia do Nilo e teste de probabilidade Qui-quadrado para equilíbrio de Hardy-Weinberg são apresentadas na Tabela 1.

Os índices de fixação dentro das linhagens ( $F_{IS}$ ) foram estimados com base na heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e na heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), sendo ainda usados para confirmar a significância dos valores  $H_o$  e  $H_e$  nas duas linhagens. O índice de fixação entre as linhagens ( $F_{ST}$ ) foi usado na diferenciação das mesmas. O valor  $F_{ST}$  mostrou baixa diferença, porém significativa entre as linhagens. Os valores de  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$  para o loco GH1-*PstI* para as linhagens Chitralada e GIFT podem ser observados na Tabela 2.

O valor estimado de identidade genética de Nei (1978) entre as linhagens foi de 0,9976.

Tabela 1. Distribuição dos alelos GH1-*PstI* e frequências genotípicas entre as linhagens de tilápia do Nilo e valores de probabilidade (P) do teste Qui-quadrado para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Linhagem	N	Frequência gênica		Heterozigosidade		Frequência genotípica			P
		<i>PstI</i> <sup>+</sup>	<i>PstI</i>	Obs	Esp	<i>PstI</i> <sup>+/+</sup>	<i>PstI</i> <sup>+/-</sup>	<i>PstI</i> <sup>-/-</sup>	
Chitralada	188	0,902	0,098	0,176	0,178	0,814	0,176	0,010	0,852
GIFT	186	0,965	0,035	0,059	0,067	0,935	0,060	0,005	0,075
Total	374	0,933	0,067	0,118	0,125	0,874	0,118	0,008	0,255

Tabela 2. Valores de  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$  calculados para o loco GH1-*PstI* das linhagens Chitralada e GIFT de tilápia do Nilo.

	$F_{IS}$	$F_{ST}$
Chitralada	0,011	-
GIFT	0,123	-
Total	0,042	0,016

## Discussão

Este estudo descreve o polimorfismo do gene GH1 de duas linhagens de tilápia do Nilo detectada pela *Pst*I no fragmento de 652 pb que abrange desde a porção final da região promotora até o íntron 2. A ocorrência de polimorfismos para o gene GH já foi descrita para muitas outras espécies de peixes como *Salmo trutta* (Gross e Nilsson, 1995), *Salmo salar* (Park *et al.*, 1995), *Oncorhynchus kisutch* (Forbes *et al.*, 1994), *Alburnus alburnus* (Schlee *et al.*, 1996) e *Abramis brama* (Gross *et al.*, 1996).

Os fragmentos polimórficos das linhagens de tilápia do Nilo foram gerados no íntron 1, na região não-codificadora do gene. Muitos estudos anteriores com peixes concluíram que todos os polimorfismos detectados se localizaram nos íntrons (Forbes *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1996; Schlee *et al.*, 1996; Gross e Nilsson, 1999; Kang *et al.*, 2002). Entretanto, o fato da variação estar ocorrendo no íntron, não significa necessariamente, que esta variação é estritamente neutra, uma vez que, conforme Gross e Nilsson (1999) é possível a existência de efeitos de ligação.

Na região do íntron 1 de tilápia do Nilo, conforme a sequência referência (Ber e Daniel, 1993) está presente uma sequência com repetição em tandem (1739 a 1767 pb) Evento semelhante foi verificado por (Almuly *et al.*, 2000) que encontraram mini e microsatélites em toda a região não-codificadora da dourada *Sparus aurata*, o que resulta em alelismo extenso devido ao número diferente ou comprimento de repetições. Assim, como na dourada, pode ser possível que, ocorram polimorfismos no tamanho de comprimento do fragmento detectado no gene do hormônio do crescimento da tilápia e este se deva a diferentes comprimentos no microsatélite presente na região do primeiro íntron.

As frequências alélicas obtidas neste estudo (GH1-*Pst*I) mostram que o *Pst*I<sup>+</sup> é predominante na tilápia do Nilo. De acordo com as frequências gênicas e a heterozigosidade, pode se afirmar, contudo, que a linhagem Chitralada possui maior variabilidade quanto ao fragmento de 652 pb do GH1-*Pst*I em relação à linhagem GIFT. A maior heterozigosidade verificada na linhagem Chitralada (Tabela 1) pode ser sugerida em função do efeito fundador para o gene em questão, da possibilidade do plantel progenitor ter sido formado a partir da aquisição de reprodutores de diversas Estações de Piscicultura e ainda, do fato da linhagem não estar sob seleção desde a sua introdução no Brasil. No entanto, verificou-se maior frequência do alelo *Pst*I<sup>+</sup> na linhagem selecionada, o que permite supor que este alelo esteja sob seleção, fato este

consistente a menor variabilidade do loco GH1-*Pst*I, pois, segundo Falconer (1987) a seleção artificial de características acarreta na perda de variância genética aditiva.

