



MARCO AURÉLIO DESSIMONI DIAS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO GENE DO
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM
VARIEDADES DE TILÁPIA UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

**LAVRAS - MG
2014**

MARCO AURÉLIO DESSIMONI DIAS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO GENE DO HORMÔNIO
DO CRESCIMENTO EM VARIEDADES DE TILÁPIA UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não-Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

Coorientadores

Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

Dra. Sarah Laguna Conceição Meirelles

Dra. Silvia Eda Arranz

**LAVRAS - MG
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Dias, Marco Aurélio Dessimoni.

Caracterização genética do gene do Hormônio do Crescimento
em variedades de tilápia utilizando marcadores microssatélites /
Marco Aurélio Dessimoni Dias. – Lavras : UFLA, 2015.

137 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador(a): Alexandre Wagner Silva Hilsdorf.

Bibliografia.

1. análise de associação. 2. *GHI*. 3. *Oreochromis niloticus*. 4.
Seleção assistida por marcadores. 5. *STR*. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

MARCO AURÉLIO DESSIMONI DIAS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO GENE DO HORMÔNIO
DO CRESCIMENTO EM VARIEDADES DE TILÁPIA UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não-Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 17 de novembro de 2014.

Dr. José Bento Serman Ferraz	USP
Dr. Rafael Vilhena Reis Neto	UNESP
Dr. Júlio Sílvio de Sousa Bueno Filho	UFLA
Dra. Priscila Vieira e Rosa	UFLA

Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf
Orientador

LAVRAS - MG
2014

Aos meus familiares, em especial ao meu pai José (*in memoriam*); à minha mãe Regina; minhas irmãs & cunhados, Mariana & Rogerio e Thatyana & Diogo; à minha afilhada e sobrinha Ana Clara e à minha noiva Talitha.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf por me receber em seu grupo e pela hospitalidade, amizade, paciência e tolerância durante a orientação deste projeto.

Ao Prof. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas pelo acolhimento e coorientação.

À Profa Silvia Eda Arranz pela coorientação no Instituto de Biologia de Rosário.

Aos membros da banca, Professores José Bento Sterman Ferraz, Júlio Silvio de Sousa Bueno Filho, Rafael Vilhena Reis Neto e Sarah Laguna Conceição Meirelles.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, processo nº: 142832/2010-3.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa do programa: CAPES/CAPG-BA nº: 052-11.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento do projeto, processo nº 2011/23752-2.

À Royal Fish pelo espaço e material biológico. Aos funcionários e ex-funcionários (Adilson, Juarez, Salvador, Jailda, Israel, Gordinho e Baiano) e à pós-graduada Aline na condução do experimento.

À Universidade de Mogi das Cruzes pelo laboratório onde foram realizadas as análises moleculares.

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras: todos os professores, técnicos e funcionários e aos amigos da pós-graduação pelo apoio e incentivo durante esses 4 anos e na realização deste trabalho. Em especial, à ex-Coordenadora de Pós-Graduação Profa Priscila Vieira e Rosa e a sempre amiga e presente Tutora Profa Flávia de Oliveira Borges Saad.

Aos pós-graduandos e amigos: Caio, Fernando e Suhaila na batalha diária da condução do experimento. E a todos os membros e afiliados (Soraya e Jaqueline) do LAGOAA durante o transcorrer do período em que trabalhei com eles.

Ao prof. Wagner Alves de Souza Júdice, amigo para vida!

Aos professores do DBI e do DEX que contribuíram para minha formação.

Aos meus contemporâneos “UFLAnianos” na condução do primeiro experimento.

E, aos coordenadores e secretário da Associação de Pós-Graduandos da UFLA, companheiros de jornada a favor de uma pós-graduação ainda melhor.

**“Para conseguir a amizade
de uma pessoa digna é
preciso desenvolver em nós
mesmos as qualidades que
naqueles admiramos”.**

Sócrates

RESUMO GERAL

Para avaliar a diversidade genética e polimorfismo do Gene do Hormônio do Crescimento (*GH-1*) sobre o desempenho em tilápia (*Oreochromis niloticus*) foram realizados dois experimentos. No primeiro, indivíduos das variedades GIFT (n=25) e UFLA (n=20) do plantel da Universidade Federal de Lavras e das variedades Chitralada (CHIT, n=26) e Red-Stirling (REDS, n=25) do plantel comercial da Indústria Brasileira de Peixe Ltda. em Itupeva – SP foram amostrados aleatoriamente para prospectar a diversidade genética entre e dentro as variedades por marcadores microssatélites (*Short Tandem Repeats-STR*). A sequência do *GHI* depositada no *GeneBank* foi submetida à triagem e prospecção de fraguimentos de leitura abertos (*ORF's*) pelo programa *Tandem Repeats Finder*. Para caracterização das variedades foram utilizados dez *loci STR* genômicos e dois *loci STR* funcionais. Os parâmetros populacionais: número de alelos, riqueza alélica, frequências alélicas e genotípicas, heterozigosidade observada e esperada, índices de fixação de índice Wright e de Jost (D_{EST}) foram estimados na análise de divergência. Dois *loci STR* nas posições -693/-679 (região do promotor, motivo (ATTCT)8) e +140/+168 (região do íntron 1, motivo (CTGT)7) foram encontrados no gene *GHI*. As variedades UFLA e GIFT são menos divergentes geneticamente (D_{EST} = 0,10) e possuem estruturação similar em relação às variedades CHIT e REDS (D_{EST} = 0,32 e 0,33; 0,45 e 0,47, respectivamente), sendo estas últimas as mais distantes (D_{EST} = 0,59). A variedade REDS foi o grupamento com menores índices de variabilidade (heterozigosidade observada de 0,56 e riqueza alélica média de 6,96). A variedade UFLA mostrou ser um recurso genético distinto das outras variedades e que, por sua origem e história, deve ser preservado para seu uso em programas de melhoramento. No segundo experimento, um cruzamento absorvente entre as variedades CHIT e REDS foi realizado até a obtenção da terceira geração e após atingirem maturidade sexual os animais foram acasalados concomitantemente (proporção 1 macho : 2 fêmeas, n=90) para obtenção de grupos de contemporâneos (parentais, 1/2 CHIT: REDS e recíprocos, 3/4 F1: CHIT e recíprocos, e 7/8 F2:CHIT) os quais foram avaliados quanto ao desempenho em tanques-rede. As características estudadas na análise de associação com os *STR* no gene *GHI* foram: peso e medidas morfométrica (Comprimento Padrão; Altura e Largura do corpo). A função *lmer* () do pacote *lme4* do programa R foi utilizada para estimação dos efeitos aleatórios. Como fontes de variação consideraram-se os efeitos fixos: idade, tanque-rede e sexo do animal; e aleatórios: grupamento genético, *STR*-Promotor e *STR*-Íntron. Os *loci STR*-promotor e *STR*-Íntron foram importantes fontes de variação para as variáveis avaliadas independente do sexo e grupamento genético. Os resultados sugerem que os *loci STR*-Promotor e *STR*-Intron no gene *GHI* podem ser considerados como *QTL's* para a taxa de crescimento em tilápia e, por conseguinte, serem incorporados em programas de melhoramento.

Palavras-chave: Análise de associação. *GHI*. Tilápia. Seleção assistida por marcadores. *STR*.

GENERAL ABSTRACT

To assess the genetic diversity and growth hormone gene (GH1) polymorphisms related to tilapia performance two experiments were carried out. In the first one, GIFT (n=25) and UFLA (n=20) strains from University Federal of Lavras and, Chitralada (CHIT, n=26) and Red Stirling strains from *Indústria Brasileira do Peixe* fish farm located in Itupeva, São Paulo, were sampled randomly to prospect the genetic diversity between and within strains by microsatellite markers (Short Tandem Repeats-STR). *GH1* gene GeneBank sequence was screened and STR loci were prospected by the Tandem Repeats Finder software. The strains genetic characterizations were carried out by ten genomic STR loci. Population parameters, such as allele number, allelic richness, allelic and genotypic frequencies, observed and expected heterozygosity, fixation Wright and D_{EST} indexes were estimated in the analysis of divergence. Two STR loci, in -693/-679 (promoter region, motif (ATTCT)₈) and +140/+168 (intron region, motif (CTGT)₇) GH1 gene positions were found. UFLA and GIFT strains are genetically less divergent ($D_{EST} = 0.10$) and showed a similar genetic differentiation when compared with Chitralada and Red-Stirling strains ($D_{EST} = 0.32$ e 0.33 ; 0.45 e 0.47 , respectively), which were the most divergent ones. REDS strain showed lower variability levels (observed heterozygosity of 0.56 and average allelic richness of 6.96). UFLA strain showed to be a distinct genetic resource, because of its origin and history, should be preserved to be used in breeding programs. In second experiment, we carried out recurrent crossings between CHIT and REDS to achieving the third crossing generation. After sexual maturation the animals were crossed (proportion 1 male: 2 females, n=90) to produce contemporary groups (parental, $\frac{1}{2}$ CHIT : REDS and reciprocal, $\frac{3}{4}$ F1: CHIT and reciprocal, and $\frac{7}{8}$ F2:CHIT) with will be tested in performance in cages. The performance traits evaluated in the association analysis with GH1 STRs polymorphism were: weight and morphometric measurements (standard length, body height and width). The function *lmer* () of the package *lme4* of R software were used to estimate the random effects. As variation sources, we considered the fixed effects: sex, contemporary group of age and the animal initial weight class; and random: genetic group, STR-Promoter and STR-Intron. STR-Promoter and STR-Intron loci showed important variation related to the traits independently of sex, initial weight class and genetic group effects. The outcomes suggest that STR-Promoter and STR-Intron loci, found in GH1 gene can be regard as QTL's for growth rate in farming tilapia and, therefore, they can be incorporated into tilapia breeding programs.

Key-words: Association analysis. GH1. Tilapia. Marker assisted selection. STR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Variedades de tilápia do Nilo: A e B - “ <i>Genetic Improvement of Farmed Tilapia</i> ”; C- Chitralada; D e E - Universidade Federal de Lavras; e F- Red-Stirling.....	8
Figura 2	Estação de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras e B- Placa de inauguração da Estação de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras.....	9
Figura 3	Sequência parcial do gene <i>GHI</i> (GeneBank M97766-1; Ber; Daniel,1992). Em destaque: loci STR (letras maiúsculas vermelhas), éxons 1 e 2 (realce amarelo) e TATA-box (realce azul e letras maiúsculas vermelhas).....	35
Figura 4	Alinhamento dos dois pares de iniciadores desenhados junto às sequências dos genes <i>GHI</i> (M 97766-1) e do <i>GH2</i> (M97765.1).....	36
Figura 5	Imagens capturadas nas corridas dos <i>loci</i> , <i>STR</i> -Promotor e <i>STR</i> -Íntron, nas quatro variedades de tilápia: Universidade Federal de Lavras (UFLA), Genetic Improvement of Farmed Tilápias (GIFT), Chitralada (CHIT) e Red-Stirling (REDS). Marcador: 50-350 bp DNA Sizing Standard IRDye®700.....	37
Figura 6	Histograma das frequências alélicas do <i>locus STR</i> -Promotor por variedade de tilápia.....	39
Figura 7	Histograma das frequências genotípicas para o <i>locus STR</i> -Promotor por variedades de tilápia.....	39
Figura 8	Histograma das frequências alélicas do <i>locus STR</i> -Íntron por variedade de tilápia.....	40
Figura 9	Histograma das frequências genotípicas do <i>locus STR</i> -Íntron por variedade de tilápia.....	40

Figura 10	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> UNH-828 por variedade de tilápia.....	43
Figura 11	Histograma das frequências genotípicas do <i>locus</i> UNH-828 por variedade de tilápia.....	43
Figura 12	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> UNH-829 por variedade de tilápia.....	44
Figura 13	Histograma das frequências genotípicas do <i>locus</i> UNH-829 por variedade de tilápia.....	44
Figura 14	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> UNH-005 por variedade de tilápia.....	45
Figura 15	Histograma das frequências genotípicas do <i>locus</i> UNH-005 por variedade de tilápia.....	45
Figura 16	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> UNH-009 por variedade de tilápia.....	46
Figura 17	Histograma das frequências genotípicas do <i>locus</i> UNH-009 por variedade de tilápia.....	46
Figura 18	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> UNH-103 por variedade de tilápia.....	47
Figura 19	Histograma das frequências genotípicas do <i>locus</i> UNH-103 por variedade de tilápia.....	47
Figura 20	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> UNH-104 por variedade de tilápia.....	48
Figura 21	Histograma das frequências genotípicas do <i>locus</i> UNH-104 por variedade de tilápia.....	48
Figura 22	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> UNH-123 por variedade de tilápia.....	49
Figura 23	Histograma das frequências genotípicas do <i>locus</i> UNH-123 por variedade de tilápia.....	49
Figura 24	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> UNH-203 por variedade de tilápia.....	50

Figura 25	Histograma das frequências genóticas do <i>locus</i> UNH-203 por variedade de tilápia.....	50
Figura 26	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> UNH-866 por variedade de tilápia.....	51
Figura 27	Histograma das frequências genóticas do <i>locus</i> UNH866 por variedade de tilápia.....	51
Figura 28	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> GM-672 por variedade de tilápia.....	52
Figura 29	Histograma das frequências genóticas do <i>locus</i> GM-672 por variedade de tilápia.....	52
Figura 30	Medidas morfométricas em <i>O. niloticus</i> : comprimento padrão (<i>CP</i>), a altura (<i>A</i>) e largura (<i>L</i>) corporal. Peixe: $\frac{3}{4}$ de Chitralada: $\frac{1}{4}$ de Red-Stirling.....	83
Figura 31	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> <i>STR</i> -Promotor. (A) Por Grupamento Genético: GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: $\frac{1}{2}$ CHIT:REDS; GG4: $\frac{1}{2}$ REDS:CHIT; GG5: $\frac{3}{4}$ (GG4):CHIT; GG6: $\frac{7}{8}$ (GG5):CHIT; GG7: $\frac{3}{4}$ CHIT:(GG4). (B) Machos. (C) Fêmeas.....	86
Figura 32	Histograma das frequências genóticas do <i>locus</i> <i>STR</i> -Promotor. (A) Por Grupamento Genético: GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: $\frac{1}{2}$ CHIT:REDS; GG4: $\frac{1}{2}$ REDS:CHIT; GG5: $\frac{3}{4}$ (GG4):CHIT; GG6: $\frac{7}{8}$ (GG5):CHIT; GG7: $\frac{3}{4}$ CHIT:(GG4). (B) Machos. (C) Fêmeas.....	87
Figura 33	Histograma das frequências alélicas do <i>locus</i> <i>STR</i> -Íntron. (A) Por Grupamento Genético: GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: $\frac{1}{2}$ CHIT:REDS; GG4: $\frac{1}{2}$ REDS:CHIT; GG5: $\frac{3}{4}$ (GG4):CHIT; GG6: $\frac{7}{8}$ (GG5):CHIT; GG7: $\frac{3}{4}$ CHIT:(GG4). (B) Machos. (C) Fêmeas.....	90

Figura 34 Histograma das frequências genóticas do *locus STR-Íntron*. (A) Por Grupamento Genético: GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: $\frac{1}{2}$ CHIT:REDS; GG4: $\frac{1}{2}$ REDS:CHIT; GG5: $\frac{3}{4}$ (GG4):CHIT; GG6: $\frac{7}{8}$ (GG5):CHIT; GG7: $\frac{3}{4}$ CHIT:(GG4). (B) Machos. (C) Fêmeas..... 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos dez marcadores <i>STR</i> genômicos (Lee; Kocher, 1996).....	32
Tabela 2	Descritiva dos dois <i>loci</i> <i>STR</i> do gene <i>GHI</i> em quatro variedades de tilápia: número de alelos (<i>A</i>), riqueza alélica (<i>A_r</i>), estimativa de alelos nulos (<i>A_n</i>), estimativa média de diversidade gênica de Nei's (<i>h_s</i>), conteúdo de informação polimórfica (<i>PIC</i>), heterozigosidade observada (<i>H_o</i>), heterozigosidade esperada (<i>H_e</i>); equilíbrio de Hardy - Weinberg (<i>P_{HW}</i>); coeficiente de endogamia (<i>F_{IS}</i>).....	41
Tabela 3	Descritiva dos dez <i>loci</i> <i>STR</i> genômicos em quatro variedades de tilápia: número de alelos (<i>A</i>), riqueza alélica (<i>A_r</i>), estimativa média de diversidade gênica de Nei's (<i>h_s</i>), conteúdo de informação polimórfica (<i>PIC</i>), heterozigosidade observada (<i>H_o</i>), heterozigosidade esperada (<i>H_e</i>); equilíbrio de Hardy - Weinberg (<i>P_{HW}</i>); coeficiente de endogamia (<i>F_{IS}</i>).....	53
Tabela 4	Diferenciação genética entre quatro variedades de tilápia do Nilo. Índices de fixação: <i>F_{st}</i> (abaixo da diagonal) e <i>D_{EST}</i> (acima da diagonal).....	58
Tabela 5	Análise Hierárquica de variância molecular (AMOVA) entre e dentro das quatro variedades de tilápia avaliadas.....	59
Tabela 6	Grupamentos genéticos obtidos por cruzamento absorvente.....	80
Tabela 7	Característica e sequência dos iniciadores dos <i>loci</i> <i>STR</i> -Promotor e <i>STR</i> -Íntron desenhados por Dias, 2014.....	81

