

# CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DAS ESPÉCIES *Oreochromis niloticus* e *O. mossambicus*

Jéssica Helena Gomes Ferreira<sup>1</sup>, Alexandre Wagner Silva Hilsdorf<sup>2</sup>

Estudante do curso de Ciências Biológicas, e-mail: jhelenagf@hotmail.com

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes, e-mail Wagner@umc.br

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: PCR, PCR-Multiplex, PCR-RFLP e tilápia.

## INTRODUÇÃO:

Tilápia é um peixe de água doce, nativos da África e atualmente, encontram-se entre os peixes mais cultivados do mundo (KOCHER *et al.*, 1998, TREWAVAS, 1983) São de grande interesse mundial devido suas características produtivas vantajosas, como fácil adaptação e reprodução, rápido crescimento e tolerância à amônia e a alcalinidade da água (HILSDORF, 1995; SIMBINE, 2010). Dentre as espécies mais cultivadas estão a tilápia moçambicana *Oreochromis mossambicus* (Peter, 1852) e a tilápia do Nilo *O. niloticus* (Linnaeus, 1757), somando-se a elas seus variantes e híbridos com coloração avermelhada, chamadas de tilápias vermelhas (LOVSHIN, 1998). A *O. mossambicus* se adapta facilmente a elevadas salinidades, o que torna possível o seu cultivo em água salgada, porém, apresenta um crescimento lento, enquanto que a *O. niloticus* cresce rapidamente, mas não é resistente a concentrações salinas. Dessa forma, a criação de um híbrido interespecífico dessas duas espécies mostrou que este possui maior de ganho de peso em relação a *O. mossambicus* e um crescimento maior apenas em salinidades mais elevadas quando comparadas a *O. niloticus*, sendo este híbrido de grande interesse para a aquicultura (KAMAL & MAIR, 2005). Contudo, técnicas de hibridização interespecíficas, mal conduzidas na aquicultura, têm levado à perda de espécies puras (McANDREW & MAJUMDAR, 1983), altos níveis de depressão endogâmica (EKNATH *et al.*, 1993) e contaminação de linhagens geneticamente melhoradas por introgressão de espécies selvagens (MARACANAS *et al.*, 1986). A hibridização no ambiente natural é a principal preocupação para a conservação das espécies nativas (ROGNON & GUYOMARD, 2003). Trewavas (1983) descreveu que esses híbridos são de difícil identificação morfológica, uma vez que os retrocruzamentos apresentam-se muito semelhantes às espécies parentais puras. Portanto, o emprego de marcadores moleculares para a caracterização e diferenciação das espécies parentais e de híbridos interespecíficos apresenta-se como uma ferramenta eficaz para o melhor entendimento da dinâmica do processo de hibridação interespecífica. Por conseguinte, este trabalho teve como objetivo desenvolver e testar métodos de identificação de *O. niloticus*, *O. mossambicus* e seus híbridos por meio de PCR, PCR Multiplex e PCR-RFLP, bem como verificar a ocorrência de hibridização natural dessas espécies nos rios de Moçambique.

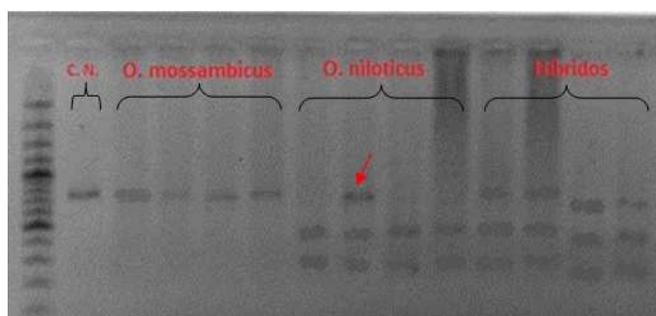
## MÉTODO:

Utilizou-se um total de 60 amostras caracterizadas morfolologicamente como *O. mossambicus*, *O. niloticus* e possíveis híbridos. A partir das sequências obtidas do *Genbank*, desenvolveram-se iniciadores universais para a região ITS do gene nuclear e, para o gene nuclear da transferrina, foram feitos iniciadores universais, específicos e mapas de enzimas de restrição. Na região ITS, observou-se uma diferença de 57 pb no