Os valores de  $F_{IS}$  que representam uma medida do desvio das frequências genotípicas, em relação às frequências panmíticas, expressas em termos de deficiência ou excesso de heterozigotos, e que também podem ser interpretados como coeficiente de endogamia ( $f$ ) foram variáveis, porém não significativos, indicando que não ocorre excesso de homozigotos nos plantéis. Assim, verificou-se que as frequências alélicas nas duas linhagens encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Deficiência de heterozigotos no gene GH1 foi verificada por Gross *et al.* (2000) ao utilizar a técnica PCR-RFLP em diferentes populações de salmonídeos *Thymallus thymallus*. Esta deficiência de heterozigotos em uma das populações, segundo os autores, pode ter ocorrido em decorrência da amostragem em diferentes sub-populações (efeito Wahlund) ou pela consangüinidade (efeito Allendorf-Phelps). Entretanto, em nosso estudo o equilíbrio das frequências alélicas para a linhagem GIFT provavelmente ocorreu em função do programa de melhoramento ter iniciado com alto  $N_e$  (número efetivo de reprodutores) combinando oito linhagens e a seleção subsequente ter ocorrido sob condições controladas. A população sintética (base) da linhagem GIFT foi selecionada durante seis gerações, envolvendo a produção de 200 famílias formadas a partir do acasalamento de 100 machos com 200 fêmeas selecionadas (Gupta e Acosta, 2004), sendo a taxa estimada de consangüinidade por geração (1ª a 4ª geração) de 0,138, 0,382, 5,34 e 7,09 (Eknath e Acosta, 1998).

O aumento da endogamia, que não é difícil de ocorrer devido a maioria dos estoques de reprodutores serem pequenos e fechados, pode proporcionar grandes perdas na piscicultura, porque o aumento da homozigose possibilita que alelos deletérios detrimenais tenham uma maior chance de se expressarem, reduzindo a viabilidade, a sobrevivência, o crescimento, a produção de óvulos e aumentando a porcentagem de anormalidades (Povh *et al.*, 2005). Entretanto, o desenvolvimento de linhagens altamente homozigotas ou isogênicas para o loco GH1-*Pst*I pode ser interessante, ao ponto que pode permitir a exploração da heterose na obtenção de características de crescimento desejáveis. Segundo Ozaki *et al.* (2001) estudos envolvendo a análise de QTLs ressaltam que a máxima eficiência desta abordagem depende da construção de linhagens isogênicas.

O índice  $F_{ST}$  foi significativo e revelou baixa diferenciação entre as linhagens, indicando que somente 1,6% da variância do gene GH1 é devido a diferenciação entre a

linhagem Chitralada e a GIFT, enquanto 98,4% da variação é devido as diferenças dentro de cada uma das linhagens. O valor de identidade genética de Nei (1978) (Ig: 0,9976) concorda com o este resultado. Sugere-se, portanto, que as linhagens podem apresentar origem comum quanto ao gene GH1 e aos seus estoques formadores.

Em resumo, tilápias homozigotas  $PstI^{+/+}$  são mais freqüentes que heterozigotas  $PstI^{+/-}$  e homozigotas  $PstI^{-/-}$ , sendo a linhagem Chitralada mais polimórfica que a GIFT. Devido a sua importância em diversas funções metabólicas, o gene GH é um objeto potencial para estudos de variação genética e a técnica de PCR-RFLP parece ser eficiente e promissora na busca por polimorfismos neste gene. Mesmo os polimorfismos verificados neste estudo estando localizados numa região não-codificadora, este tipo de estudo de variação é de relevante importância para o auxílio na implantação de programas de melhoramento genético de espécies aquáticas bem como no monitoramento genético das mesmas.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o apoio e financiamento do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, do Instituto de Tecnologia Agropecuária de Maringá (ITAM) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Referências**

- Almuly R, Cavari B, Ferstman H, Kolodny O and Funkenstein B (2000) Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone encoding gene: Identification of minisatellite polymorphism in intron I. *Genome* 43:836–845.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G and Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Academic Press* 196:80-83.
- Ber D and Daniel V (1993). Sequence analysis suggests a recent duplication of the growth hormone-encoding gene in *Tilapia nilotica*. *Gene* 125:143-150.
- Dey MM and Gupta MV (2000) Socioeconomics of disseminating genetically improved Nile tilapia in Asia: an introduction. *Aquac Econ Manage* 4: 5-11.
- Eknath AE and Acosta BO (1998). Genetic Improvement of Farmed Tilapias (GIFT) Project Final Report. ICLARM, Philippines.
- Falconer DS (1987) Introdução à genética quantitativa. Viçosa, MG: UFV. 279 pp.
- Forbes SH, Knudsen KL, North TW and Allendorf FW (1994) One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1628–1631.
- Gross R, Schlee P, Stein H and Rottmann O (1996) Detection of allelic variation within the growth hormone gene in common bream using heteroduplex analysis. *J Fish Biol* 48:1283–1287.