Tabela 8	<p>Descritiva do <i>locus STR</i>-Promotor obtido por cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia Red-Stirling e Chitralada: número de alelos (A), riqueza alélica (A_r), estimativa de alelos nulos (A_n), estimativa média de diversidade gênica de Nei's (h_s), conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e); equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{HW}); coeficiente de endogamia (F_{IS}).....</p>	88
Tabela 9	<p>Descritiva do <i>locus STR</i>-Íntron obtido por cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia Red-Stirling e Chitralada: número de alelos (A), riqueza alélica (A_r), estimativa de alelos nulos (A_n), estimativa média de diversidade gênica de Nei's (h_s), conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e); equilíbrio de Hardy - Weinberg (P_{HW}); coeficiente de endogamia (F_{IS}).....</p>	92
Tabela 10	<p>Diferenciação genética entre sete grupamentos genéticos, obtido por cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia Red-Stirling e Chitralada. Índices de fixação D_{EST} (abaixo da diagonal) e P-value.(acima da diagonal).....</p>	93
Tabela 11	<p>Análise de variância molecular (AMOVA) entre três níveis de coletas hierárquicas.....</p>	94
Tabela 12	<p>Ordenamento do <i>locus STR</i>-Promotor (valores fenotípicos)^{número de peixes}, sobre a característica peso (g) e comprimento padrão (cm), obtidos em um esquema de cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia <i>Red-Stirling</i> e Chitralada.....</p>	96
Tabela 13	<p>Ordenamento do <i>locus STR</i>-Promotor (valores fenotípicos)^{número de genótipos}, sobre as características altura e largura do corpo obtidos em um esquema de cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia <i>Red-Stirling</i> e Chitralada.....</p>	97

Tabela 14	Correlação de Pearson (abaixo da diagonal) e nível de significância (acima da diagonal) entre os ordenamentos genotípicos do <i>locus STR-Promotor</i> em cada característica avaliada por mensuração.....	98
Tabela 15	Ordenamento do <i>locus STR-Íntron</i> (valores fenotípicos) ^{número de genótipos} , sobre as características altura e largura do corpo em um esquema de cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia <i>Red-Stirling</i> e <i>Chitralada</i>	100
Tabela 16	Correlação de Pearson (abaixo da diagonal) e nível de significância (acima da diagonal) entre os ordenamentos genotípicos do <i>locus STR-Íntron</i> em cada característica avaliada por mensuração.....	100

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE		
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	4
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
3.1	Produção e Melhoramento Genético de tilápias.....	5
3.2	Caracterização das variedades de tilápia estudadas.....	6
3.3	Marcadores Moleculares.....	10
3.4	Hormônio do crescimento: função, polimorfismo e sua associação às características de produção.....	13
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS		
ARTIGO 1: Polimorfismo no gene <i>GHI</i> e variabilidade genética de quatro variedades de Tilápia avaliadas por marcadores microsatélites		
	RESUMO.....	26
	ABSTRACT.....	27
1	INTRODUÇÃO.....	28
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3	RESULTADOS.....	34
4	DISCUSSÃO.....	59
5	CONCLUSÕES.....	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ARTIGO 2: Associação de polimorfismo microsatélite no gene <i>GHI</i> com desempenho em um cruzamento absorvente entre as variedades Red-Stirling e Chitralada		
	RESUMO.....	75

	ABSTRACT.....	76
1	INTRODUÇÃO.....	77
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	79
3	RESULTADOS.....	85
4	DISCUSSÃO.....	101
5	CONCLUSÕES.....	106
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
	ANEXOS.....	112
	APÊNDICES.....	116

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura tem garantido cada vez mais a presença do peixe na mesa do consumidor. Em 2012, a aquicultura contribuiu com 49 % da produção de pesca para o consumo humano. Crescimento expressivo, quando comparado com os 5 % em 1962 e 37 % em 2002, e uma taxa de crescimento médio anual de 6,2 % no período 1992-2012 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014). A produção aquícola nacional de origem continental teve um incremento significativo de aproximadamente 38% de 2010 para 2011 demonstrando um crescimento consistente desse setor da aquicultura (BRASIL, 2012).

A tilápia, *Oreochromis ssp*, é o segundo peixe mais cultivado do mundo e segundo projeções da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) para 2030 terá um aumento de 30 % enquanto, por exemplo, a produção dos moluscos, camarões e salmão aumentaria cerca de 10% (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014). No Brasil, a tilápia foi introduzida na década de 70 (LOVSHIN; PEIXOTO; VASCONCELOS, 1976) e a partir de então sua produção vem ganhando espaço. Em 2011, ocupou mais uma vez o primeiro lugar no *ranking* da produção de pescado da aquicultura continental por espécie, ao atingir 253.824,1 mil toneladas, representando 46,62 % da produção total (BRASIL, 2012).

Essa espécie está adaptada às condições climáticas brasileiras e apresenta diversas características zootécnicas adequadas ao cultivo, tais como: fácil manejo, resistência a doenças, tolerância a baixos teores de oxigênio, onívora, rápido crescimento e ausência de espinhas intramusculares em forma de

“Y” (HILSDORF, 1995; POPMA; LOVSHIN, 1995; FREITAS et al., 2009; BRASIL, 2012).

Com o potencial de mercado da Tilapicultura em ritmo crescente foram produzidas, por processos de seleção genética e cruzamentos, algumas variedades de *O. niloticus*, destacando a variedade GIFT - “*Genetic Improvement of Farmed Tilapias*” (EKNATH; ACOSTA, 1998), a variedade Chitralada ou Tailandesa (ZIMMERMANN, 2000) e a variedade UFLA - “Universidade Federal de Lavras”. Dentre as variedades vermelhas, a Red-Stirling (REDS) caracteriza-se por apresentar herança autossômica dominante sobre as variedades de coloração selvagem. Contudo, essa variedade apresenta baixo desempenho produtivo quando comparada com outras variedades produzidas comercialmente (FREITAS et al., 2009).

Para maximizar ganhos por geração, os programas de melhoramento têm utilizado marcadores moleculares para selecionar progenitores de valor genético extremo. Dentre os marcadores mais informativos estão os microssatélites, tendo em vista sua expressão codominante e multialelismo (O'CONNELL; WRIGHT, 1997). Estes marcadores são amplamente utilizados na identificação de estoques geneticamente divergentes, monitorar os níveis de endogamia nos plantéis e em estudos de associação com desempenho produtivo oferecendo, assim, perspectivas promissoras ao melhoramento genético, devido ao aumento da intensidade e acurácia de seleção (ROMANA-EGUIA et al., 2004; MELO et al., 2008).

O gene Hormônio do Crescimento, dentre os genes candidatos ao metabolismo do crescimento, direta ou indiretamente, é o principal regulador de crescimento somático pós-natal, estimulando processos anabólicos, tais como a divisão celular e o crescimento muscular (DE-SANTIS; JERRY, 2007). Esse gene foi duplicado durante a origem evolucionária em alguns peixes (OHNO; WOLF; ATKIN, 1968; KOREN et al., 1989). Na tilápia, o evento de duplicação

do segundo *GH* pode ter ocorrido depois da separação evolutiva dos salmonídeos e suas sequências estão publicadas no *GeneBank*: *GH1* (BER; DANIEL, 1992) e *GH2* (BER; DANIEL, 1993). A alta homologia observada entre os dois *GH* da tilápia indica que a duplicação foi um evento relativamente recente (BER; DANIEL, 1993).

Abordagens complementares de genética quantitativa e molecular são escassas em organismos aquáticos. E, em razão da importância da tilápia na produção nacional, foram avaliadas neste estudo quatro variedades de tilápias de maneira que esta contenha a máxima variação genética para análise de associação molecular com características de desempenho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho foi realizado com os objetivos principais de caracterizar o polimorfismo do Gene do Hormônio do Crescimento-1 de *O. niloticus* e avaliar a variabilidade genética de variedades desta espécie por marcadores microssatélites.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos propostos no presente trabalho foram:

- a)* Avaliar, *in silico*, a sequência do gene *GHI* depositada no *GeneBank* (número de acesso: M 97766-1) em relação à presença de marcadores *STR* de tilápia.
- b)* Prospear modificações genéticas no gene do hormônio do crescimento de plantéis comerciais de tilápia GIFT, UFLA, Chitralada e Red-Stirling, por marcadores microssatélites.
- c)* Avaliar a variabilidade genética intra e interpopulacional de plantéis comerciais de tilápia GIFT, UFLA, Chitralada e Red-Stirling, por marcadores microssatélites.
- d)* Avaliar a variabilidade genética em um esquema de cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia Chitralada e Red-Stirling, por marcadores microssatélites no gene *GHI*.
- e)* Estudar a associação entre os polimorfismos *STR* do *GHI* e as características de desempenho mensuradas em um esquema de cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia Chitralada e Red-Stirling, por marcadores microssatélites.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Produção e Melhoramento Genético de tilápias

Um conjunto de espécies de peixes do gênero *Oreochromis*, comumente denominados tilápias, têm sido amplamente utilizados para o cultivo. Estes peixes alimentam-se da base da cadeia trófica, aceitam uma variedade grande de alimentos e apresentam uma resposta positiva à fertilização dos viveiros. São bastante resistentes a doenças, ao superpovoamento e a baixos níveis de oxigênio dissolvido, sendo, assim, a espécie mais indicada à criação em tanques-rede. Além disso, possuem boas características organolépticas, tais como, carne saborosa, baixo teor de gordura e ausência de espinhas intramusculares em forma de “Y” (miosseptos) (HILSFORD, 1995).

Acredita-se que as tilápias já tenham sido cultivadas no Egito, 2000 anos antes de Cristo, mas sua exploração tem o primeiro registro de cultivo no Quênia em 1924, sendo, a partir deste momento, disseminado para o resto do continente (LOPES-FANJUL; TORO, 1990; WAGNER, 2002). São produzidas, principalmente, na China, nas Filipinas, na Tailândia, na Indonésia e no Egito (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014).

No Brasil, a produção de tilápia, apresentou um crescimento de 63% entre os anos de 2010 e 2011, com produção de 253.824,1 toneladas o que representa 46,62% da produção total de pescado por espécie proveniente da piscicultura continental. Considerando este aumento na produção, incentivos governamentais e a constante intensificação dos sistemas de cultivo, pesquisas são necessárias para tornar a cadeia produtiva cada vez mais eficiente e sustentável, incluindo a busca por variedades de desempenho superior (COSTA et al., 2009).

Uma das maiores dificuldades no desenvolvimento de programas de melhoramento genético na aquicultura é a marcação individual dos peixes (WORLD FISH CENTER, 2004). A marcação por microchips exige que os peixes atinjam um tamanho suficiente, em torno de 30 gramas, além de demandarem muito trabalho e recursos financeiros. Em virtude dessas dificuldades, os poucos programas de melhoramento existentes no Brasil foram baseados em seleção massal (TURRA et al., 2010), apesar de que os custos adicionais fossem mais que compensados pelo ganho em seleção (GALL; BAKAR, 2002).

Em peixes, o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, baseados em informações individuais e de parentes, iniciou na década de 1970 com salmões e trutas (GALL; CROSS, 1978; REFSTIE, 1980; KINGHORN, 1983; GJERDE; GJEDREM, 1984; GJEREN; BENTSEN, 1997), obtendo resultados, em termos de ganho genético, similares aos de culturas tradicionais como, por exemplo, a variedade melhorada de salmão norueguês, com produção aumentada em mais de 60% e redução do custo médio de produção em mais de 65% de 1985 a 1995.

Para peixes tropicais, os programas de tilápias e carpas são considerados referência, o mais conhecido é a metodologia de seleção para tilápias do Nilo (*O. niloticus*) coordenado pelo *WorldFisch Center* em 1990. Experiências mostram que o melhoramento genético pode proporcionar ganhos iniciais de 15% por geração (característica ganho em peso), em programas bem conduzidos (EKNATH et al., 1993; PONZONI et al., 2005; PONZONI et al., 2007), sendo o intervalo de geração fator determinante nos incrementos anuais, dado o tempo gasto pelas espécies para alcançar a maturidade sexual.

3.2 Caracterização das variedades de tilápia estudada

Algumas variedades de tilápia *O. niloticus* foram produzidas por processos de seleção genética e cruzamentos. A linhagem GIFT (Figura 1 – (A) e (B)) destaca-se por sua taxa de crescimento rápido, alto rendimento de filé e resistência a doenças. Originária das Filipinas, esta linhagem foi desenvolvida pela organização não governamental *WorldFish Center* (anteriormente ICLARM), como resultado da seleção e cruzamento de oito linhagens de tilápia: quatro silvestres – do Egito, Gana, Quênia, Senegal; e quatro cultivadas – das Filipinas, Israel, Singapura e Tailândia. Os cruzamentos e a seleção dessas linhagens foram realizados com o objetivo de aumentar a variabilidade genética e a seleção de características desejadas (ROMANA-EGUIA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2011). No Brasil, o programa GIFT teve início em 2005 com importação de 600 exemplares de 30 famílias. Este processo foi realizado por meio de um convênio firmado entre Universidade Estadual de Maringá, no estado do Paraná e o *WorldFish Center*, com o apoio da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP), atual Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e Companhia de Desenvolvimento Agropecuário do Paraná (OLIVEIRA et al., 2012).

A variedade “Universidade Federal de Lavras” (UFLA) foi originada de 2.000 alevinos de *Tilapia nilotica* doadas pela Faculdade de Agricultura e Ciências Veterinárias da UNESP, Campus Jaboticabal, em 11 de novembro de 1977 atendendo ao pedido do Professor Álvaro João L. Almeida do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (DZO/UFLA) (Figura 1- (D) e (E); Apêndices 1 e 2). Essa população foi a primeira a povoar a Estação de Piscicultura do DZO/UFLA quando inaugurada em 1978 (Figura 2). Em seguida, programas de melhoramento genético, baseado em seleção massal, para ganho em peso e forma do corpo, foram realizados durante 25 anos. Dentre

as características da variedade UFLA dá-se destaque à textura firme do filé e o contínuo consumo de ração mesmo em temperaturas abaixo de 18 °C.



Figura 1- Variedades de tilápia do Nilo: A e B - “*Genetic Improvement of Farmed Tilapia*”; C- Chitralada; D e E - Universidade Federal de Lavras; e F- Red-Stirling (Fonte: Antônio Carlos S. Gonçalves, 2014 e Marco Aurélio Dessimoni Dias, 2014)

A variedade Chitralada ou Tailandesa (CHIT, Figura 1 – (C)) foi desenvolvida no Japão e melhorada no palácio real de Chitralada, Tailândia. Esta variedade caracteriza-se por apresentar bom desempenho, rápido crescimento e taxas de alimentação mais elevadas. Em 1996 essa variedade foi introduzida no Brasil por meio de uma doação da *Asian Institute of Technology* (AIT) e foi amplamente difundida na produção nacional (ZIMMERMANN, 2000).



Figura 2 A- Estação de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras e B- Placa de inauguração da Estação de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (Fonte: Marco Aurélio Dessimoni Dias, 2014).

Já, a tilápia vermelha é uma variante mutacional, descoberta na década de 60 na Tailândia (HILSDORF, 1995) e pode ser considerado um marco para o desenvolvimento da criação industrial de tilápia em vários países. Galbreath e Barnes, em 1981, já verificavam a preferência do mercado consumidor pelas tilápias vermelhas: suas pesquisas indicaram que as tilápias vermelhas respondiam por 60% das vendas e as tilápias com pigmentação escura pelos 40% restantes.

Uma variedade vermelha que, atualmente, é usada comercialmente com êxito é a Red-Stirling (REDS, Figura 1 – (F)). Originalmente obtida de uma população de *O. niloticus* selvagem do Lago Manzala, no Egito, em 1979, e que tem sido mantida pelo Instituto de Aquicultura da Universidade de Stirling, Escócia (McANDREW; MAJUMDAR, 1983). A ausência de pigmentação escura, denominada neste projeto como coloração vermelha, é controlada por herança autossômica dominante (HUSSAIN, 1994), de tal modo que os genótipos **RR** e **Rr** correspondem à coloração vermelha e **rr** à coloração escura ou selvagem. Contudo, um ponto negativo que deve ser considerado, pois afeta a aceitação do mercado, é o aparecimento de manchas melânicas escuras na

progênie oriunda do cruzamento da variedade Red-Stirling com variedades do tipo selvagem. Para contornar o problema, programas fundamentados em seleção massal têm sido utilizados para obtenção de populações de coloração vermelha homozigota dominante sem manchas (GARDUÑO-LUGO; MUÑOZ-CÓRDOVA; OLVERA-NOVOA, 2004).

Estudos de variabilidade genética e de crescimento têm sido realizados comparando-se as variedades Red-Stirling, Chitralada e híbridos vermelhos (GANDUÑO-LUGO et al., 2003; MOREIRA; MOREIRA; HILSDORF, 2005; MOREIRA et al., 2007; ROMANA-EGUIA et al., 2010). A variedade Red-Stirling apresenta menor crescimento e ganho em peso em relação à Chitralada. Cruzamentos industriais entre variedades com desempenho superior (GIFT, UFLA e CHIT) e a variedade vermelha de tilápia nilótica podem ser usados no sentido de se obter maiores ganhos com a heterose (vigor de híbrido), maior velocidade crescimento, aumento da eficiência produtiva e manutenção da coloração vermelha. Moreira et al. (2007) mostraram baixo índice de endogamia e variabilidade genética suficiente para o desenvolvimento de processos de melhoramento por cruzamentos e seleção em uma análise genética realizada com o germoplasma parental das variedades, Red-Stirling e Chitralada.

