

CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO *LOCUS* MICROSSATÉLITE LOCALIZADO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO EM TAMBAQUIS (*Colossoma macropomum*)

Mariana Ayumi Goto¹; Caio Augusto Perazza²; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: mariana.goto.umc@gmail.com¹

Pós-doutorando da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: caioperazza@gmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br³

Área de conhecimento: Biologia molecular

Palavras-chave: aquicultura; marcador molecular; taxa de crescimento

INTRODUÇÃO

O Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) é uma espécie de peixe pertencente à ordem Characiformes e família Serrasalminidae (FROESE e PAULY, 2017), nativo das Bacias Solimões/Amazonas e Orinoco é considerado um peixe de grande porte pode alcançar 1 m de comprimento e 30 kg de peso (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998) (Figura 1).

Figura 1- Exemplar de tambaqui (*Colossoma macropomum*)



O valor comercial, grande aceitação pelo mercado consumidor, alta taxa de crescimento e fecundidade em cativeiro (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998) tornam esta espécie a principal nativa cultivada em pisciculturas brasileiras e ocupa o segundo lugar no *ranking* nacional de produção (IBGE, 2015). Pelo fato de o *C. macropomum* ter grande importância econômica para a aquicultura neotropical e em programas de cultivo de peixes no Brasil, a espécie foi incluída no projeto Aquabrazil que possibilitou pesquisas na área de melhoramento genético na aquicultura começarem a ser desenvolvidos (RESENDE, 2009). Como a taxa de crescimento é uma das características mais visadas em programas de melhoramento animal, o hormônio de crescimento (GH – *Growth hormone*) tem despertado interesse de pesquisadores, pois secretado pela glândula hipófise é responsável por estimular o crescimento em todos os vertebrados (ALMULY

et al., 2005). Já foram relatados estudos de associações de polimorfismos com o gene que codifica o GH em algumas espécies de peixes como o Salmão – do – Atlântico (*Salmo salar*), a Dourada (*Spaurus aurata*) e a Tilápia – do – Nilo (*Oreochromis niloticus*) (BLANCK *et al.*, 2009). No Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA) ao comparar *P. mesopotamicus* e o *C. macropomum*, ambos pertencentes à ordem Characiformes, foi constatado na região promotora do gene que codifica o GH uma sequência de aproximadamente 80 pares de bases exclusivos do *C. macropomum* e nesta a presença de um *locus* STR (*Short Tandem Repeat* - STR) tetranucleotídeo. Em outro trabalho este *locus* já havido sido publicado como um STR neutro, sem que os autores soubessem a região que este se encontra. De acordo com os dados do GenBank esse *locus* STR tetranucleotídeo ainda não foi correlacionado a região que codifica o GH. Dessa forma é de grande relevância econômica para a aquicultura neotropical estudar o *locus* STR da região promotora do GH para o melhoramento genético da espécie *C. macropomum*.

OBJETIVOS

Padronizar as condições de amplificação para o *locus* microssatélite STR localizado na região promotora do gene que codifica o GH e avaliar o polimorfismo desta região em populações de *C. macropomum* provenientes de diferentes localidades no Brasil.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 469 amostras da nadadeira caudal de tambaquis provenientes de sete plantéis do Brasil: Porto Velho (RO) (235 amostras - cativo), Santarém (PA) (60 amostras - cativo), Balbina (AM) (36 amostras - selvagem), Manaus (AM) (30 amostras - cativo), DNOCS (CE) (60 amostras - cativo), Mogi Mirim (SP) (36 amostras - cativo) e Pirassununga (SP) (12 amostras - cativo) que estavam armazenadas no banco de tecidos do Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA) da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) em Mogi das Cruzes, SP. A extração do DNA genômico foi executada pelo protocolo de extração salina (CARIAGA MARTÍNEZ e ZAPATA, 2005). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi preparada utilizando os seguintes reagentes: água milli-Q, tampão, cloreto de magnésio, dntp's, iniciadores *forward* Cm_MiF2: CCCCgAAAAGACTACTACACC com a cauda M13 (5' TGtAAAACGACGGCCAGT 3') e *reverse* Mi_CmR2: CAATGACAGCAGGGATAGG, taq DNA polimerase e fluoróforo M13 para amplificar o *locus* STR localizado na região promotora do gene que codifica o GH da espécie *C. macropomum*. Para a amplificação das reações foi utilizado o termociclador de PCR (Applied Biosystems). A genotipagem foi feita no equipamento Li-Cor 4300 DNA Analyzer utilizando gel de poli-acrilamida (6,5%) e marcadores de peso molecular (IRDYE®700 50-350bp Sizing Standard). Os níveis de polimorfismo e a diversidade alélica foram avaliados pela riqueza alélica (Ar), Fis, frequência alélica e genotípica calculadas no Programa Fstat V. 2.9.3.2 (GOUDET, 2002); os cálculos de heterozigotidade observada (Ho), esperada (He) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram estimados no Programa Arlequin V. 3.0 (EXCOFFIER *et al.*, 2006) e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) no programa CERVUS (MARSHALL, 1998).