- Gross R and Nilsson J (1995) Application of heteroduplex analysis for detecting variation within the growth hormone 2 gene in *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 74: 286–295.
- Gross R and Nilsson J (1999) Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. *Aquaculture* 173:73-80.
- Gross R, Kühn R, Baars M, Schröder W, Stein H and Rottmann O (2000) Genetic differentiation of European grayling populations across the Main, Danube and Elbe drainages in Bavária. *J Fish Biol* 58:264–280.
- Gupta MV and Acosta BO (2004) From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. *NAGA, WorldFish Center Quarterly*. pp. 4-14.
- Jérôme M, Lemaire C, Bautista JM, Fleurence J and Etienne M (2003) Molecular phylogeny and species identification of sardines. *J. Agric. Food Chem* 51:43-50.
- Kang JH, Lee SJ, Park RS and Ryu HY (2002) DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.* 68:494-498.
- Moreira HLM (1999) Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélite. Doctor Tesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, Nakamura K, Coimbra MR, Akutsu T and Okamoto N (2001) Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Genet Genomics* 265:23-31.
- Osure GO and Phelps RP (2006) Evaluation of reproductive performance and early growth of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) with different histories of domestication. *Aquaculture* 253:485–494.
- Povh JA, Moreira HLM, Ribeiro RP, Prioli AP, Vargas L, Blanck DV, Gasparino E, Streit Junior DP (2005) Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Scientiarum: Animal Sciences* 27:1-10.
- Sánchez-Ramos I, Barrios M, Cross I, Rebordinos L (2006) Identificación de RFLP en genes relacionados con el crecimiento en dorada *Sparus aurata* L., 1758. *Bol Inst Esp Oceanogr* 21:253-259.
- Schlee P, Fuchs H, Blusch J, Werner T, Rottmann O and Stein H (1996) Genetic polymorphism in the intron of the growth hormone gene of the bleak. *J. Fish Biol* 48: 1275–1277.
- Sotelo CG, Calo-Mata P, Chapela MJ, Pérez-Martín RI, Rehbein H, Hold GL, Russell VJ, Pryde S, Quinteiro MI, Rey-Méndez M, Rosa C and Santos AT (2001) Identification of Flatfish (Pleuronectiforme) species using DNA-based techniques. *J Agric Food Chem* 49:4562-4569.
- Wolf C, Burgener M, Hubner P and Luthy J (2000) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Lebenson Wiss Technol* 33: 144-150.
- Wright S (1978). *Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations*. Chicago: University of Chicago Press. 423 pp.

Yeh FC, Boyle TYZ and Xiyun JM (1999). POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research.

#### IV. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GH1-*Pst*I DE LINHAGENS DE TILÁPIA DO NILO AS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Resumo – O gene GH é um potencial alvo para estudos de variação genética e sua associação com características de crescimento em peixes. Estes estudos podem ter importância em programas de melhoramento genético de espécies aquáticas, assim, o objetivo deste estudo foi investigar a associação de polimorfismos no gene GH1 as características de crescimento em linhagens de tilápia do Nilo. Para tanto, realizou-se a amplificação de um fragmento (652 pb) do gene GH1 com subsequente restrição com a enzima *Pst*I. Para a análise de associação do marcador molecular com as características quantitativas, utilizou-se o procedimento SAS GLM. Os RFLPs descritos para o íntron 1 do gene GH1 da tilápia do Nilo apresentaram correlação significativa com o comprimento total, comprimento padrão, altura, largura, peso de abate, peso de filé e peso de carcaça. Foi verificado que o genótipo *Pst*I<sup>+/-</sup> está associado ao melhor desempenho independentemente da linhagem. Somente para rendimento de filé houve interação entre linhagem e genótipo, onde na linhagem GIFT, o genótipo homocigoto *Pst*I<sup>+/+</sup> foi superior em relação à Chitralada, podendo-se sugerir que este gene esteja sob seleção.