3.3 Marcadores Moleculares

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, correspondentes a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

O uso de marcadores moleculares permite que a seleção seja realizada antes da idade reprodutiva, o que aumenta, consideravelmente, a eficiência de um programa de melhoramento dado à redução no intervalo de gerações. Podem

ser utilizados, em diferentes estudos de estimativas da estrutura populacional, estabelecimento de relações filogenéticas (identificação de espécies e híbridos), construção de mapas genéticos e definição de estratégias de melhoramento (FERGUSON; TAGGART; PRODHOL, 1995).

Dentre os marcadores moleculares mais eficientes estão os microssatélites, também, conhecidos como “*Short Tandem Repeats*” (*STR*). Os *SRT* são elementos repetitivos, formados por arranjos de repetições em *tandem*, de dois a seis nucleotídeos de comprimento e estão entre os *loci* mais polimórficos dos genomas (FERGUSON; TAGGART; PRODHOL, 1995; MILACH, 1998; MATIOLI, 2001). O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do número de elementos repetidos, provavelmente, em razão de erros da DNA polimerase, durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA (STUDART, 2001). A repetição dinucleotídica [CA]_n é uma das mais abundantes famílias de microssatélites nos genomas de vertebrados, ocorrendo a uma média de 15 a 30 kilobases (LEE; KOCHER, 1996; MOREIRA, 1999). Os microssatélites predominantes em peixes compreendem, até agora, repetições de duas bases, usualmente (GT/CA)_n ou (CT/CA)_n (LEE; KOCHER, 1996). Lee e Kocher (1996) isolaram 133 locos [CA]_n e 7 locos [AAC]_n de microssatélites em *Oreochromis niloticus* e estabeleceram os *primers* para as sequências flanqueadoras.

Comparando-se microssatélites com outros marcadores moleculares, constata-se que estes apresentam uma série de vantagens sobre os demais, isto é, são abundantes, cobrem extensivamente o genoma, possuem natureza multialélica, necessitam de pequenas quantidades de DNA para análise, são de fácil detecção por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm herança do tipo mendeliana e são expressos como alelos codominantes (LIMA, 1998; MOREIRA, 1999). Têm sido aplicados em diversos estudos na área animal, entre eles: estimativas de distâncias genéticas; monitoramento de variedades

endogâmicas; testes de paternidade; comparações de composição genética de amostras recentes e antigas e análise da diversidade genética (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2013). Podem, inclusive, indicar aos criadores a ocorrência da redução da diversidade genética em virtude do emprego de um pequeno número de pais, por meio da comparação dos níveis de variabilidade entre a origem e o material derivado (efeito de afunilamento genético). Também auxiliam na identificação dos estoques mais divergentes geneticamente, de forma a maximizar a recuperação da variabilidade genética via cruzamento, bem como para monitorar os níveis de endogamia nos plantéis (MELO et al., 2006).

Variabilidade é um termo comumente usado na genética para indicar diferenças em valores qualitativos ou quantitativos de um caráter entre indivíduos de uma população ou mesmo entre populações. Quando as causas desta variabilidade são de natureza genética, ela é denominada de variação genética (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 1990). A disponibilidade de variação genética é uma necessidade para programas de melhoramento genético, de modo que determinar o quanto da variação existe dentro ou entre as populações se torna uma questão central para os melhoristas ao selecionar caracteres desejáveis em espécies comercialmente importantes.

O estudo molecular da variação genética (principalmente com o uso de marcadores de DNA), envolvendo várias populações e muitos genes, permite avaliar a quantidade de variação comum dentro e entre das populações (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 1990). Estas medidas de variação comum, entre e dentro dos grupos são chamadas de distâncias genéticas e permitem visualizar a relação entre grupos de indivíduos. São análogas às distâncias geométricas, isto é, se a distância é zero não há diferença entre os grupos (NEI, 1972).

3.4 Hormônio do crescimento: função, polimorfismo e sua associação às características de produção

O Hormônio do Crescimento (*GH*) é um peptídeo de, aproximadamente, 22 kDa produzido na região anterior da hipófise, sendo o principal componente de um complexo sistema do sistema endócrino. Sinais neuronais, neuroendócrinos e endócrinos são integrados no sistema nervoso central e na hipófise para regular a taxa de secreção de GH. Esses sinais podem relacionar os ritmos endógenos, estímulos ambientais, bem como feed-back negativo de processos fisiológicos. Na prática, os níveis de GH são dependentes da taxa de secreção da hipófise, mas também taxas e modos de remoção da circulação (BJÖRN et al., 2002).

O alvo central do GH é o fígado (HIRANO, 1991), que estimula os receptores com afinidade nanomolar. As células do fígado ativadas pelo GH produzem o fator de crescimento semelhante à insulina do peixe que pode, posteriormente, estimular o crescimento (DUAN; HIRANO, 1990; SAKAMOTO; HIRANO, 1991; GRAY; KELLEY, 1991; McCORMICK et al., 1992).

De acordo com Gross e Nilsson (1999), em função do alto impacto do gene *GH* na regulação do crescimento e por estar envolvido em diversas funções metabólicas, direta ou indiretamente, 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; NILSSON, 1995), *Salmo salar* (PARK; MORAN; DIGHTMAN, 1995), *Oncorhynchus kisutch* (FORBES et al., 1994), *Alburnus alburnus* (SCHLEE et al., 1996) e *Abramis brama* (GROSS et al., 1996). A maioria destes polimorfismos ocorre na região não-codificadora do gene *GH* conforme foi verificado por diversos autores (FORBES et al., 1994; GROSS et al., 1996; SCHLEE et al., 1996; GROSS; NILSSON, 1999; KANG et al., 2002). A ocorrência de polimorfismos em região não-codificadora não significa,

necessariamente, que esta variação seja estritamente neutra, uma vez que, conforme revisão de Marques-Resende et al. (2011), o controle e ação de genes podem ser controlados por combinações de regiões de DNA distantes.

Em peixes, alguns estudos de associação de polimorfismos em genes do eixo GH com o peso já têm sido relatados (DE-SANTIS; JERRY, 2007). Yue, Li e Orban (2001) identificaram e caracterizaram 4 *STR* em *Lates calcarifer*, presentes no *GH* e no *IGF-2*. Almuly et al. (2005) identificaram e caracterizaram o microssatélite *saGHpCA*, dinucleotídico (CA)_n, foi na região 5'-*flanking* do *GH* em *S. aurata* e sugeriram que esse *STR* poderia ser utilizado com um marcador importante para programas de seleção assistida por marcadores (*SAM*). Yue e Orban (2002) identificaram e verificaram polimorfismo em seis *STR* nos genes *IGF-II*, *GH2*, prolactina-I e insulina de tilápia Moçambica (*O. mossambicus*) e tilápia do Nilo (*O. niloticus*) por triagem de sequências de DNA depositadas no *GeneBank*, e sugeriram que estes *STR*'s poderiam ser úteis para mapeamento de genes, mapeamento econômico de *loci* de características quantitativas (*QTL*) e para estudos de dinâmica evolutiva de *QTL*'s.

Gross e Nilson (1999) estudaram a variação dentro de um fragmento de 1825 pb do gene *GHI* 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 *GHI* com o crescimento da progênie durante o primeiro ano de vida. Kang et al. (2002) realizaram seus estudos em progênies do linguado, encontrando polimorfismos do tipo *GH-Sau3AI* e comprovaram associação com 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. Blank et al. (2009), ao trabalhar com marcadores *RFLP* em linhagens de tilápia GIFT e Chitralada, verificaram que o polimorfismo descrito para o íntron 1, do gene *GHI*, correlacionou-se significativamente com o comprimento total,

comprimento padrão, altura e largura corporal. Foi verificado que o genótipo *PstI*+/- está associado ao melhor crescimento, independentemente da linhagem. A associação verificada pode ter ocorrido em razão do efeito direto da regulação do próprio gene *GH*.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMULY, R. et al. 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**, Tokyo, v. 71, n. 3, p. 479–490, May 2005.

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

BER, R.; DANIEL, V. Structure and sequence of the growth hormone encoding gene from *Tilapia nilotica*. **Gene**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 245-250, Apr. 1992.

BJÖRN, T. et al. Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. **Fish Physiology and Biochemistry**, New York, v. 27, n. 3-4, p. 227–242, Dec. 2002.

BLANCK, D. V. et al. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 6, p. 599-604, June 2009.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura - Brasil 2008-2009**. Brasília: MPA, 2012.

COSTA, A. C. et al. Avaliação do crescimento de Tilápias de diferentes variedades através de Modelos Não Lineares. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 58, supl. 1, p. 561-564, dez. 2009.

DE-SANTIS, C.; JERRY, D. R. Candidate growth genes in finfish: where should we be looking? **Aquaculture**, Amsterdam, v. 272, n. 1–4, p. 22–38, Nov. 2007.

DUAN, C.; HIRANO, T. Effects of insulin-like growth factor-I and insulin on the in vitro uptake of sulphate by branchial cartilage: Evidence for the presence of independent hepatic and pancreatic sulphation factors. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 133, n. 2, p. 211–219, May 1990.

EKNATH, A. E.; ACOSTA, B. O. **Genetic improvement of farmed tilapias**. Philippines: ICLARM, 1998.

EKNATH, A. E. et al. Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 111, n. 1-4, p. 171-188, Apr. 1993.

FERGUSON, A.; TAGGART, J. B.; PRODHOL, A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 47, suppl. A, p.103-126, Dec. 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**. Roma: FAO, 2014. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/YB_Overview.pdf>. Acesso em: 12 out. 2014.

FORBES, S. H. et al. One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the Unites States of America**, Washington, v. 91, n. 5, p. 1628–1631, Mar. 1994.

FREITAS, R. T. F. et al. **Espécies exóticas e nativas de importância para a piscicultura brasileira**. Lavras: Editora da UFLA, 2009.

GALBREATH, B. F.; BARNES, T. A. Consumer preference for color and size of tilapia sold in supermarkets. In: ANNUAL CATFISH FORMED OF AMERICA RESEARCH WORKSHOP, 30., 1981, Stuttgart. **Proceeding...** Stuttgart: FAO, 1981. p. 47-48.

GALL, G. A. E.; BAKAR, Y. Application of mixed-model techniques to fish breed improvement: analysis of breeding-value selection to increase 98-day body weight in tilapia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 212, n. 1-4, p. 93-113, Sept. 2002.

GALL, G. A. E.; GROSS, S. J. Genetic studies of growth in domesticated rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 225-234, Mar. 1978.

GANDUÑO-LUGO, M.; MUÑOZ-CÓRDOVA, G.; OLVERA-NOVOA, M. A. Mass selection for red colour in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 12, p. 340-344, Oct. 2004.

GANDUÑO-LUGO, M. et al. Comparison of growth, fillet yield and proximate composition between Stirling Nile tilapia (wild type) (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) and red hybrid tilapia (Florida red tilapia x Stirling red *O. niloticus*) males. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 1023-1028, Oct. 2003.

GJERDE, B.; GJEDREM, T. Estimates of phenotypic and genetic parameters for carcass traits in Atlantic salmon and rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 36, n. 1-2, p. 97-110, Jan. 1984.

GJEREN, H. M.; BENTSEN, H. B. Past, present, and future of genetic improvement in salmon aquaculture. **Journal of Marine Science**, Dauphin Island, v. 54, n. 6, p. 1009-1014, Dec. 1997.

GRAY, E. S.; KELLEY, K. M. Growth regulation in the gobiid teleost, *Gillichthys mirabilis*: roles of growth hormone, hepatic growth hormone receptors and insulin-like growth factor-I. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 131, p. 57-66, Oct. 1991.

GROSS, R. et al. Detection of allelic variation within the growth hormone gene in common bream using heteroduplex analysis. **Journal of Fish Biology**, London, v. 48, n. 6, p. 1283–1287, June 1996.

GROSS, R.; NILSSON, J. Application of heteroduplex analysis for detecting variation within the growth hormone 2 gene in *Salmo trutta* L. (brown trout). **Heredity**, London, v. 74, n. 3, p. 286–295, Mar. 1995.

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**, Amsterdam, v. 173, n. 1-4, p. 73-80, Mar. 1999.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 73-84, jan./jun. 1995.

HIRANO, T. Hepatic receptors for homologous growth hormone in the eel. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 81, n. 3, p. 383–390, Mar. 1991.

HUSSAIN, M. G. Genetics of body color inheritance in Thai and Egyptian red tilapia strains. **Asia Fisheries Science**, Tokyo, v. 7, n. 4, p. 215-224, July 1994.
KANG, J. H. et al. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 494-498, June 2002.

KINGHORN, B. P. A review of quantitative genetics in fish breeding. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 31, n. 2-4, p. 283-304, Mar. 1983.

KOREN, Y. et al. Carp growth hormone: molecular cloning and sequencing of cDNA. **Gene**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 309-315, Apr. 1989.

LEE, W. J.; KOCHER, T. D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 49, n. 1, p. 169-171, July 1996.

LIMA, R. M. G. **Polimorfismos de microssatélites em DNA de equinos e seu uso na determinação de parentesco em animais da raça mangalarga machador**. 1998. 91 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

LOPEZ-FANJUL, C.; TORO, M. A. **Mejora genética de peces y moluscos**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990.

LOVSHIN, L. L.; PEIXOTO, J. T.; VASCONCELOS, E. A. Considerações ecológicas e econômicas sobre a tilápia no nordeste do Brasil. In: VARGAS, J. I.; LOUREIRO, C. G. C.; ANDRADE, R. M. (Ed.). **Centro de recursos naturais**. Belo Horizonte: Fundação João Pinheiro, 1976. p. 227-237.

MARQUES-RESENDE, K. F. et al. Implication of the changing concept of genes on plant breeders work. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 11, n. 4, p. 345-351, Dec. 2011.

MATIOLI, S. R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 153-161.

McANDREW, B. J.; MAJUMDAR, K. C. Tilápia stock identification using electrophoretic markers. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 30, n. 1-4, p. 249-261, Jan. 1983.

McCORMICK, S. D. et al. Hormonal control of sulfate uptake by branchial cartilage of coho salmon: role of IGF-I. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 262, n. 2, p. 166-171, May 1992.

MELO, D. C. et al. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 220-224, out./dez. 2008.

MELO, D. C. et al. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 87-93, fev. 2006.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Rio Grande do Sul, v. 1, n. 5, p.14-17, mar./abr. 1998.

MOREIRA, A. A. et al. Genetic variability of two Nile tilapia strains by microsatellites markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 521-526, Aug. 2007.

MOREIRA, A. A.; MOREIRA, H. L. M.; HILSDORF, A. W. S. Comparative growth performance of two Nile tilapia (*Chitralada* and Red-Stirling), their crosses and the Israeli tetra hybrid ND-56. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1049-1055, Aug. 2005.

MOREIRA, H. L. M. **Análise da estrutura de plantéis e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélites**. 1999. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v. 106, n. 949, p. 238-292, May/June 1972.

O'CONNELL, M.; WRIGHT, J. M. Microsatellite DNA in Fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 7, n. 3, p. 331-363, Sept. 1997.

OHNO, S.; WOLF, U.; ATKIN, N. B. Evolution from fish to mammals by gene duplication. **Hereditas**, Lund, v. 59, n. 1, p. 169-187, Feb. 1968.

OLIVEIRA, C. A. L. et al. Melhoramento genético de peixes: uma realidade para a piscicultura brasileira. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 130, p. 38-47, mar./abr. 2012.

OLIVEIRA, S. N. et al. Análise genética de três gerações de tilápia do Nilo (linhagem GIFT) utilizando o marcador RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 207-212, abr./jun. 2011.

PARK, L. K.; MORAN, P.; DIGHTMAN, D. A. A polymorphism in íntron D of the chinook salmon growth hormone 2 gene. **Animal Genetics**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 285, Aug. 1995.

PONZONI, R. W. et al. Genetic improvement of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) -present and future. In: The Eighth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. **Proceeding...** Cairo: ISTA, 2007. p. 33-52.

PONZONI, R. W. et al. Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 247, n. 1-4, p. 203–210, June 2005.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. Alburn: International Center for Aquaculture, 1995.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1990.

REFSTIE, T. Genetic and environmental sources of variation of body weight and length of rainbow trout fingerlings. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 351-357, Apr. 1980.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P. et al. Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 10, p. 1385-1393, out. 2013.

ROMANA-EGUIA, M. R. R. et al. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, n. 1-4, p. 131–150, June 2004.

ROMANA-EGUIA, M. R. R. et al. Growth comparison of Asian Nile and red tilapia strains in controlled and uncontrolled farm conditions. **Aquaculture International**, Amsterdam, v. 18, n. 6, p. 1205-1221, Oct. 2010.

SAKAMOTO, T.; HIRANO, T. Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs of rainbow trout: characterization and dynamics during adaptation to seawater. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 130, n. 3, p. 425–433, Sept. 1991.

SÁNCHEZ-RAMOS, I. et al. Identificación de RFLP en genes relacionados com El crecimiento en la tilapia *Sparus aurata* L., 1758. **Boletín Instituto Español de Oceanografía**, Gandía, v. 21, n. 1-4, p. 253-259, Nov. 2006.

SCHLEE, P. et al. Genetic polymorphism in the intron of the growth hormone gene of the bleak. **Journal of Fish Biology**, London, v. 48, n. 6, p. 1275–1277, June 1996.

STUDART, M. T. **Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP**. 2001. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

TURRA, E. M. et al. Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p. 29-36, jan./mar. 2010.