tamanho do *amplicon* entre as espécies e foram estabelecidas condições de PCR para verificar esta diferenciação. Para a técnica do PCR Multiplex, foram testadas e otimizadas as condições para a análise dos iniciadores. Quanto à técnica PCR-RFLP, verificou-se e testou-se enzimas de restrição capazes de gerar padrões de clivagem para cada espécie estudada, sendo selecionadas três enzimas com especificidade para espécie *O. niloticus*, a XbaI, TaqI e HhaI. Para uma maior confiabilidade das análises, realizou-se também o sequenciamento de amostras.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na análise *in silico* da região ITS, observou-se que a espécie *O. mossambicus* apresentava 730 pb e a *O. niloticus*, 673 pb, contudo, a iniciador desenvolvido apresentou baixa reprodutibilidade e, devido à pequena diferença de tamanho, não houve separação das bandas por meio de gel de agarose. A partir do gene transferrina, constatou-se que o iniciador específico para *O. mossambicus* (487 pb) não amplificou nenhuma das amostras e o da *O. niloticus* (380 pb) mostrou-se inespecífico. Devido a isso, realizou-se o sequenciamento de amostras de ambas as espécies para a verificação dos *amplicons* específicos e observou-se que há variações quando comparados às sequências do *GenBank*, sobre as quais foram desenhados os iniciadores, sendo que a região do gene da transferrina sequenciada não apresentou polimorfismos o suficiente para construção de novos iniciadores específicos e diferenciação das espécies por meio da técnica de PCR Multiplex. Para PCR-RFLP, foram testadas três enzimas específicas para *O. niloticus*, XbaI, TaqI e HhaI. As enzimas XbaI e TaqI apresentaram corte enzimático tanto nas espécies de *O. mossambicus*, quanto nas de *O. niloticus*, além dos híbridos, demonstrando inespecificidade. No entanto a enzima HhaI obteve sucesso na diferenciação das espécies deste trabalho, apresentando diferentes padrões de clivagem para cada uma: corte enzimático para a espécie *O. niloticus* com duas bandas de aproximadamente 550 pb e 162 pb, apenas uma banda para a *O. mossambicus* com 712 pb, não havendo corte nessa espécie, e três bandas para os híbridos interespecíficos com 712, 550 e 162 pb (Figura 1). Realizou-se, posteriormente, o corte enzimático em todas as amostras e das 20 caracterizadas anteriormente como *O. mossambicus*, seis são na verdade híbridos. Entre os 20 *O. niloticus*, nove híbridos foram identificados, três são *O. mossambicus* e uma amostra não se obteve confirmação por ausência de bandas em todos os testes realizados. Já entre os 20 caracterizados como híbridos, somente seis foram confirmados, do restante, 12 apresentaram padrão de clivagem de *O. niloticus* e duas confirmaram ser *O. mossambicus*.



**Figura 1** – Gel de agarose a 2% de PCR-RFLP do gene da transferrina com a enzima de restrição HhaI em quatro indivíduos caracterizados como *O. mossambicus*, quatro como *O. niloticus* e quatro como possíveis híbridos (Híbridos). O controle negativo (C.N.) é representado pelo produto da PCR sem a presença da enzima de restrição. A seta vermelha indica a presença de um híbrido em meio aos indivíduos caracterizados morfologicamente como *O. niloticus*.

Tais resultados nos demonstram a atual dificuldade dos taxonomistas em identificar populações de espécies altamente misturadas por hibridização e retrocruzamentos com base apenas em sua morfologia, como já dito por Trewavas (1983). Dessa forma, é de grande importância focar maior atenção e cuidados à espécie pura de *O. mossambicus* (ROGNON & GUYOMARD, 2003), uma vez que esta linhagem pode estar desaparecendo na região e em outros lugares.

### **CONCLUSÃO:**

Até o presente momento, não foi possível estabelecer condições, para as técnicas PCR e PCR-Multiplex que fossem eficazes na diferenciação das espécies estudadas. Os iniciadores específicos desenvolvidos não revelaram amplificação distinta para cada espécie. A região do gene da transferrina a qual foi sequenciada apresenta baixo índice de polimorfismo. As enzimas XbaI e TaqI não expressaram cortes enzimáticos espécie-específicos. Contudo, a técnica de PCR-RFLP utilizando-se a enzima de restrição HhaI mostrou-se ser um método viável para diferenciar as espécies desse estudo. Nas amostras coletadas dos Rios dos Elefantes e Rio Limpopo, ambos em Moçambique, houve identificação tanto de *O. mossambicus* e *O. niloticus*, quanto de híbridos, provando haver a contaminação das bacia hidrográfica pela espécie exótica *O. niloticus*, bem como a ocorrência de hibridização em ambiente natural.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

EKNATH, A. E.; TAYAMEN, M. M.; PALADA DE VERA, M. S.; DANTING, J. C.; REYES, R. A. Genetic improvement of farmed tilápias: the growth performance of eighth strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. **Aquaculture III**, p. 171-188, 1993.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas - Uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, p.73-84, 1995.

KAMAL, M. A. H. MD & MAIR, C. G. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. In: NEIRA, R. e DÍAZ, N. F. Genetics in Aquaculture VIII. Elsevier. **Aquaculture**, v. 247, p. 189-201, 2005.

KOCHER, T. D.; LEE, W. J.; SOBOLEWSKA, H. PENMAN, D.; McANDREW, B. A. Genetic linkage map of a cichlid fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetic Society of America**. Genetics, v. 148, p. 1225-1232, 1998.

LOVSHIN, L. L. Criteria for Selecting Nile Tilapia and Red Tilapia for Culture. In: Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Peixes, **Piracicaba**, SP, v. 2, p. 79-198, 1998.

MACARANAS, J. M.; TANIGUCHI, N.; PANTE, M. J. R.; CAPILI, J. B.; PULLIN, R. S. V. Electrophoretic evidence for extensive hybrid gene introgression into commercial *Oreochromis niloticus* (L.) stocks in the Philippines. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 17, p. 249-258, 1986.

McANDREW, B.J. & MAJUMDAR, K.C. Tilapia stock identification using electrophoretic markers. **Aquaculture**, v. 30, p. 249-261, 1983.

ROGNON, X. & GUYOMARD, R. Large extent of mitochondrial DNA transfer from *Oreochromis aureus* to *O. niloticus* in West Africa. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 435-445, 2003.

SIMBINE, L. Avaliação da diversidade genética de populações da tilápia *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) das bacias dos rios Incomati, Sabié, Limpopo e Umbeluzi em Moçambique. **Tese de Mestrado**. Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP (Brasil), 2010.

TREWAVAS, E. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis*, and *Danakilia*. **British Museum** (Natural History), London, p. 583. 1983.