**Termos para indexação:** hormônio do crescimento, MAS, *Oreochromis niloticus*, PCR-RFLP

#### **Polimorfism association GH1-*Pst*I to performance characteristics from Nile tilapia strains**

Abstract – The GH gene is a potential target for studies of genetic variation and its association with characteristics of growth in fish. These studies may be important in genetic improvement programs for aquatic species, thus, the objective of this study was to investigate the polymorphisms association in the gene GH1 for growth characteristics in Nile tilapia strains. To do so, it was conducted on amplification of a fragment (652 bp) of the GH1 gene with subsequent restriction with enzyme *Pst*I. For the analysis of the molecular marker association with the quantitative traits, it was used the SAS GLM procedure. The RFLPs described for the intron 1 of the GH1 gene of Nile tilapia had significant correlation with total length, standard length, height, width, slaughter weight, fillet weight and carcass weight. It was found that the genotype *Pst*I<sup>+/-</sup> is associated with better performance regardless of strain. Only for fillet yield there was interaction between genotype and strain, where in the GIFT strain the homozygous genotype *Pst*I<sup>+/+</sup> was higher in relation to the Chitralada and can be suggested that this gene is under selection.

**Index terms:** growth hormone, MAS, *Oreochromis niloticus*, PCR-RFLP

## Introdução

A tilapicultura é uma das mais rápidas e crescentes modalidades de aquicultura mundial. As tilápias (família Cichlidae) são peixes de água doce nativas do continente Africano. No entanto, conforme a FAO (2006) em 2002, aproximadamente 100 países já praticavam a tilapicultura, sendo que destes, apenas seis dominavam a produção mundial (China, Egito, Filipinas, Indonésia, Tailândia e Taiwan).

Melhorias das taxas de crescimento natural de peixes têm sido amplamente exploradas na aquicultura com os ganhos decorrentes de melhorias na produção animal, nutrição e seleção genética (Fjalestad et al., 2003). O crescimento adicional pode proporcionar vantagens para a aquicultura encurtando o tempo de produção, aumentando a eficiência e conversão alimentar e controlando a disponibilidade dos produtos.

Em um programa de melhoramento genético de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) características de crescimento são sem dúvida, caracteres com maior relevância econômica. Segundo Sánchez-Ramos et al. (2006) a totalidade de genes que afetam as características de crescimento ainda é desconhecida, porém, já se têm definidos uma série de genes candidatos, como o gene do hormônio do crescimento (GH), da prolactina (PRL), da somatolactina (SL), do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e da miostatina (MSTN).

A estrutura do gene GH de tilápias do Nilo foi determinada por Ber e Daniel (1992). Segundo os autores, o gene GH da tilápia do Nilo possui 3165 pb e é constituído por seis éxons e cinco íntrons, similarmente a outros teleósteos como o salmão do Atlântico (Joahnsen et al., 1989) e a dourada (Sánchez-Ramos et al., 2004).

Diferentes formas do gene GH estão presentes em várias espécies de vertebrados. A tilápia do Nilo apresenta dois genes que codificam para o GH, os quais são altamente homólogos, com arranjo similar de íntrons e éxons que codificam polipeptídeos idênticos. A presença de dois genes GH (GH1 e GH2) no genoma de tilápia, segundo Ber e Daniel (1993) pode ser conseqüência de um evento de duplicação relativamente recente.

De acordo com Gross e Nilsson (1999) em função do alto impacto do GH na regulação do crescimento e por estar envolvido em diversas outras funções metabólicas, o gene GH é um potencial alvo para estudos de variação genética e sua associação com características de crescimento de peixes.

Variações no gene GH mostraram-se associadas as várias características quantitativas (crescimento, qualidade de carne, produção de ovos, produção de leite, resistência à doenças, etc.) em animais de produção como aves, bovinos e suínos (Kuhnlein et al., 1997; Di Stasio et al., 2003; Tambasco et al., 2003; Zhou et al., 2005; Faria et al., 2006; Katoh et al., 2008). Em peixes, alguns estudos de associação de polimorfismos no gene GH com o peso já tem sido relatados (Gross e Nilsson, 1999; Kang et al., 2002; Sánchez-Ramos et al., 2006), no entanto, associações com outras características de interesse em diferentes ambientes ainda são escassos.

Estudos de associações podem ser aplicados como um critério de seleção em programas de melhoramento genético de espécies aquícolas, assim, objetivou-se com o

As extrações do material genômico foram realizadas conforme o protocolo que utiliza NaCl saturado. Para tanto, realizaram-se três lavagens das amostras com etanol 70, adicionando-se posteriormente 550  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl e 1% de SDS) e 5  $\mu\text{L}$  de proteinase K (200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C *overnight* e após esse período, adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de NaCl (5M) em cada amostra, as quais foram centrifugadas a 12400  $\times g$  por 10 minutos. De cada amostra, coletou-se 800  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, transferindo-o para outro microtubo e adicionando-se 700  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto a 4°C. Depois de completamente precipitado, o DNA foi lavado, seco em estufa a 37°C e ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA). A extração e a integridade das amostras de DNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8%, revelado com 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de brometo de etídeo e visualizado em transluminador com luz ultravioleta. As amostras foram quantificadas e padronizadas a 100  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de DNA, sendo estas, estocadas a -20°C até o momento das ampliações.