WAGNER, P. M. **Avaliação de variedades de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação**. 2002. 51 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2002.

WORLD FISH CENTER. **GIFT technology manual: an aid to tilapia selective breeding**. Penang: World Fish Center, 2004.

YUE, G.; LI, Y.; ORBAN, L. Characterization of microsatellites in the IGF-2 and GH genes of Asian Seabass (*Latescalcarifer*). **Marine Biotechnology**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 1–3, Jan. 2001.

YUE, G. H.; ORBAN, L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 99–100, June 2002.

ZIMMERMANN, S. O bom desempenho das Chitraladas no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 15-19, 2000.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1: Polimorfismo no gene *GHI* e variabilidade genética de quatro variedades de Tilápia avaliadas por marcadores microssatélites

Marco Aurélio Dessimoni Dias
Rilke Tadeu Fonseca de Freitas
Suhaila Karim Khalil Jaser
Silvia Eda Arranz
Gabriela Vanina Villanova
Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

RESUMO

As variedades UFLA, GIFT, Chitralada e Red-Stirling de *O. niloticus* foram selecionadas para prospecção de marcadores microssatélites no Gene do Hormônio do Crescimento 1 (*GHI*) e para avaliar a diversidade genética utilizando marcadores microssatélites (*STR*). Tamanhos *consensus* no gene *GHI* foram realizados pelo programa Tandem Repeats Finder. Dois pares de iniciadores foram desenhados flanqueando as regiões do promotor e do íntron-1 do gene *GHI*. Dez *loci STR* genômicos foram escolhidos para análise de diversidade. Os parâmetros populacionais calculados foram: frequências alélicas e genotípicas, número de alelos, estimativas de riqueza alélica (A_r), diversidade gênica, frequência de alelos nulos, heterozigosidades observada (H_o) e esperada, probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg, o conteúdo de informação polimórfica e os índices de diferenciação genética D_{EST} e F_{st} . Dois *loci STR* na sequência do gene *GHI* depositada no *GeneBank* foram encontrados nas posições -693/-679 (região do promotor, motivo (ATTCT)⁸) e +140/+168 (região do íntron, motivo (CTGT)⁷). Os *loci STR*-promotor (6 alelos) e *STR*-Íntron (3 alelos) foram polimórficos nas quatro variedades estudadas. Excessos de heterozigosidade foram observados para o *locus STR*-Promotor nas variedades UFLA ($F_{is}=-0,10$) e CHIT ($F_{is}=-0,22$) e para o *locus STR*-Íntron na variedade Chitralada ($F_{is}=-0,11$). Um total de 88 alelos com alto polimorfismo entre as variedades estudadas foram identificados pela análise de dez *loci STR* neutros, exceto para o *locus* UNH-005 (com o alelo 159, privativo nas variedades UFLA e GIFT) e para o *locus* UNH-866 (com o alelo 167 privativo na variedade Red-Stirling, e com os alelos 171 e 177 privativos nas variedades UFLA e Chitralada, respectivamente). As variedades UFLA e GIFT são menos divergentes geneticamente ($D_{EST} = 0,10$) e possuem estruturação similar em relação às variedades Chitralada e Red-Stirling ($D_{EST} = 0,32$ e $0,33$; $0,45$ e $0,47$, respectivamente), sendo estas últimas as mais distantes ($D_{EST} = 0,59$). A variedade Red-Stirling apresentou menores índices médios de variabilidade ($H_o = 0,56$ e $A_r = 6,96$). A variedade UFLA foi caracterizada geneticamente e apresenta-se como uma importante fonte de variabilidade adaptada a regiões com temperaturas amenas. Baseado nos resultados, cruzamentos entre as variedades estudadas poderão conduzir a ganhos por heterose em programas de melhoramento envolvendo estas variedades. Estudos de validação e associação com características de desempenho dos *loci STR*-Promotor e *STR*-Íntron devem ser realizados para confirmar o potencial destes *loci* como possíveis Lócus de Característica Quantitativa em Programas Seleção Assistido por Marcadores.

Palavras-chave: divergência genética. gene candidato. *Oreochromis niloticus*. polimorfismo *GHI*.

ABSTRACT

UFLA, GIFT, Chitralada and Red-Stirling *O. niloticus* strains were used for microsatellite (*STR*) marker identification in the growth hormone (*GHI*) gene as well as to estimate the genetic diversity using genomic *STR* markers. Consensus sizes in the *GHI* gene was performed by one Tandem Repeats Finder program. Two primer pairs were designed flanking the *GHI* promoter region and intron-1. Ten *STR* genomic loci were selected for diversity analysis. The calculated populational parameters were: allelic and genomic frequencies, alleles number, estimations of allelic rich (A_r), genetic diversity, null alleles frequency, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity, Hardy-Weinberg equilibrium probability, the polymorphic information content, and the genetic differentiation rates D_{EST} and F_{st} . Two microsatellite loci were found on the *GHI* gene GeneBank sequence at the -693/-679 (promoter region, motif (ATTCT)8) and +140/+186 (first intron, motif (CTGT)7) positions. The *STR*-Promoter (6 alleles) and *STR*-Intron loci (3 alleles) were polymorphic in four studied strains. We observed heterozygosity excess for the *STR*-promoter locus in the UFLA ($F_{is}=-0.10$) and Chitralada ($F_{is}=-0.22$) strains as well as for the *STR*-intron locus in the Chitralada ($F_{is}=-0.11$) strain. A total of 88 highly polymorphic alleles within the strains were identified using 10 *STRs* neutral loci, except for UNH-005 loci (with allele 159 private for UFLA and GIFT strains) and for UNH-866 loci (with allele 167 private for Red-Stirling and with alleles 171 and 177 private for UFLA and Chitralada, respectively). UFLA and GIFT strains are genetically less divergent ($D_{EST} = 0.10$) and showed a similar genetic differentiation when compared with Chitralada and Red-Stirling strains ($D_{EST} = 0.32$ e 0.33 ; 0.45 e 0.47 , respectively), which were the most divergent ones ($D_{EST} = 0.59$). The Red-Stirling strain showed the lower mean of genetic parameters ($H_o = 0.56$ e $A_r = 6.96$). UFLA strain was genetically characterized and it's shown as an important variability source adapted the regions with mild temperatures. Based on the current outcomes, crossings between studied strains can lead to heterosis gains in breeding programs involving these strains. Validation studies and association with farming performance of *STR*-promoter and *STR*-intron should be done in order to confirm the potential of these loci as possible Quantitative Trait Loci in Breeding Programs Assisted by Molecular Markers.

Keywords: candidate gene. growth hormone. *Oreochromis nilolitus*. *STR*.

1 INTRODUÇÃO

A tilápia, *Oreochromis ssp*, é o segundo peixe mais cultivado no mundo e, de acordo com projeções da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) para 2030, terá um aumento de 30 % enquanto, por exemplo, a produção dos moluscos, camarões e salmão aumentaria cerca de 10% (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014). Essa espécie está adaptada às condições climáticas brasileiras e apresenta diversas características zootécnicas adequadas à criação, tais como: fácil manejo, resistência a doenças, tolerância a baixos teores de oxigênio, onívora, rápido crescimento e ausência de espinhas intramusculares em forma de “Y” (miosseptos) (HILSDORF, 1995; POPMA; LOVSHIN, 1995; FREITAS et al., 2009; BRASIL, 2012). No Brasil, em 2011, a tilápia ocupou mais uma vez o primeiro lugar no *ranking* da produção de pescado da aquicultura continental por espécie, ao atingir 253.824,1 mil toneladas, representando 46,62 % da produção total (BRASIL, 2012).

Com ritmo crescente e potencial de mercado da Tilapicultura, foram produzidas, por processos de seleção genética e cruzamentos, algumas variedades de *O. niloticus* com desempenho superior, destacando a variedade GIFT - “*Genetic Improvement of Farmed Tilapias*” (EKNATH; ACOSTA, 1998), a variedade Chitralada ou Tailandesa (ZIMMERMANN, 2000) e a variedade UFLA - “Universidade Federal de Lavras”. Dentre as variedades vermelhas, a Red-Stirling (REDS) caracteriza-se por apresentar herança autossômica dominante para coloração vermelha sobre as variedades de coloração selvagem. Contudo, essa variedade, apresenta baixo desempenho produtivo quando comparada com outras variedades produzidas comercialmente (FREITAS et al., 2009).

A importância da variabilidade genética para programas de melhoramento genético animal já é bem conhecida, e o uso de marcadores moleculares na determinação desta variabilidade é uma estratégia utilizada em diversos animais de produção com a finalidade de caracterizar os plantéis e, assim, direcionar acasalamentos (MELO et al., 2006; MOREIRA et al., 2007; BRIÑEZ; CARABALLO; SALAZAR, 2011; DAVIDS et al., 2012). Dentre os marcadores mais informativos estão os microssatélites ou “*Short Tandem Repeats*” (STR), tendo em vista sua expressão codominante e elevado polimorfismo (O'CONNELL; JONATHAN, 1997). Esses marcadores podem auxiliar na identificação dos estoques divergentes geneticamente, monitorar os níveis de endogamia nos plantéis e ser utilizados em estudos de associação com desempenho (ROMANA-EGUIA et al., 2004; MELO et al., 2008).

Dentre as aplicações dos STR, abordagens sobre genes candidatos têm sido realizadas sobre funções fisiológicas com a finalidade de identificar indivíduos de fenótipo extremo (DE-SANTIS; JERRY, 2007; MOJEKWU; ANUMUDU, 2013). Neste contexto, direcionar o mapeamento genético aos genes candidatos e investigar sua associação com características de desempenho dentro ou entre populações passa a ser considerado em programas de melhoramento (DAHM; GEISLER, 2006; MOJEKWU; ANUMUDU, 2013).

O gene Hormônio do Crescimento (*GH*) foi escolhido neste trabalho por regular, direta ou indiretamente, o crescimento somático pós-natal e processos anabólicos, tais como a divisão celular e o crescimento muscular (DE-SANTIS; JERRY, 2007). Esse gene está presente sob duas formas em tilápias e suas sequências estão publicadas no *GeneBank*: *GH1* (BER; DANIEL, 1992) e *GH2* (BER; DANIEL, 1993). Em peixes, polimorfismos STR foram relatados no *GH* de *Lates calcarifex* (YUE et al., 2001), *Spaurus aurata* (ALMULY et al., 2005), *Dicentrarchus labrax* (QUÉRÉ et al., 2010) e no *GH2* de tilápias (YUE; ORBAN, 2002).

Considerando a importância do *GH* no metabolismo do crescimento e o entendimento da variabilidade genética dos plantéis de tilápia, neste estudo objetivou-se: (1) Avaliar, *in silico*, a sequência do gene *GHI* de tilápia depositada no *GeneBank* em relação à presença de marcadores *STR*; (2) Prospeccionar polimorfismo de microssatélites nas regiões do promotor e do íntron - 1 do gene *GHI* nos plantéis comerciais de tilápia GIFT, UFLA, CHIT e REDS; (3) Caracterizar e avaliar a variabilidade genética dos plantéis de tilápia GIFT, UFLA, CHIT e REDS, utilizando marcadores *STR* genômicos e funcionais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem dos plantéis de tilápia nilótica

Quatro variedades comerciais de tilápia foram avaliadas neste estudo, sendo: as variedades “*Genetic Improvement of Farmed Tilapias*” (n=25) e “Universidade Federal de Lavras” (n=20) pertencentes ao plantel da Universidade Federal de Lavras e as variedades Chitralada (n=26) e Red-Stirling (n=25) pertencentes ao plantel comercial da Indústria Brasileira de Peixe *Ltda.* em Itupeva – SP.

2.2 Metodologias Moleculares

2.2.1 Prospecção, *in silico*, de polimorfismo *STR* no gene *GHI*.

Inicialmente, uma triagem de tamanhos consenso na sequência do gene *GHI* (número de acesso *GeneBank*: M97766-1) foi realizada pelo programa *Tandem Repeats Finder* (BENSON, 1999).

2.2.2 Desenho de iniciadores para amplificação dos *loci STR* no *GHI*

Iniciadores que flanqueiam as regiões do Promotor e do Íntron-1 do gene *GHI* foram desenhados pelo programa *Primer3 Plus* (UNTERGASSER et al., 2007). Um alinhamento das sequências de iniciadores escolhidos foram realizados com os genes *GHI* e *GH2* de tilápia pelo programa *MEGA5* (TAMURA et al., 2011).

2.2.3 Escolha dos *loci STR* genômicos

Dez *loci STR* genômicos (Tabela 1) foram escolhidos com base no mapa de ligação para tilápia, estabelecido por Lee e Kocher (1996), para análise de caracterização das variedades estudadas. Os critérios de seleção foram: um *STR* por grupo de ligação e motivos de repetição dos *loci STR*, com ordem de importância: penta, tetra, tri e dinucleotídico.

2.2.4 Isolamento do DNA

O DNA genômico foi extraído usando o procedimento padrão de extração de fenol-clorofórmio, a partir de tecidos da nadadeira caudal (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A qualidade e concentração do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%, nos quais foram aplicados 5µL de solução de DNA genômico e o marcador de peso Lambda DNA / HindIII (Fermentas), e mensurados pelo NanoVue™ (GE Healthcare). Finalmente, o DNA foi diluído para 100 ng/µl e armazenado a -20 °C.

Tabela 1 Descrição dos dez marcadores *STR* genômicos (LEE; KOCHER, 1996).

<i>Locus</i>	pb ¹	Motivo de repetição	GL ²	Número de acesso no <i>GeneBank</i>
UNH828	177	Tetra(atca)	-	G64098.1
UNH829	327	Tri(aag)	-	G64095.1
UNH005	145	Tri(caa)	-	G31343.1
UNH009	242	Tri(caa)	-	G31347.1
UNH103	193	Di(ca)	17	G12256.1
UNH104	138	Di(ca)	1	G12257
UNH123	197	Di(ca)	12	G12276.1
UNH203	103	Di(ca)	14	G12354.1
UNH866	152	Di(ca)	20	G68198.1
GM672	187	Di(ca)	7	BV005552.1

¹ = pares de base; ² = grupo de ligação

2.2.5 Amplificação por *PCR* e genotipagem dos *Loci STR*

As condições de amplificação foram estabelecidas no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura da Universidade de Mogi das Cruzes. A amplificação de DNA por *PCR* foi desempenhada no termociclador *Veriti™ Dx* (Applied Biosystems®) para 20 μ L, contendo: 10 ng/μ L de DNA; 0,5 *UI* de *Taq DNA Polimerase* (Fermentas); 1x *buffer* (100 *mM* Tris-HCL *pH* 8,8; 500 *mM* KCL); 2 *mM* de $MgCl_2$; 2,5 *mM* de dNTP; 10 μ M de cada iniciador (*Forward*, *Reverse* e *Forward* oligo-M13 de DNA, desenvolvido por Schuelke (2000) e marcado com o fluoróforo: IRDye 700 (5'-/5IRD700/TGTAACGACGGCCAGT -3') e água destilada deionizada.

As ampliações dos dez *loci STR* genômicos procederam sob as seguintes condições: etapa 1 - 1x (aquecimento inicial (95°C/60 s); etapa 2 - 35x (desnaturação (95°C/40 s); anelamento (variou de acordo com o *locus* / 60 s); extensão (72 °C / 30 s)) e etapa 3 - 1x extensão final (72 °C / 420 s). As temperaturas de anelamento variaram como se seguem: 54°C (UNH 005, UNH 009, UNH 104, UNH 123); 56°C (UNH 103, UNH 203) e 58°C (UNH 828, UNH 829, UNH 866; GM 672).

Eletroforese e genotipagem: produtos de *PCR* foram lidos em gel *Matrix Plus* de poliacrilamida desnaturante a 6.5% e detectados no sequenciador automático DNA Analyser 4300, *Li-Cor* (IR2, Lincoln, Neb.). O marcador de sequência de 50-350 pb de DNA, Sizing Standard IRDye®700, com igual intensidade de bandas em solução de formamida 90% com azul de bromofenol foi utilizado como marcador de referência para determinação do tamanho das bandas dos *STR*. As imagens dos géis e o tamanho das bandas foram capturadas e estimados usando o projeto de microssatélites implementados no programa Saga^{GT} Client (Li-cor Biosciences, Lincoln, Nebraska).

2.3 Análises estatísticas

As frequências alélicas e genotípicas, heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) e probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{HW}) foram estimadas por *locus* e variedade pelo programa HW Quick-check (kalinowski, 2006). O programa *Cervus* 3.0 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007) foi utilizado para estimar a frequência de alelos nulos (An) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC).

O programa FSTAT (version 1.2; GOUDET, 1995) foi utilizado para calcular o número de alelos (A), estimativas de riqueza alélica (Ar) e de diversidade gênica (hs) (NEI, 1987) por *locus* e variedade.

O índice de diferenciação genética D_{EST} (JOST, 2008) entre variedades foi estimado pelo pacote *DEMEtics* implementado no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foi utilizado para calcular o índice de diferenciação genética F_{st} entre variedades (WEIR; COCKERHAM, 1984), de acordo com o método de Nei (1977) e para investigar a estrutura genética populacional por análise de variância molecular (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992).