RESULTADOS/DISCUSSÃO

De 469 amostras extraídas foram amplificadas 392 por PCR, sendo: 231 de Porto Velho (RO), 38 de Santarém (PA), 32 de Balbina (AM), 26 de Manaus (AM), 26 de DNOCS (CE), 33 de Mogi Mirim (SP), e 6 de Pirassununga (SP). A reação de PCR foi

preparada em um volume final de 25 µl contendo: 15,4 µl de água milli-Q, 2,5 µl de tampão (25mM), 1,5 µl de cloreto de magnésio (25mM), 2 µl de dntp's (100mM), 0,5 µl de primer *forward* Cm_MiF2 (10mM), 0,5 µl de primer *reverse* Mi_CmR2 (10mM), 0,4 µl de taq DNA polimerase (5UI/ µl) e 0,2 µl de fluoróforo M13 (10µM). A ciclagem utilizada consistiu nas seguintes condições: desnaturação do DNA inicial por 10min a 95 °C; 35 ciclos de 1min a 94 °C, 1min a 52 °C, e 30s a 72 °C; e uma etapa de extensão de 10min a 72 °C. Foram genotipadas as 392 amostras amplificadas. O *locus* STR localizado na região 5' proximal do gene que codifica o GH da espécie *C. macropomum* é polimórfico com número de 4 alelos e riqueza de 1,815. Os alelos obtidos foram 118, 122, 126 e 130, e os genótipos 118/118, 122/122, 118/130, 122/130, 126/130 e 130/130 com respectivas frequências de 1%, 8%, 1% e 90% para os alelos e 0,76%, 1,53%, 0,51%, 12,5%, 1,27% e 83,41% para os genótipos. O alelo 118 foi exclusivo para as populações de Santarém (PA) e Manaus (AM). O Conteúdo de Informação Polimórfico (PIC) encontrado foi de 0,163 e este valor indica que o *locus* é pouco informativo para diferenciar populações. A heterozigosidade observada (H_o) e a esperada (H_e) foram de 19% e 23% respectivamente, significando que por ambas apresentarem estimativas próximas há a manutenção da variabilidade genética desse *locus* nas populações. O STR do presente estudo não se encontra em EHW, uma vez que o p-valor foi significativo ($< 0,05$) indicando que a média da frequência alélica nas populações difere da média em uma população fictícia que está EHW. Como este *locus* está localizado na região promotora do GH, hormônio relacionado com a taxa de crescimento em peixes (DIAS, 2015), as populações avaliadas podem estar passando por processos de seleção artificial, haja vista que são majoritariamente populações de cativeiro. O coeficiente de endogamia (F_{is}) médio encontrado para todas as populações foi de 0,158. Este resultado corrobora a hipótese de que as populações possam estar passando por um processo seletivo, dado que por ausência de controle zootécnico os acasalamentos não são panmíticos e podendo assim, aumentar a endogamia ao longo das gerações. O polimorfismo observado no *locus* STR localizado na região promotora do GH permite que estudos futuros sejam desenvolvidos com expressão gênica e associação fenótipo/genótipo e dessa maneira, sendo mais um fator contribuinte para implementação de um programa de melhoramento genético para o *C. macropomum*.

CONCLUSÕES

Foi possível padronizar as condições de amplificação para o *locus* microsatélite localizado na região promotora do gene que codifica o GH e avaliar o polimorfismo desta região em populações de *C. macropomum* provenientes de diferentes localidades no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMULY R.; POLEG-DANIN Y.; GORSHKOV G., RAPOPORT B.; SOLLER M.; KASHI Y.; FUNKENSTEIN B. Characterization of the 5' flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter. Fisheries Science, v.71, n. 1, p. 479-490, 2005.

ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé, AM: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: MCT-CNPq, 1998. 186 p.

BLANCK, D. V.; GASPARINO, E.; RIBEIRO, R. P.; MARQUES, D. S. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia – do – nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 6, p. 599-604, 2009.

CARIAGA MARTÍNEZ, A. E.; ZAPATA, P. D. El laboratorio de biología molecular: una guía práctica. 1ª ed. Argentina, Posadas, EDUNaM, 2005.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis, v. 1, 2006.

FROESE, R.; PAULY, D. FishBase (version Feb 2017). In: ROSKOV, Y. *et al.* Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 26th July 2017. Digital resource at www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands, 2017.

GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne, USA: Department of Ecology & Evolution, University of Lousanne, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal 2015. v. 43, p. 1-49, 2015.

MARSHALL, T. Cervus statistical software, Ver. 1.0., University of Edinburgh, 1998.

RESENDE, E. K. Pesquisa em rede em aquicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. *Aquabrazil. Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p. 52-57, 2009.