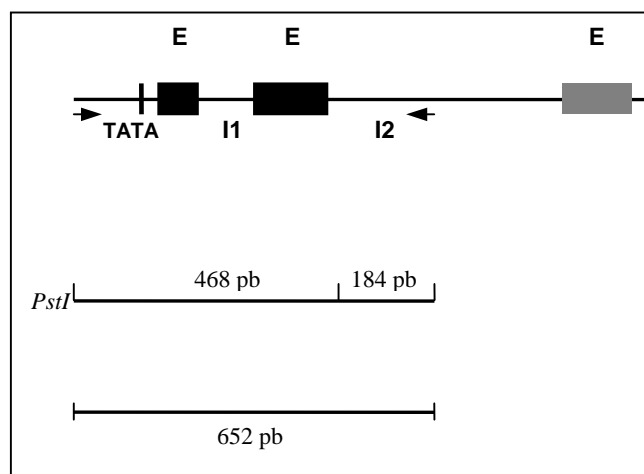
Para a realização do presente estudo foi necessária a construção de pares de primers específicos conforme a seqüência referência do gene GH1 de tilápia do Nilo (Ber e Daniel, 1993), obtida no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sob o número de acesso M97766. As seqüências, local de anelamento do primer na seqüência referência e tamanho do fragmento esperado dos três pares de primers desenhados podem ser observados no Quadro 1.

**Quadro 1.** Primers desenhados para as ampliações de PCR do gene GH1 de tilápia do Nilo.

Primer	Seqüência (5' → 3')	Posição na seqüência referência	Tamanho do fragmento (pb)
GH1-P1F	CAGCGGTGTGTTTTTCATGT	1447	652
GH1-P1R	CGGTTCCCTTGACATCAAAT	2098	
GH1-P2F	TCAAGGGAACCGAGACTT	2087	441
GH1-P2R	GATTATCGCATGGGCAGAGT	2528	
GH1-P3F	TCGCTCTGTCTGGAGGTT	2639	396
GH1-P3R	AGGTAGGTCTCCACCTGCAA	3015	

O teste de amplificação dos pares de primers desenhados para este estudo foi realizado nas linhagens de tilápia do Nilo Bouaké, Chitralada e GIFT, a fim de avaliar a especificidade e padrão de amplificação dos mesmos.

A região genômica foi amplificada utilizando-se apenas o par de primers GH1-P1 (Quadro 1). A seleção deste par de primers ocorreu por este amplificar uma região que contém repetição em tandem CTGT e por abranger a região promotora e os éxons 1 e 2 e íntron 1 do gene em questão. A estrutura do fragmento GH1 amplificado pode ser observada na Figura 1.



**Figura 1.** Figura esquemática representando a posição do par de primers GH1-1 (indicada pelas setas) para a amplificação de um fragmento de 652 pb do gene GH1 de tilápia do Nilo e sítio de restrição *PstI* conforme sequência referência. Região *TATA-BOX* é indicada por TATA, éxons indicados por E1-E3 e íntrons por I1 e I2. Os tamanhos dos fragmentos de restrição são indicados em pares de bases (pb).

O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 25 $\mu$ L, sendo 24,5 $\mu$ L de mistura e 0,5 $\mu$ L de DNA molde (50 ng). Dessa forma o *mix*, foi constituído por: tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,50  $\mu$ M de primers GH1-P1, 0,25 mM de dNTPs e 0,6 unidade de *Taq* DNA Polimerase Platinum. As PCRs foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercicle Gradient® ou Techne TC-412® programados para 35 ciclos, com um passo inicial de desnaturação a 95°C por quatro minutos e um passo final de extensão a 72°C por quatro minutos. Cada ciclo foi constituído por 30 segundos a 95°C, dois minutos a 68°C e um minuto e trinta segundos a 72°C.

A genotipagem do fragmento de 652 pb do gene GH1 foi feita através da técnica PCR-RFLP, a qual consistiu na digestão dos produtos de PCR com o uso da enzima de restrição *PstI*, sob o sítio de restrição 5'-CTGCA↓G-3', localizado no íntron 1 (posição 1915pb) da sequência referência, gerando fragmentos de restrição com 468 e 184 pb (Figura 1). A reação de digestão dos produtos de PCR compreendeu a 12  $\mu$ L, sendo

Buffer 1X, 2,0 µL de DNA amplificado e uma unidade de enzima de restrição. A digestão foi realizada em termocicladores programados em dois ciclos, um a 37°C por quatro horas e outro para a inativação da enzima a 65°C a 20 minutos. Os fragmentos de tamanho restrito foram avaliados em gel de agarose 2,0% e comparados com o padrão de peso molecular de 1 Kb Plus.