3 RESULTADOS

3.1 Prospecção, *in silico*, de polimorfismo *STR* no gene *GHI*

A sequência completa do *GHI* depositada no *GeneBank* (número de acesso: M 97766-1; BER; DANIEL, 1993) possui 3.486 pb de DNA linear estando presente o sítio promotor *TATA-box*, éxons 1-6, íntrons 1-5 e a cauda *polyA*. Inicialmente, vinte e duas sequências foram encontradas e avaliadas de acordo com os critérios: número de cópia, tamanho consenso e entropia. Dessas sequências, dois microssatélites (Figura 3) foram identificados nas posições -693 / -679 (região do promotor, denominado *STR*-Promotor, motivo (ATTCT)₈) e +140/+168 (região do íntron-1, denominado *STR*-Íntron, motivo (CTGT)₇).

ORIGIN

```

1 gagctcattg ttgacttcag gggagacagc actgacttag cccccctta catcaacggg
61 gagtgtgtgg agagagtcca caccttcocg ttccttggtg tccctcatctc tgctgacatc
121 tccctggacag acaacatctc agcggctcgtc aagaaggccc aacagcggct gcacttcctg
181 agggctctca ggaagtgcaa getgaaactcc gacctgctgc tgaccttcta cogctcgtcc
241 attgagagcc tgctaacctc ctgcatcacg gtatggtaacg gcagctgcac taaggcggat
301 agagcggaggc ttcagaggtgt ggtcaagaca gcacaaaaga tcatcgggtg ccctctcccc
361 tccctgatga cattedattcc tccctgctgcc tcagcagagc agcgaacatc atcaaggaca
421 gctccccacc tggcttcaac atggttcagcc tgcttccctc aggggaagcgc tacagggtgca
481 tcagcacaaca aaccacacaga ctcaaaaaaca gtttctctcc taaagccata accaccctga
541 actcaccacat gcaccgataa cacagacccc cccccccctc cccctcaca tttctttttt
601 ttcccatctc ccatttccctc tatggaccac tataacaata ccaaattcta tgtgcaataa
661 cccaactgta tatacacaac acttattttat tacatattac ttttttaaaa ctggcttgta
721 tatttgtaca ttttatatat atattttttt cccctctgta atactgtcca tatgtatat
781 gtgctgcaga actgtgcccc cccccccccc ccagcatgtt tgcactgagt agggatgct
841 ctgtatctca ttgtacaacc gtatagtgac aataaaggca ttctattctA TTCTATTCTA
901 TTCTATTCTA TTCTATTCTA attatttcta gtgtacttga ttctccaaca cgtgactgat
961 ttcacctgta aatgtgtcca tggctaggcg cagtgtgata tgacacctga ggaatagaat
1021 aagtatgggg agaagggaacc ttgaattatg aaatagctgc actttaatgt aagtttcatt
1081 aaagtgtttg caggtccaac tgataaagca tgaatgttaa attgtgtcga cctttatttc
1141 agaattcagt ttaatgactg aatggtcagt caacaaaagg tgattgtgag tcatcaaaagc
1201 gagcactact gtctgtcacc atgaaaaact gaacacatgt caaactgtcg gtgtgaacat
1261 ttctgtcccc actcattcgt gagcatgtgc gttcaaatg acttctctgt ggatgaaagc
1321 tcgataaaaa tcttttcacc tgaaaaattt gatttgatgt aaatattttg gagtttttga
1381 aaactttaca ttagatctcc ttttaaatgt taacaaacat gttggatgac agagcacttt
1441 agtcaccacg ggtgtgtttt tcatgtagca tcaatatgat gattgagggt ttaattgtaa
1501 ttagacttag acacacgtgt ttgctcatgt cacgtttctc ctgatgaatt taaacatcta
1561 GTTTTCAACT ATAAAgcaa aaactctgag ctgaaaacat cagaaccacc gactcacatc
1621 ataatacatc gagccgcaaa cagagcctga actgatgcca gccatgaact caggtaagac
1681 atctgggctc ccccacgaga agggaccact gctttatgat gtttaacaaa gtctgaaaCT
1741 GCTGTCTGTI CTGTCTGTCT GTCTGTcagt cgtcctcctg ctgtcgggtg tgtgtttggg
1801 cgtctcctct cagcagatca cagacagcca cgttttgttc tccattgagc tcaacagagt
1861 cagcaccctg cacctgctcg cccagagact cttctcggac tttgtaagcc tgcagcagct
1921 caacaatctt tcttctttct gaaaaagacc aaatgttacc taaatcaaag ctaatgcaca
1981 ggacagaaac taggttcaaa atacgttcaa caaaatgttc tggatattca gtgtgtgcaag
2041 tgagtttaga tgcacacaga catatggaca catttcacat ttgatgtcaa gggaaccgag
2101 acactttgta gactgtcaact gctaaaaaca cagcagacgt ttacacttta cattttaatg
2161 acagtcagct ataactctag gatattcagt taagaattat gaaacgatat taaaatttgc
2221 tgtcagtcac taaaacacag gtattcctgt gtattttgtg tatttctgta tgcacctgtg

```

Figura 3 Sequência parcial do gene *GH-1* (*GeneBank* M97766-1; Ber; Daniel,1992). Em destaque: *loci STR* (letras maiúsculas vermelhas), éxons 1 e 2 (realce amarelo) e *TATA-box* (realce azul e letras maiúsculas vermelhas).

3.2 Desenho de iniciadores para amplificação dos *loci STR* no *GH1*

As sequências dos iniciadores para o *STR*-Promotor foram: *Forward*-Promotor com cauda M13 (5'TGTA AACGACGGCCAGTCCAGCATGTTTGC ACTGAGTA3') e *Reverse*-Promotor (5'GCCTAGCCATGGACACATTTA3') e para o *STR*-Íntron: *Forward-Íntron* com cauda M13

(5'TGTAAAACGACGGCCAGTACTGATGCCAGCCATGAACT3') e *Reverse-Íntron* (5'AGAACAAACGCTGGCTGTCT3'). Os iniciadores do *STR*-Promotor têm especificidade apenas com gene *GH1* enquanto o *STR-Íntron* não foi específico podendo amplificar fragmentos nos dois genes do *GH* de *O. niloticus*.

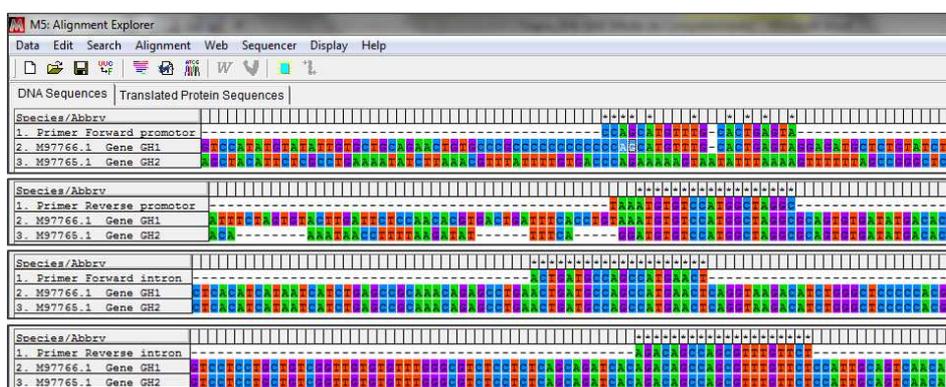


Figura 4 Alinhamento dos dois pares de iniciadores desenhados junto às sequências dos genes *GH-1* (M97766-1) e do *GH2* (M97765.1).

3.3 Amplificação por *PCR*, genotipagem e prospecção polimorfismo *STR* nas regiões do promotor e do íntron -1 do gene *GH1* em plantéis comerciais de tilápia

As condições de amplificação desses iniciadores foram as mesmas para os dez *loci STR* genômicos, exceto em relação à temperatura de anelamento que foi de 60°C para os dois *loci*.

Após 1 hora e 30 minutos de corrida, imagens do gel foram capturados (Figura 5) e genotipados em projetos de microssatélites no programa SagaGT Cliente (*LI-COR Biosciences*, Lincoln, Nebraska). Observa-se que os *loci STR* identificados nas regiões do promotor (*SRT*-promotor) e do íntron (denominada

STR-Íntron) da sequência *GHI* (*GeneBank* M97766-1; BER; DANIEL, 1992) foram polimórficos.

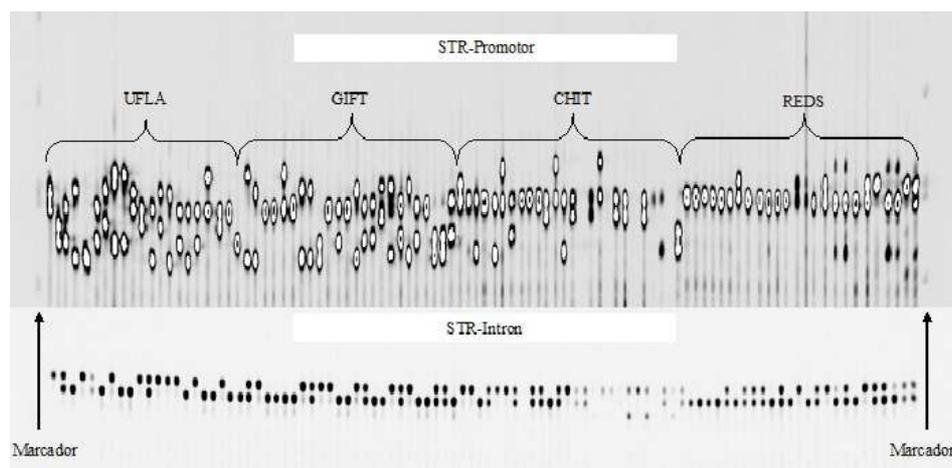


Figura 5 Imagens capturadas nas corridas dos *loci*, *STR-Promotor* e *STR-Íntron*, nas quatro variedades de tilápia: Universidade Federal de Lavras (UFLA), *Genetic Improvement of Farmed Tilapias* (GIFT), Chitralada (CHIT) e Red-Stirling (REDS). Marcador: 50-350 bp DNA Sizing Standard IRDye@700

Perfis genéticos dos dois *loci STR* no gene *GHI* das quatro variedades de tilápia do Nilo podem ser visualizados nas Figuras 6 a 9 e Tabela 2.

A análise dos dois *loci STR* do *GHI* apresentou um total de 9 alelos com maior polimorfismo nas variedades UFLA, GIFT e CHIT. Alelos privativos foram observados nos dois *loci* (Figuras 6 e 8). A presença do alelo 191 do *STR-Promotor* foi identificada apenas nas variedades UFLA e CHIT; e os alelos 186 e 206 não foram observados na variedade REDS. Dos três alelos encontrados no *STR-Íntron*, o alelo 198 só foi encontrado na variedade CHIT (0,08%), estando encoberto sobre a forma heterozigota. Genótipos privativos nos dois *loci* também foram observados (Figuras 7 e 9). A frequência de alelos nulos nestes *loci* não foi significativa.

O *PIC* médio do *STR*-Promotor das variedades melhoradas (0,71) foi superior em relação aos 0,35 da variedade REDS (Tabela 2). Já no *STR*-Íntron o *PIC* médio total foi de 0,38 tendo uma variação menor entre as variedades (Tabela 2).

A presença de alelos privativos das variedades estudadas refletiu nos índices de heterozigosidade observado e esperado (Tabela 2). No *locus STR*-Promotor, as variedades UFLA ($H_o=0,82$) e GIFT ($H_o=0,76$) foram mais polimórficas e no *locus STR*-Íntron a variedade CHIT ($H_o=0,58$). O *locus STR*-Promotor está em equilíbrio de Hardy-Weinberg entre as variedades estudadas, exceto, na variedade CHIT, na qual um excesso de heterozigotos foi observado ($F_{is}=-0,22$). Já o *locus STR*-Íntron as variedades UFLA e GIFT não se comportaram em equilíbrio de Hardy-Weinberg onde um excesso de homozigotos foi observado ($F_{is}=0,71$ e $0,42$, respectivamente). Dentre as variedades, em média, a variedade UFLA é mais endogâmica ($F_{is}=0,30$) seguida das variedades GIFT ($F_{is}=0,24$) e REDS ($F_{is}=0,11$). A variedade CHIT não apresentou índices médios de endogamia para estes *loci*.

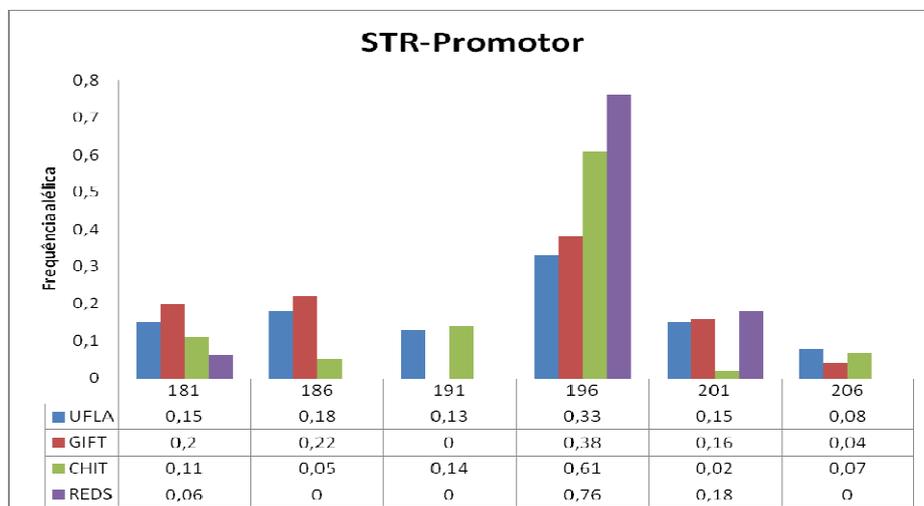


Figura 6 Histograma das frequências alélicas do *locus* STR-Promotor por variedade de tilápia

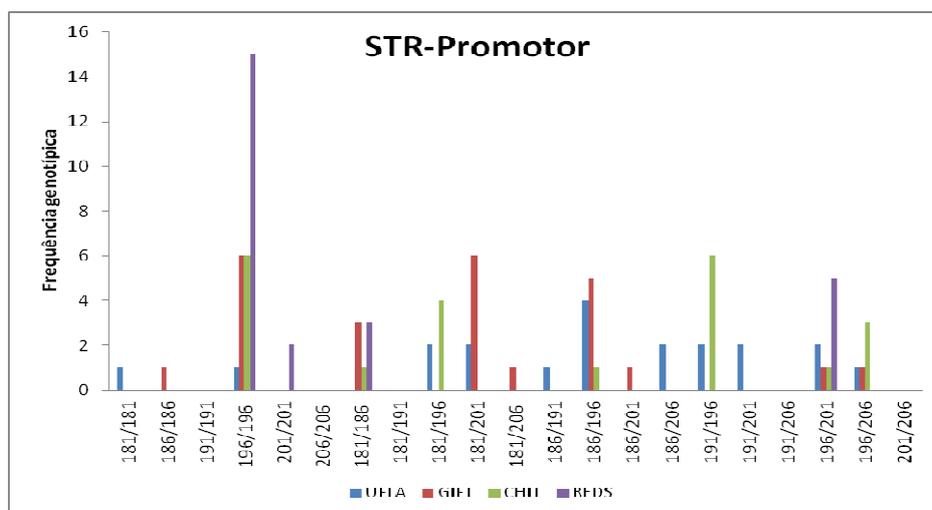


Figura 7 Histograma das frequências genotípicas para o *locus* STR-Promotor por variedades de tilápia

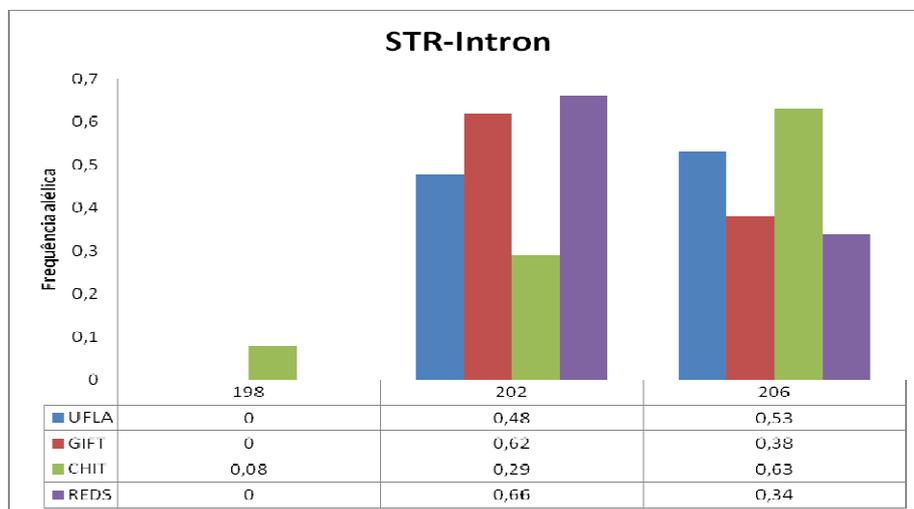


Figura 8 Histograma das frequências alélicas do *locus STR-Íntron* por variedade de tilápia.

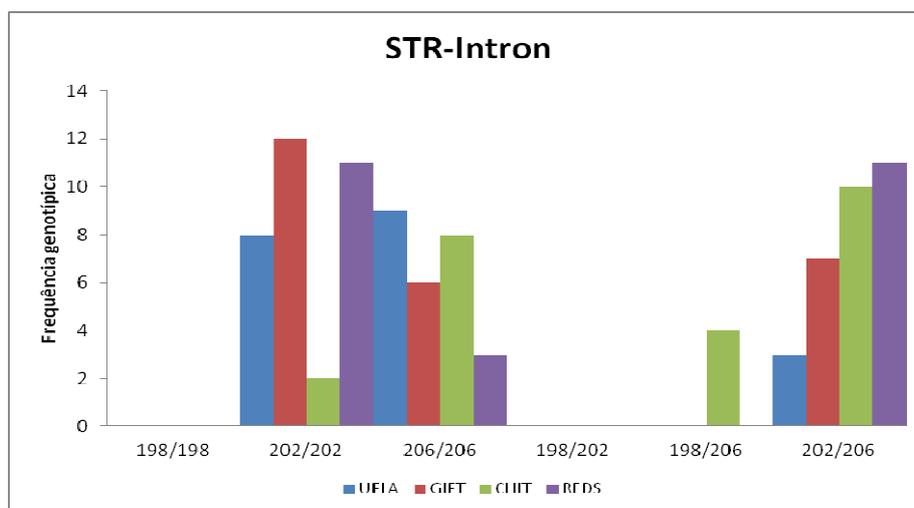


Figura 9 Histograma das frequências genotípicas do *locus STR-Íntron* por variedade de tilápia.

Tabela 2 Descritiva dos dois *loci STR* do gene *GHI* em quatro variedades de tilápia: número de alelos (A), riqueza alélica (A_r), estimativa de alelos nulos (A_n), estimativa média de diversidade gênica de Nei's (h_s), conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e); equilíbrio de Hardy - Weinberg (P_{HW}); coeficiente de endogamia (F_{IS})

<i>Locus</i>	UFLA (n = 20)	GIFT (n = 25)	CHIT (n = 26)	REDS (n = 25)
<i>STR-Promotor</i>				
A	6	5	6	3
A_r	6,00	4,96	5,90	2,99
A_n	-0,07	-0,03	-0,14	0,08
h_s	0,82	0,76	0,60	0,40
PIC	0,77	0,70	0,56	0,35
H_o	0,82	0,76	0,73	0,32
H_e	0,90	0,72	0,60	0,39
P_{HW}	0,26 ^{NS}	0,42 ^{NS}	0,05**	0,20 ^{NS}
F_{IS}	-0,10	0,05	-0,22	0,19
<i>STR-Intron</i>				
A	2	2	3	2
A_r	2	2	3	2
A_n	0,54	0,25	-0,08	0,01
h_s	0,52	0,49	0,53	0,46
PIC	0,37	0,36	0,44	0,35
H_o	0,15	0,28	0,58	0,44
H_e	0,51	0,48	0,53	0,46
P_{HW}	0,00**	0,08*	0,35 ^{NS}	0,59 ^{NS}
F_{IS}	0,71	0,42	-0,11	0,04
Média (dp ¹)				
A	4,00(2,82)	3,50(2,12)	4,50(2,12)	2,50(0,71)
A_r	4,00(2,82)	3,48(0,20)	4,45(2,05)	3,40(0,7)
h_s	0,67(0,21)	0,63(0,24)	-0,57(0,05)	0,43(0,04)
H_o	0,48(0,47)	0,52(0,34)	0,66(0,10)	0,38(0,08)
H_e	0,75(0,27)	0,60(0,17)	0,56(0,05)	0,43(0,05)
F_{IS}	0,30(0,57)	0,24(0,26)	-0,17(0,07)	0,11(0,10)

**p<0,01; *p<0,05; ^{NS}= não significativo; ¹= desvio padrão; UFLA: variedade Universidade Federal de Lavras; GIFT: variedade "Genetic Improvement of Farmed Tilapias"; CHIT: variedade Chitralada; REDS: variedade Red-Stirling.

3.4 Amplificação por *PCR*, genotipagem *loci STR* genômicos em plantéis comerciais de tilápia

Perfis genéticos dos dez *loci STR* genômicos das quatro variedades de tilápia do Nilo podem ser visualizados nas Figuras 10 a 29 e Tabela 3.

Descartamos a possibilidade de erros de genotipagem nos dez *loci STR* genômicos ao considerar que os programas de melhoramento genético das variedades avaliadas são distintos. O valor médio geral de alelos nulos por *locus* ($A_n = 0,18$) e por variedade (UFLA=0,11, GIFT=0,26, CHIT=0,08 e REDS=0,06) foi baixo considerando o número total de alelos ($n=88$). As estimativas de alelos nulos nas variedades por *locus* foram: UFLA, nos *loci* UNH-829, UNH-103, UNH-104, UNH-123, e GM672 com estimativa de alelos nulos de 0,18; 0,11; 0,19; 0,28 e 0,41, respectivamente; GIFT, nos *loci* UNH-104, UNH-123, UNH-203, UNH-866 e GM672 com estimativa de alelos nulos de 0,38; 0,51; 0,26; 0,44 e 0,44, respectivamente; CHIT nos *loci* UNH-123, UNH-203, UNH-866 e GM672 com estimativa de alelos nulos de 0,17; 0,38; 0,35; 0,28 e 0,05, respectivamente. No *locus* UNH-104 foram observados apenas os alelos 147 e 153 na variedade REDS.

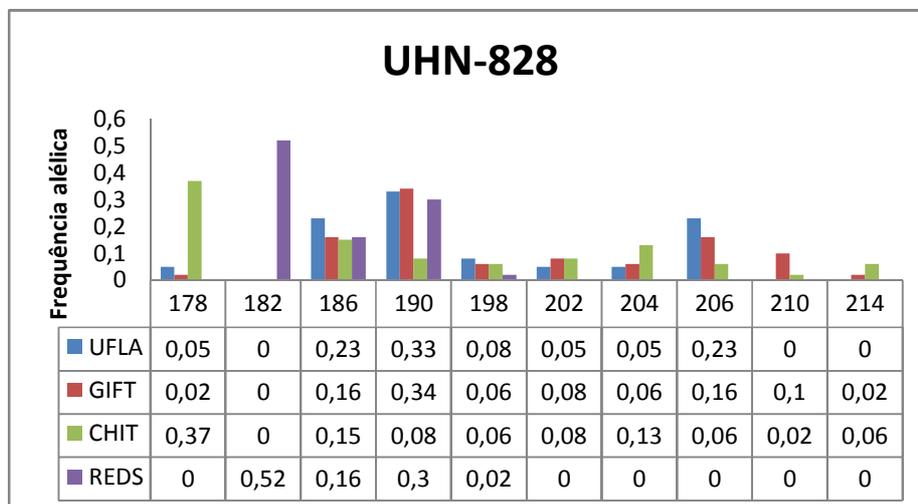


Figura 10 Histograma das frequências alélicas do *locus* UNH-828 por variedade de tilápia

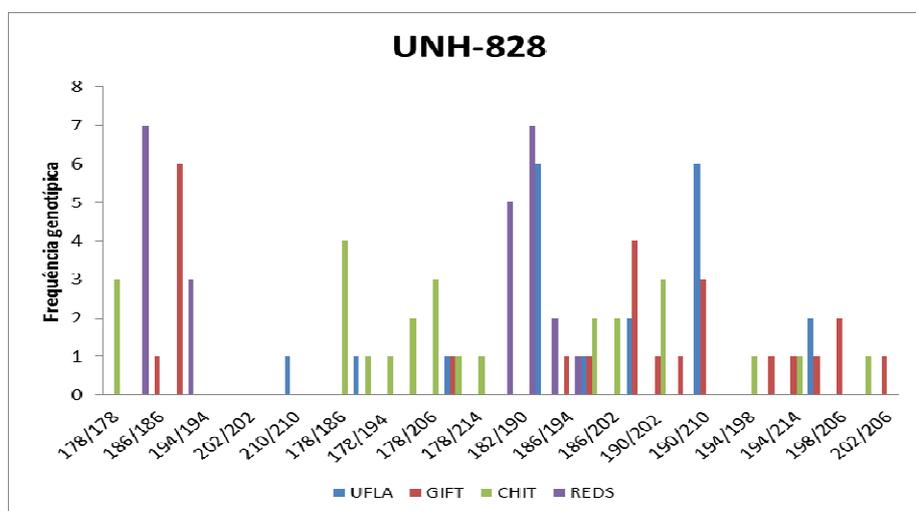


Figura 11 Histograma das frequências genóticas do *locus* UNH-828 por variedade de tilápia

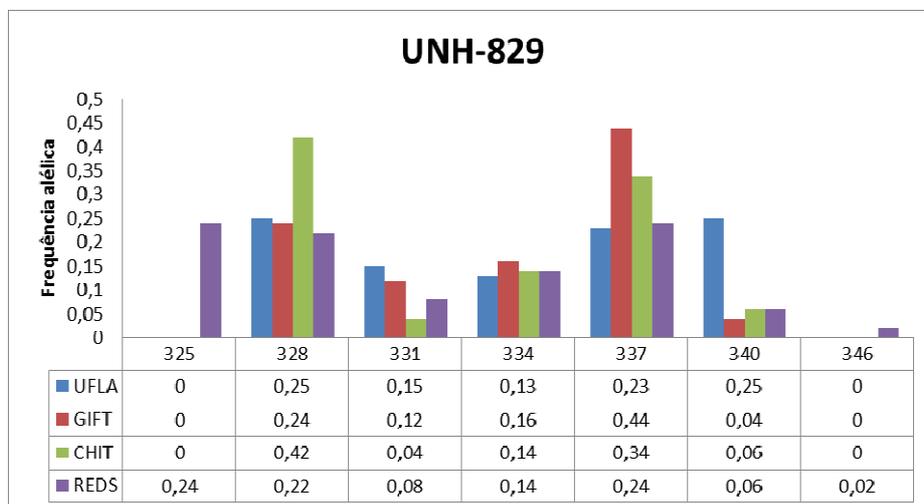


Figura 12 Histograma das frequências alélicas do *locus* UNH-829 por variedade de tilápia

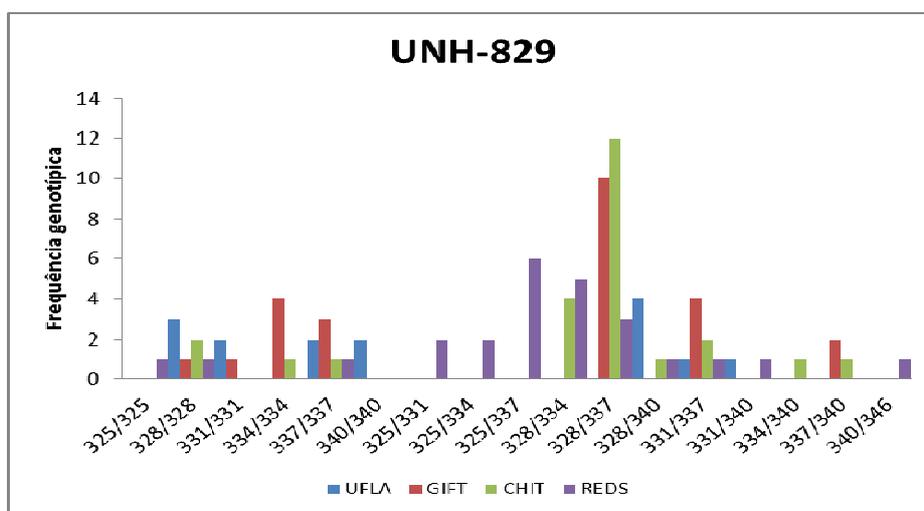


Figura 13 Histograma das frequências genotípicas do *locus* UNH-829 por variedade de tilápia

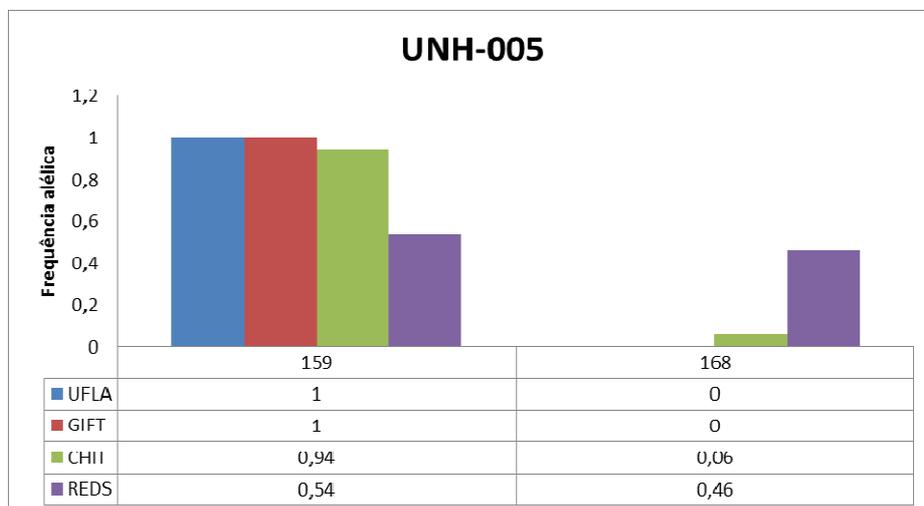


Figura 14 Histograma das frequências alélicas do *locus* UNH-005 por variedade de tilápia

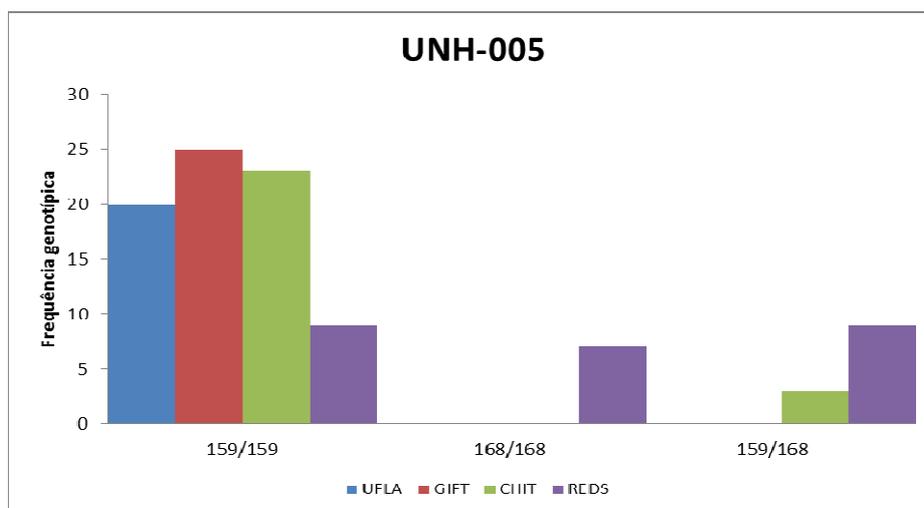


Figura 15 Histograma das frequências genotípicas do *locus* UNH-005 por variedade de tilápia.

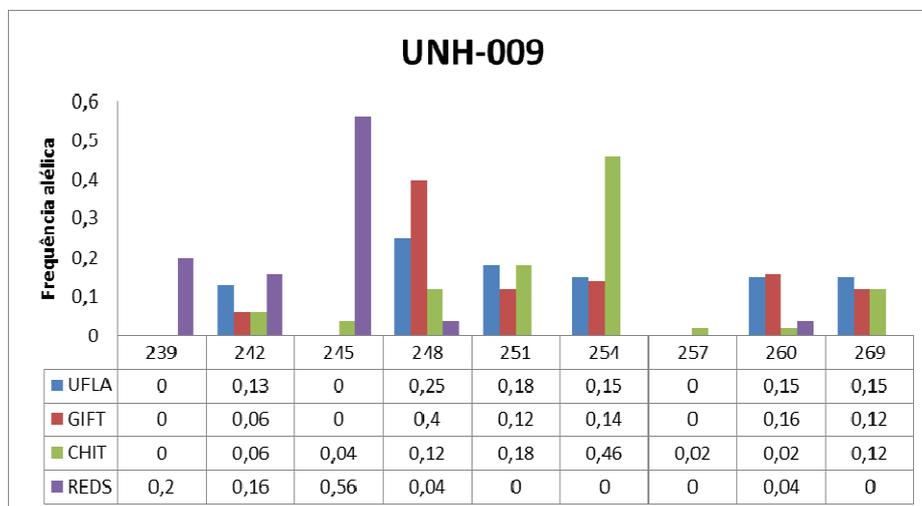


Figura 16 Histograma das frequências alélicas do *locus* UNH-009 por variedade de tilápia

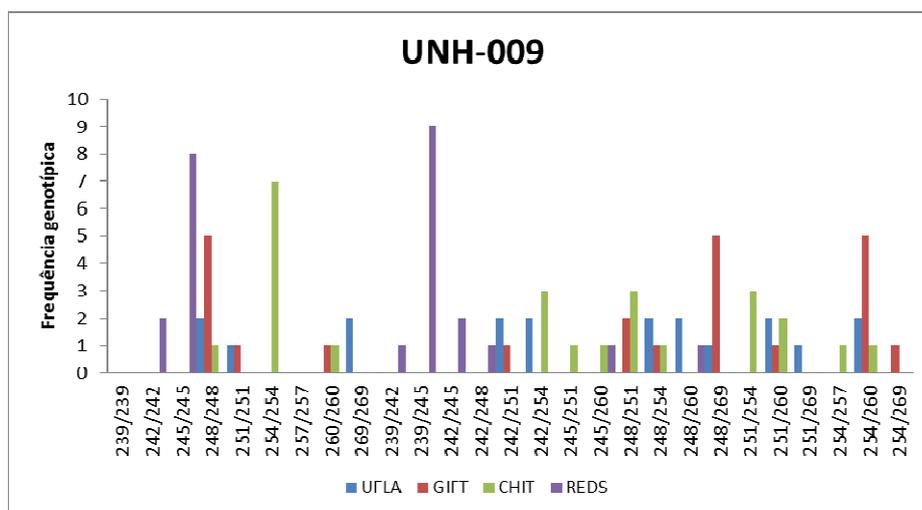


Figura 17 Histograma das frequências genotípicas do *locus* UNH-009 por variedade de tilápia