A análise de associação entre as características avaliadas e o marcador foi realizada pelo procedimento GLM do SAS (Littell et al., 1991) de acordo com o modelo:

$$Y = \mu + L + G + LG + e$$

Onde,  $Y$  é a observação da característica,  $\mu$  a média geral da população,  $L$  o efeito fixo da linhagem,  $G$  o efeito fixo do genótipo GH1,  $LG$  é o efeito da interação entre as linhagens e os genótipos e  $e$  é o erro aleatório associado a cada observação. O teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) foi utilizado para as variáveis que apresentaram efeito de interação entre linhagem e genótipo.

O genótipo  $PstI^{-/-}$  foi excluído das análises por apresentar apenas três indivíduos representante dessa classe de efeito fixo.

## Resultados e Discussão

De acordo com a seqüência-referência do gene GH1 da tilápia do Nilo (Ber e Daniel, 1993) os três pares de primers desenhados foram satisfatoriamente amplificados em três linhagens de tilápia do Nilo (Bouaké, Chitralada e GIFT), sendo gerados os tamanhos de fragmentos esperados (652, 441 e 396 pb). A amplificação dos três pares de primers em três linhagens de tilápia do Nilo pode ser verificada na Figura 2.

A região polimórfica do fragmento de 652 pb do gene GH1 (Quadro 1) das linhagens de tilápia do Nilo foi detectada pela enzima  $PstI$ , a qual possui seu sítio de restrição na região não-codificadora, íntron 1. Variantes polimórficas nos íntrons 1 e 3 do gene GH da dourada *Sparus aurata* foram obtidas com o uso da enzima  $PstI$  pela técnica RFLP (Almuly et al, 2000) porém, estudos de associação de polimorfismos obtidos com esta enzima à caracteres de produção, até o momento não foram realizados em espécies de peixes.





**Figura 2.** Análise em gel de agarose 1,0% corado em brometo de etídeo da amplificação dos pares de primers desenhados para amplificar diferentes regiões do gene GH1 de tilápia do Nilo. As canaletas 1-3 indicam um fragmento de 652 pb amplificados pelo par de primers GH1-P1, canaletas 4-6 um fragmento de 441 pb amplificado pelo par de primers GH1-P2 e canaletas 7-9 um fragmento de 396 pb amplificado pelo par de primers GH1-P3. As canaletas 1, 4 e 7 correspondem a linhagem Bouaké, canaletas 2, 5 e 8 a linhagem Chitralada e canaletas 3, 6 e 9 a linhagem GIFT e M o padrão de peso molecular de 1Kb.

O fato dos polimorfismos encontrados neste estudo ocorrerem em regiões não-codificadoras, não significa que estas mutações sejam necessariamente neutras, uma vez que é possível a ocorrência de efeito de ligação entre genes e regiões gênicas. A ocorrência de polimorfismos no íntron 1 e sua associação ao crescimento já foram relatadas em peixes como o linguado *Paralichthys olivaceus* (Kang et al., 2002), o salmão do Atlântico *Salmo salar* (Gross e Nilsson, 1999), a truta “Artic charr” *Salvelinus alpinus* (Tao e Boulding, 2003) e na dourada *Sparus aurata* (Sánchez-Ramos et al, 2006). Polimorfismos em regiões não-codificadoras associados à produção obtidos em outras culturas como bovinos, aves e suínos corroboram com os resultados obtidos neste estudo (Kuhnlein et al., 1997; Zhou et al., 2005; Faria et al., 2006).

De acordo com a análise estatística apresentada na Tabela 1, dentre as variáveis analisadas nas linhagens Chitralada e GIFT, a AL e o PC não diferiram significativamente, sendo que para as características restantes, com exceção da LA, a linhagem Chitralada foi superior ( $p < 0,05$ ). Assim, de maneira geral, o desempenho da linhagem GIFT, quando cultivada em tanques-rede, foi inferior ao desempenho da linhagem Chitralada. Efeito de interação entre linhagem e genótipo foi obtido somente para a variável rendimento de filé (RF), conforme pode ser verificado na Tabela 2.

**Tabela 1.** Médias<sup>(1)</sup> e coeficientes de variação (CV) das características de desempenho das linhagens de tilápia do Nilo e dos genótipos GH1-*PstI*.