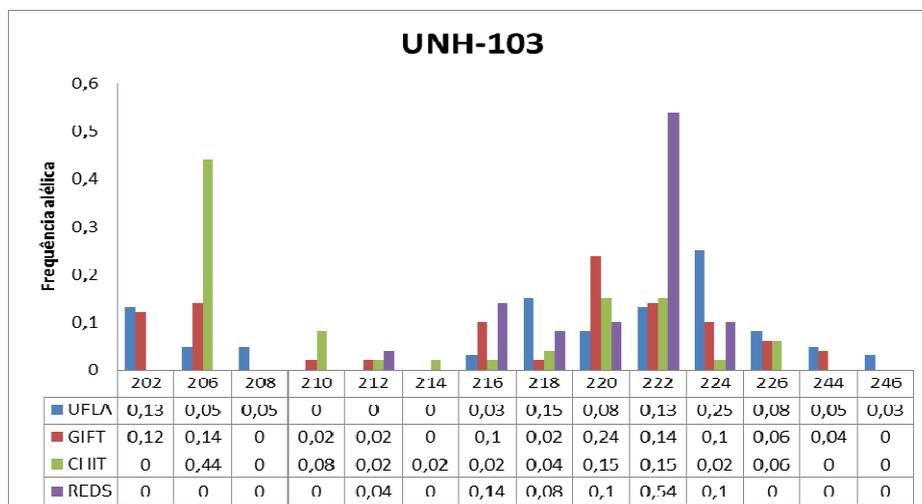


Figura 18 Histograma das frequências alélicas do *locus* UNH-103 por variedade de tilápia

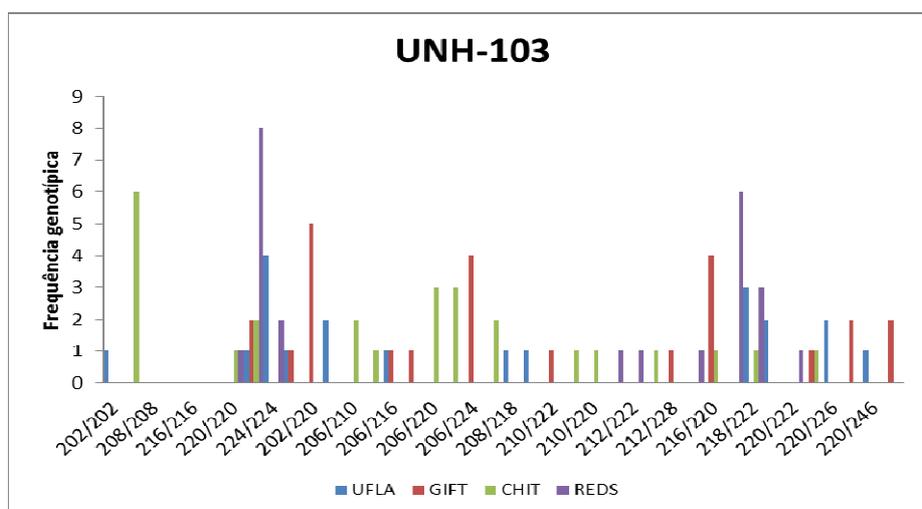


Figura 19 Histograma das frequências genotípicas do *locus* UNH-103 por variedade de tilápia

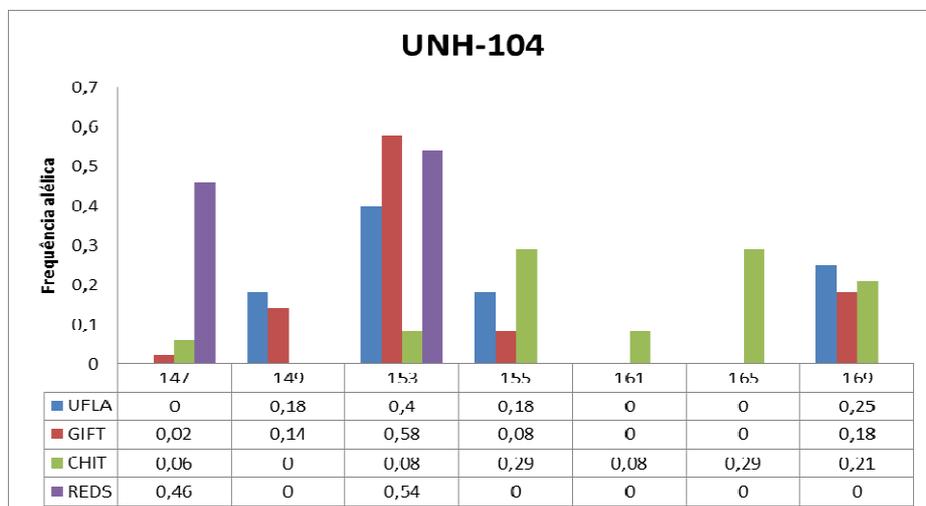


Figura 20 Histograma das frequências alélicas do *locus* UNH-104 por variedade de tilápia

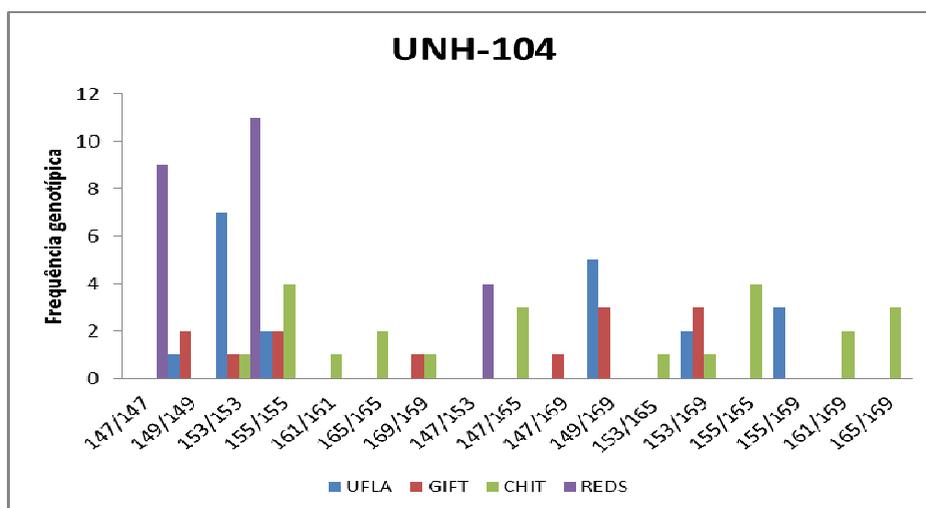


Figura 21 Histograma das frequências genotípicas do *locus* UNH-104 por variedade de tilápia

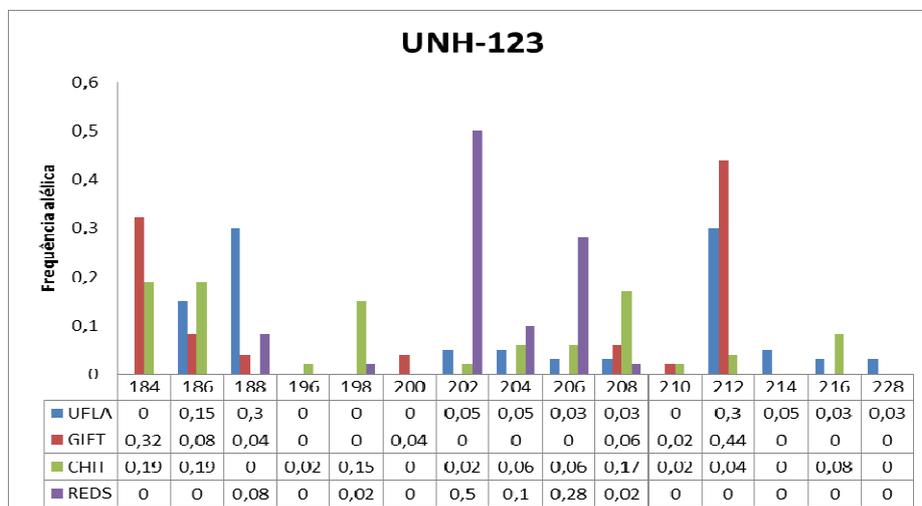


Figura 22 Histograma das frequências alélicas do *locus* UNH-123 por variedade de tilápia

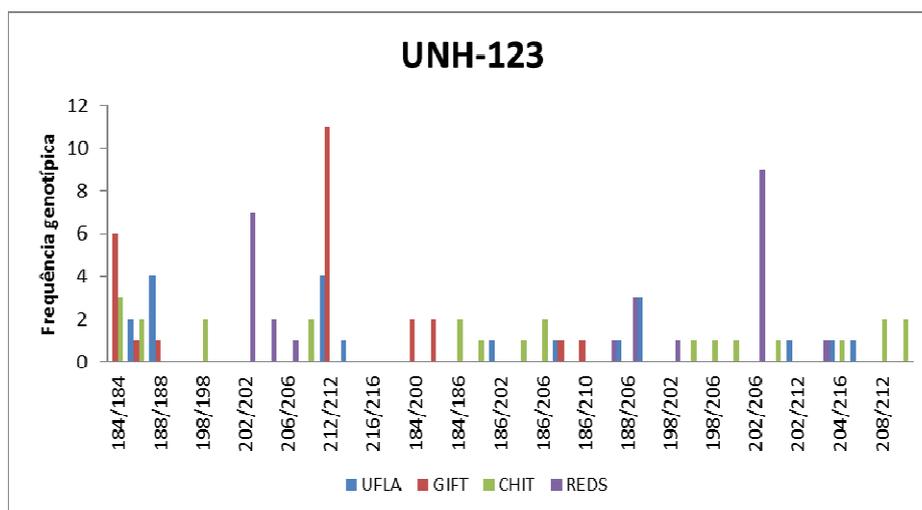


Figura 23 Histograma das frequências genotípicas do *locus* UNH-123 por variedade de tilápia

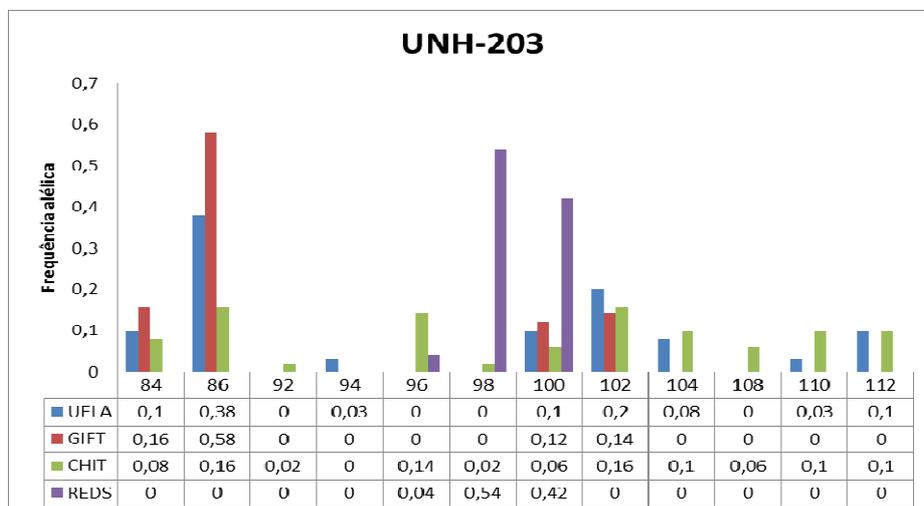


Figura 24 Histograma das frequências alélicas do *locus* UNH-203 por variedade de tilápia

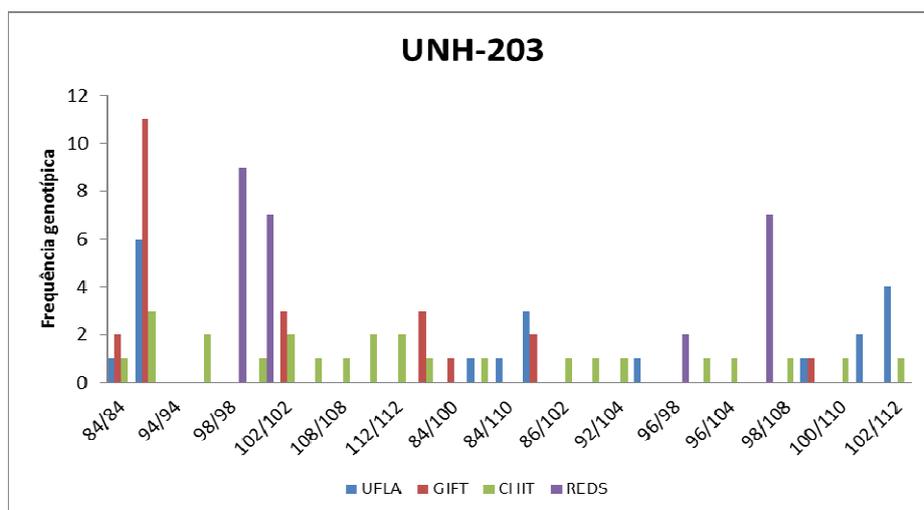


Figura 25 Histograma das frequências genotípicas do *locus* UNH-203 por variedade de tilápia

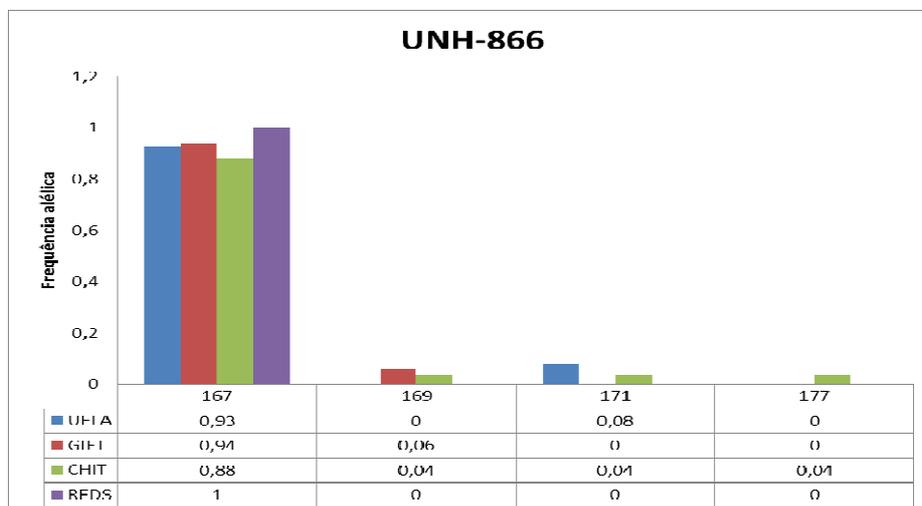


Figura 26 Histograma das frequências alélicas do *locus* UNH-866 por variedade de tilápia

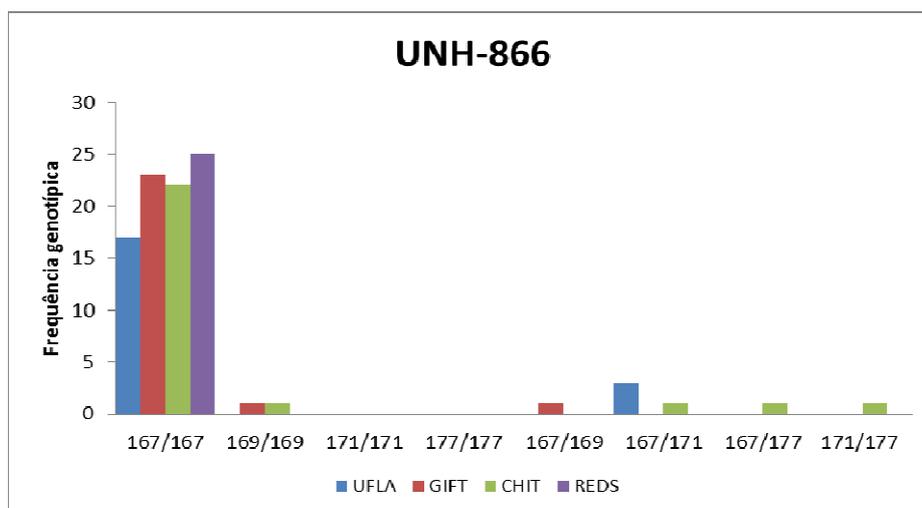


Figura 27 Histograma das frequências genotípicas do *locus* UNH-866 por variedade de tilápia

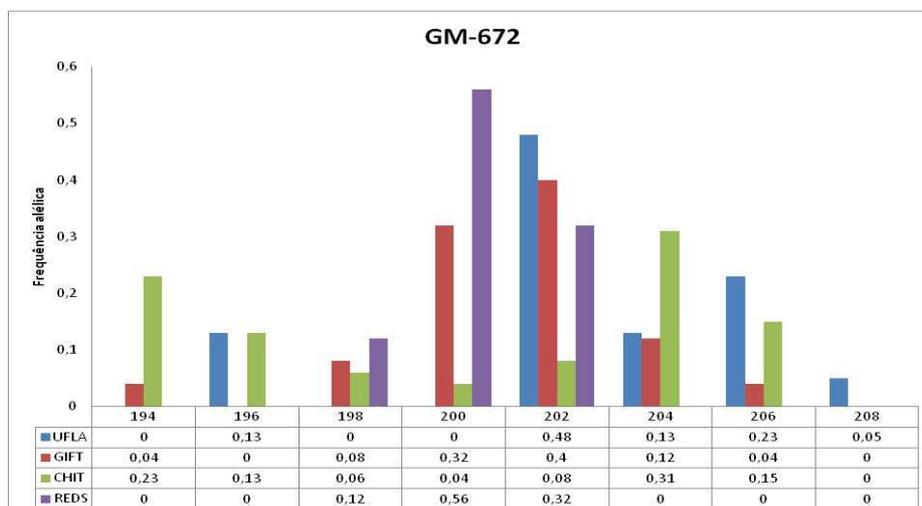


Figura 28 Histograma das frequências alélicas do *locus* GM-672 por variedade de tilápia