Variável (unidade) CT <sup>(2)</sup> (cm)	Linhagem		Genótipo		CV(%)
	Chitralada	GIFT	<i>PstI</i> <sup>+/+</sup>	<i>PstI</i> <sup>+/-</sup>	
	Média	Média	Média	Média	

de cultivo sem haver a necessidade de desenvolver linhagens determinadas a cada ambiente diferente (Eknath et al., 2007). Ainda, segundo Osure e Phelps (2006) estudos de comparações entre linhagens de tilápia podem ser uma questão complicada, já que existe forte influência da pressão de seleção praticada associada ao processo de domesticação. Dessa maneira, a interação genótipo ambiente deve ser uma importante consideração durante a escolha da linhagem a ser cultivada.

A variação no gene GH1 observada para a tilápia do Nilo pode estar associada diretamente às características de desempenho, uma vez que o genótipo heterozigoto *PstI*<sup>+/-</sup> foi superior ao genótipo homozigoto *PstI*<sup>+/+</sup>, independentemente da linhagem, para as características CT, CP, AL, LA, PA, PF e PC (Tabela 1). Resultados encontrados em estudos de associação de polimorfismos no gene GH, onde os genótipos heterozigotos se apresentam superiores aos homozigotos quanto às características de produção em outros animais de cultivo (Reis et al., 2001; Kansaku et al., 2003), são consistentes ao obtido neste experimento.

Com relação à interação entre linhagem e genótipo para a característica RF, não foi verificada diferença significativa entre os genótipos na linhagem Chitralada. Entretanto na linhagem GIFT, o genótipo homozigoto *PstI*<sup>+/+</sup> foi superior, sendo esta uma circunstância que leva à inferência de que é possível um ganho de 2,72% no rendimento de filé do indivíduo homozigoto em relação ao heterozigoto. Este efeito de interação entre os genótipos e a linhagem GIFT é coerente se, ao tomar-se a maior frequência do alelo *PstI*<sup>+</sup> nesta linhagem em relação à Chitralada, pode-se sugerir que este gene esteja sendo selecionado. Este resultado é corroborado por Lee et al. (1996) que ao estudar polimorfismos no gene GH em duas populações de bovino leiteiro (uma selecionada e outra não-selecionada) encontraram que animais selecionados portadores do genótipo homozigoto mantinham maior média de produção de leite em relação aos portadores do genótipo heterozigoto. Já entre a população não-selecionada, aqueles animais com genótipo heterozigoto produziram mais leite, no entanto sem diferença significativa.

Com os resultados aqui obtidos, parece coerente a construção de linhagens de tilápia do Nilo altamente isogênicas para o loco GH1-*PstI* para fins de exploração de vigor híbrido, e conseqüentemente, o desenvolvimento de uma linhagem comercial (F1) com alto potencial de desempenho. Quanto ao uso de linhagens isogênicas em programas de melhoramento em aquíicultura, Osaki et al (2001) aborda que a máxima eficiência de QTLs depende do desenvolvimento destas linhagens. Porém, muitas

dificuldades terão de ser superadas antes destas idéias serem postas em prática, uma vez que o crescimento é uma característica poligênica e a epistasia, ou a interação entre locos, implica que diferentes locos afetando a mesma característica interagem de modo que o fenótipo é expresso em função da combinação específica de alelos presentes nos diferentes locos.

### Conclusões

1. Existe a associação das características de desempenho de linhagens de tilápia do Nilo ao polimorfismo do gene GH1-*Pst*I.
2. A associação verificada pode ser devido ao efeito direto da regulação do próprio gene do hormônio do crescimento.
3. Identificações detalhadas da estrutura do polimorfismo GH1-*Pst*I pode contribuir para a aplicação de MAS no programa de melhoramento genético de tilápias.

### Referências

- ALMULY, R.; CAVARI, B.; FERSTMAN, H.; KOLODNY, O.; FUNKENSTEIN, B. Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone encoding gene: Identification of minisatellite polymorphism in intron I. **Genome**, v.43, p.836–845, 2000.
- BER, D.; DANIEL, V. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. **Gene**, v.113, p.245-250, 1992.
- BER, D.; DANIEL, V. Sequence analysis suggests a recent duplication of the growth hormone-encoding gene in *Tilapia nilotica*. **Gene**, v.125, p.143-150, 1993.
- DAN, N.C.; LITTLE, C.L. The culture performance of monosex and mixed-sex new-season and overwintered fry in three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in northern Vietnam. **Aquaculture**, v.184, p.221-231, 1999.
- DI STASIO, L.; BRUGIAPAGLIA, A.; DESTEFANIS, G.; ALBERA, A.; SARTORE, S. GH1 as candidate gene for variability of meat production traits in Piemontese cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.120, p.358–361, 2003.
- EKNATH, E.A.; BENTSEN, H.B.; PONZONI, R.W.; RYE, M.; NGUYEN, N.H.; THODESEN, J.; GJERDE, B. Genetic improvement of farmed tilapias: Composition and genetic parameters of a synthetic base population of *Oreochromis niloticus* for selective breeding. **Aquaculture**, v. 273, p.1–14, 2007.
- FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PIRES, A.V.; PAIVA, S.R.; SOLLERO, B.P.; WENCESLAU, A.A. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p.634-640, 2006.

FJALESTAD, K.T.; MOEN, T.; GOMEZ-RAYA, L. Prospects for genetic technology in salmon breeding programmes. **Aquaculture Research**, v.34, p.397–406, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Aquaculture: Fisheries Technical Paper**. Roma: FAO, 2006. 147p. Disponível em: <<http://www.fao.org>>

FÜLBER, V.M. **Desempenho de três linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases, densidades e níveis de proteína**. 2007. 29p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

GROSS, R.; NILSSON, J. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. **Aquaculture**, v.173, p.73-80, 1999.

JOHANSEN, B.; JOHNSON, O.C.; VALLA, S. The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from Atlantic salmon. **Gene**, v.77, p.317–324, 1989.

KANG, J.H.; LEE, S.J.; PARK, R.S.; RYU, H.Y. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, v.68, p.494-498, 2002.

KANSAKU, N.; NAKADA, A.; OKABAYASHI, H.; GUÉMÉNÉ, D.; KUHNLEIN, U.; ZADWORNÝ, D.; SHIMADA, K. DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene: Association with egg production. **Journal of Animal Science**, v.74, p.243–244, 2003.

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

KUHNLEIN, U.; WEIGEND, S.; NI, L.; GAVORA, J.S.; FAIRFULL, W.; ZADWORNÝ, D. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. **Animal Genetics**, v.28, p.116-123, 1997.

LEE, B.K.; LIN, G.F.; CROAKER, B.A.; MURTAUGH, M.P.; HANSEN, L.B.; CHESTER-JONES, H. Association of somatotropin (bST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in holstein cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v.13, p.373-381, 1996.

LITTELL, R.C.; FREUND, R.J.; SPECTOR, P.C. **SAS system for linear models** (3 ed Ed). Cary: SAS Institute, 1996.

MACARANAS, J.M.; MATHER, P.B.; LA, S.N.; VEREIVALU, T.; LAGIBALAVU, M.; CAPRA, M.F. Genotype and environment: A comparative evaluation of four tilapia stocks in Fiji. **Aquaculture**, v.150, p.11-24, 1997.

OZAKI, A.; SAKAMOTO, T.; KHOO, S.; NAKAMURA, K.; COIMBRA, M.R.; AKUTSU, T.; OKAMOTO, N. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Molecular Genetics Genomics**, v.265, p.23-31, 2001.

OSURE, G.O.; PHELPS, R.P. Evaluation of reproductive performance and early growth of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) with different histories of domestication. **Aquaculture**, v.253, p.485–494, 2006.

REIS, C.; NAVAS, D.; PEREIRA, M.; CRAVADOR, A. Growth hormone *AluI* polymorphism analysis in eight portuguese bovine breeds. **Archivos de Zootecnia**, v.50, p.41-48.

RHIDA, M.T. Comparative study of growth performance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. at two stocking densities. **Aquaculture Research**, v.37, p.172-179, 2006.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; CROSS, I.; REBORDINOS, L. Determination of RFLP's in genes related to growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In: ADAMS, S.; OLAFSEN, J.A. (Ed). **Biotechnologies for Quality: Extended Abstracts and Short Communications**. Barcelona: European Aquaculture Society, 2004. p. 713-714.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; BARRIOS, M.; CROSS, I.; REBORDINOS, L. Identificación de RFLP en genes relacionados con el crecimiento en dorada *Sparus aurata* L., 1758. **Boletín Instituto Español Oceanografía**, v.21, p.253-259, 2006.

TAMBASCO, D.D.; PAZ, C.C.P.; TAMBASCO-STUDART, M.; PEREIRA, A.P.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R.; COUTINHO, L.L.; PACKER, I.U.; REGITANO, L.C.A. Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus* x *Bos indicus*. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.120, p.51-56, 2003

TAO, W.; BOULDING, E. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Heredity**, v.91, p.60-69, 2003.

ZHOU, G.L.; JIN, H.G.; LIU, C.; GUO, S.L.; ZHU, Q.; WU, Y.H. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. **Journal of Bioscience**, v.30, p.595-598, 2005.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)