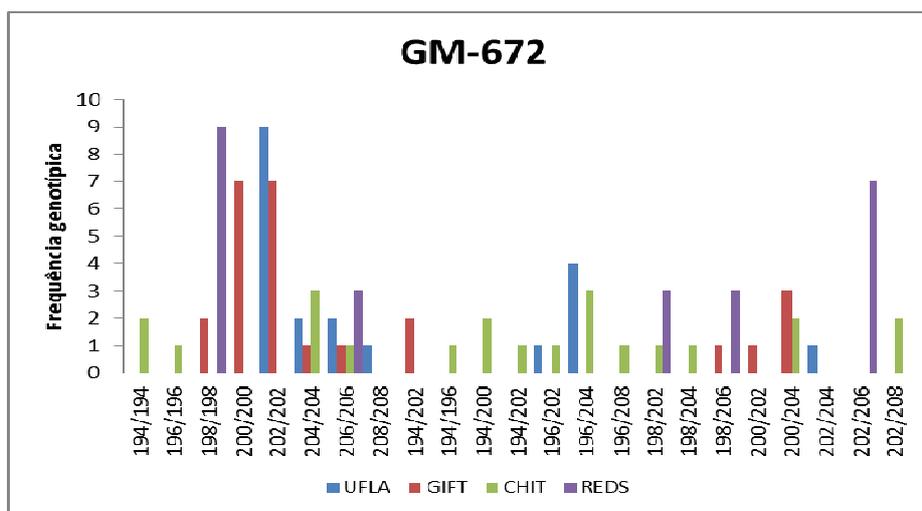


Figura 29 Histograma das frequências genotípicas do *locus* GM-672 por variedade de tilápia

Tabela 3 Descritiva dos dez *loci STR* genômicos em quatro variedades de tilápia: número de alelos (A), riqueza alélica (A_r), estimativa média de diversidade gênica de Nei's (h_s), conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigidade observada (H_o), heterozigidade esperada (H_e); equilíbrio de Hardy - Weinberg (P_{HW}); coeficiente de endogamia (F_{IS})

<i>Locus</i>	UFLA ($n = 20$)	GIFT ($n = 25$)	CHIT ($n = 26$)	REDS ($n = 25$)
UNH-828				
A	7	9	10	4
A_r	7	8,59	9,65	3,8
h_s	0,80	0,83	0,82	0,63
PIC	0,75	0,79	0,79	0,55
H_o	0,95	0,72	0,89	0,60
H_e	0,80	0,83	0,89	0,63
P_{HW}	0,06**	0,11**	0,25 ^{NS}	0,47 ^{NS}
F_{is}	-0,19,	0,13	-0,08	0,05
UNH-829				
A	5	5	7	7
A_r	5	4,96	6,72	6,79
h_s	0,81	0,72	0,74	0,82
PIC	0,75	0,66	0,68	0,78
H_o	0,55	0,64	0,88	0,88
H_e	0,81	0,72	0,74	0,83
P_{HW}	0,01**	0,21 ^{NS}	0,03**	0,33 ^{NS}
F_{is}	0,32	0,12	-0,20	-0,07
UNH-005				
A	1	1	2	2
A_r	1	1	2	2
h_s	-	-	0,18	0,51
PIC	-	-	0,23	0,37
H_o	-	-	0,15	0,36
H_e	-	-	0,15	0,51
P_{HW}	-	-	0,94 ^{NS}	0,14 ^{NS}
F_{is}	-	-	-0,06	0,29

Cont.,

Tabela 3, Cont.,

UNH-009				
<i>A</i>	6	6	7	5
<i>A_r</i>	6	5,99	8,55	4,93
<i>h_s</i>	0,84	0,78	0,79	0,63
<i>PIC</i>	0,80	0,73	0,75	0,57
<i>H_o</i>	0,750	0,72	0,68	0,60
<i>H_e</i>	0,85	0,78	0,79	0,63
<i>P_{HW}</i>	0,19 ^{NS}	0,29 ^{NS}	0,15 ^{NS}	0,43 ^{NS}
<i>F_{is}</i>	0,12	0,08	0,14	0,05
UNH-103				
<i>A</i>	11	11	10	6
<i>A_r</i>	11	10,36	9,02	5,96
<i>h_s</i>	0,89	0,88	0,76	0,68
<i>PIC</i>	0,85	0,85	0,72	0,63
<i>H_o</i>	0,70	0,92	0,65	0,56
<i>H_e</i>	0,86	0,88	0,76	0,67
<i>P_{HW}</i>	0,01**	0,41 ^{NS}	0,11 ^{NS}	0,09**
<i>F_{is}</i>	0,21	-0,05	0,14	0,17
UNH-104				
<i>A</i>	4	5	6	2
<i>A_r</i>	4	4,80	5,97	2
<i>h_s</i>	0,74	0,62	0,79	0,52
<i>PIC</i>	0,67	0,56	0,74	0,37
<i>H_o</i>	0,50	0,28	0,65	0,17
<i>H_e</i>	0,73	0,62	0,79	0,51
<i>P_{HW}</i>	0,02**	0,00**	0,07*	0,00**
<i>F_{is}</i>	0,32	0,55	0,18	0,67
UNH-123				
<i>A</i>	10	7	11	6
<i>A_r</i>	10	6,72	10,47	5,60
<i>h_s</i>	0,82	0,71	0,89	0,67
<i>PIC</i>	0,76	0,64	0,85	0,60
<i>H_o</i>	0,45	0,24	0,63	0,60
<i>H_e</i>	0,81	0,70	0,88	0,67
<i>P_{HW}</i>	0,00**	0,00**	0,00**	0,28 ^{NS}
<i>F_{is}</i>	0,44	0,66	0,28	0,10

Cont.,

Tabela 3, Cont.,

UNH-203				
A	8	4	11	3
A_r	8	4	10,59	2,96
h_s	0,81	0,62	0,91	0,55
PIC	0,76	0,56	0,87	0,43
H_o	0,65	0,36	0,40	0,36
H_e	0,80	0,62	0,90	0,54
P_{HW}	0,06**	0,00**	0,00**	0,04**
F_{is}	0,19	0,42	0,56	0,34
UNH-866				
A	2	2	4	1
A_r	2	1,99	3,85	1
h_s	0,14	0,12	0,22	-
PIC	0,13	0,11	0,21	-
H_o	0,15	0,04	0,12	-
H_e	0,14	0,12	0,22	-
P_{HW}	0,92 ^{NS}	0,06*	0,01**	-
F_{is}	-0,06	0,66	0,47	-
GM-672				
A	5	6	7	3
A_r	5	5,93	6,94	3
h_s	0,72	0,74	0,82	0,58
PIC	0,65	0,67	0,77	0,49
H_o	0,30	0,28	0,73	0,52
H_e	0,71	0,73	0,82	0,58
P_{HW}	0,00**	0,00**	0,36 ^{NS}	0,31 ^{NS}
F_{is}	0,58	0,62	0,11	0,11
Média (dp ¹)				
A	5,5(3,21)	5,5(2,99)	7(3,03)	3,5(2,02)
A_r	5,5(3,21)	5,45(2,80)	7,75(2,85)	3,4(1,93)
h_s	0,81(0,23)	0,72(0,22)	0,79(0,27)	0,63(0,10)
H_o	0,65(0,25)	0,36(0,29)	0,65(0,27)	0,56(0,26)
H_e	0,80(0,24)	0,72(0,22)	0,79(0,27)	0,63(0,13)
F_{is}	0,27(0,20)	0,42(0,28)	0,14(0,23)	0,11(0,23)

**p<0,01; *p<0,05; ^{NS}= não significativo; ¹= desvio padrão; UFLA: variedade Universidade Federal de Lavras; GIFT: variedade *Genetic Improvement of Farmed Tilapias*; CHIT: variedade Chitralada; REDS: variedade Red-Stirling.

Um total de 88 alelos, com alto polimorfismo entre as variedades estudadas, foi identificado pela análise dos dez *loci STR*, exceto para o *locus* UNH-005 (com o alelo 159, fixado nas variedades UFLA e GIFT) e para o *locus* UNH-866 (com o alelo 167 fixado na variedade REDS, e com os alelos 171 e 177 privativos nas variedades UFLA e CHIT, respectivamente).

Com relação à presença de alelos privativos, a variedade CHIT apresentou a maior incidência com 9 alelos privativos distribuídos em 7 dos 10 *loci* avaliados. Em seguida, as variedades UFLA com 6 alelos privativos (nos *loci* UNH-103, UNH-123, UNH-203, GM-672) e REDS com 5 alelos privativos (nos *loci* UNH-828, UNH-829, UNH-005 e UNH-009). A variedade GIFT apresentou alelo privativo apenas no *locus* UNH-123.

A variedade CHIT apresentou o maior número médio de alelos ($n=7$), em seguida as variedades UFLA e GIFT ($n=5,5$) e, por conseguinte, a variedade REDS ($n=3,5$). O desvio da heterozigosidade esperada, em relação ao observado na variedade GIFT (0,36), foi maior, demonstrando alto nível de endogamia (média $F_{is} = 0,42$). A variedade UFLA apresentou maior heterozigosidade esperada média (0,80) enquanto a variedade REDS a menor (0,63).

Em relação aos *loci* utilizados, o valor médio geral de *PIC* foi de 0,68, sendo considerado um ponto de truncamento ideal em estudos de diferenciação genética valores de *PIC* acima de 0,50. O *locus* com maior *PIC* médio foi o UNH-103 (0,79), seguidos em ordem decrescente: UNH-828(0,77); UNH-009(0,74), UNH-829(0,72), UNH-203(0,71), UNH-123(0,70), GM-672(0,66), UNH-104(0,61) e, por último, os *loci* UNH-005(0,30) e UNH-866(0,13).

Dentre os *loci STR* genômicos, apenas o *locus* UNH-009 não apresentou desvio ao equilíbrio de Hardy-Weinberg independente da variedade avaliada. Os demais *loci* tiveram comportamentos variáveis entre as variedades. As variedades CHIT e REDS apresentarem maior incidência de *loci* fora do equilíbrio.

Dentre as variedades, ao considerar os 10 *loci STR* genômicos, há uma inversão no nível médio de endogamia sendo a variedade GIFT ($F_{is}=0,42$) considerada mais endogamia, seguida das variedades UFLA ($F_{is}=0,27$) e CHIT ($F_{is}=0,14$; anteriormente considerada não endogamia) e, por último, a variedade REDS com a mesma estimativa de endogamia apresentada nos *loci STR* do *GHI* ($F_{is}=0,11$).

3.5 Divergência genética entre as quatro variedades de tilápia

Níveis de comparação entre as variedades estudadas são apresentados na Tabela 4. Não foi observada diferenciação entre as variedades UFLA e GIFT, ao considerar apenas os *loci STR* presentes no *GHI*, independente do índice (F_{st} ou D_{EST}) utilizado na análise de diferenciação genética. No entanto, esses *loci* foram capazes de detectar diferenciações entre as demais comparações. O índice D_{EST} de Jost (2008) foi mais efetivo, exceto na comparação entre CHIT e REDS na qual o desempenho dos dois índices foi igual (0,13).

Ao se considerar apenas os *loci* genômicos, observa-se que as populações UFLA e GIFT são divergentes ($F_{st}= 0,03$ e $D_{EST}=0,09$). Diferenças nas demais comparações, também, foram significativas e aumentaram em intensidade com a utilização do índice D_{EST} em todas as comparações subsequentes.

Em uma abordagem final, os *loci* funcionais e genômicos foram utilizados juntos na análise. Esta abordagem melhorou as estimativas de divergência entre as variedades estudadas, demonstrando funcionalidade. As variedades UFLA e GIFT foram menos divergentes, seguidas, em estruturação, pela variedade CHIT e, por último, a variedade REDS.

Tabela 4 Diferenciação genética entre quatro variedades de tilápia do Nilo. Índices de fixação: F_{st} (abaixo da diagonal) e D_{EST} (acima da diagonal)

		UFLA	GIFT	CHIT	REDS
Apenas Loci STR do GHI	UFLA	-	0,00 ^{NS}	0,09**	0,40**
	GIFT	0,000 ^{NS}	-	0,16**	0,11**
	CHIT	0,003**	0,084**	-	0,13**
	REDS	0,113**	0,078**	0,128**	-
Apenas Loci STR genômicos	UFLA	-	0,09**	0,28**	0,40**
	GIFT	0,03*	-	0,30**	0,51**
	CHIT	0,08**	0,10**	-	0,51**
	REDS	0,18**	0,20**	0,21***	-
Juntos	UFLA	-	0,10**	0,32**	0,44**
	GIFT	0,03*	-	0,33**	0,47**
	CHIT	0,08**	0,10**	-	0,58**
	REDS	0,18**	0,20**	0,21**	-

**p<0,01; *p<0,05; ^{NS}= não significativo; UFLA: variedade Universidade Federal de Lavras; GIFT: variedade *Genetic Improvement of Farmed Tilapia*; CHIT: variedade chitralada; REDS: variedade Red-Stirlig

A análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) considerando os doze STR está apresentada na Tabela 5. Observa-se um baixo nível de endogamia na população base (Φ_{IT} = 0,29819). As variações foram devidas à diferença dentre indivíduos (70,18%), seguido da variação entre indivíduos dentro de populações (16,16%) e, por último, da variação entre populações (13,66%).

Tabela 5 Análise Hierárquica de variância molecular (AMOVA) entre e dentro das quatro variedades de tilápia avaliadas

	g.l. ¹	Soma de Quadrados	Componentes Variância	Φ -statistics ² (P)
Entre Variedades	3	94,75	0,57	$\Phi_{ST} = 0,18719$ (0,0000)
Entre indivíduos dentre de variedades dentro indivíduos	92	394,03	0,68	$\Phi_{IS} = 0,13656$ (0,0000)
Total	191	770,28	4,18	$\Phi_{IT} = 0,2982$ (0,0000)

¹= graus de liberdade; ² Φ_{ST} é a correlação de diversidade molecular de haplótipos aleatórios entre as variedades, em relação aos pares de haplótipos aleatórios totais; Φ_{IS} é a correlação de diversidade molecular de haplótipos aleatórios entre indivíduos, em relação aos pares de haplótipos aleatórios retirados da mesma variedade; e Φ_{IT} é a correlação de diversidade molecular de haplótipos aleatórios dentro de indivíduos, em relação aos pares de haplótipos aleatórios extraídos das variedades; P = testes de significância (1.023 permutações).

4 DISCUSSÃO

4.1 Presença de STR no GHI

Neste trabalho, em virtude da influência do gene *GH* sobre o metabolismo do crescimento, atenção foi concentrada na identificação de *loci STR* no gene *GHI* e na identificação de polimorfismo entre variedades de tilápia. Os *loci STR*-Promotor e *STR*-Íntron encontrados no gene *GHI* das variedades estudadas podem ser considerados bons indicativos de desempenho uma vez que foram polimórficos entre e dentre as variedades (Figuras 6 até 9 e Tabela 2).

As diferenças observadas nos parâmetros populacionais desses *loci* podem ter sido ocasionadas por respostas correlatas à seleção quantitativa dos programas de melhoramento genético, ao utilizarem índices de seleção distintos, mas com o mesmo objetivo: desempenho superior. No entanto, validar esses *loci*

em estudos de associação com características de desempenho é fundamental para incorporar os mesmos como *QTL's* em programas de seleção assistida por marcadores.

Yue, Li e Orban (2001) identificaram quatro *STR*, nos genes *GH* e *IGF-2*, por triagem de sequências de DNA em Asian seabass (*Lates calcarifer*). Dois *STR* foram reportados em cada um dos genes. No gene *GH*, um estava presente no promotor ($[CA]_{14}$ entre os sítios promotores TATA-box e CAAT-box) e outro no íntron-2 (*STR* imperfeito). E, no gene *IGF-2* ambos *STR* estavam no íntron-2. Estes *STR's* foram os primeiros marcadores de DNA genômicos caracterizados em *L. calcarifer*; assim, os autores sugeriram que estes poderiam ser utilizados para selecionar animais em programas de melhoramento. Os autores, também, realizaram um alinhamento com o DNA genômico de outras espécies (*Cyprinus carpio L.*, *Oreochromis mossambicus*, *Tetraodon nigroviridis*, *Danio rerio* e *Scleropages formosus*) e não verificaram a presença destes *STR*.

Almuly et al. (2005) identificaram e caracterizaram o *STR saGHpCA*, (dinucleotídico $[CA]_n$, na região 5'-promotora) no gene *GH* em *S. aurata*. Os resultados demonstraram um possível relacionamento entre o *STR saGHpCA* e peso corporal. Assim, os autores sugeriram que o *STR* na região do promotor poderia ser considerado um marcador genético candidato para gestão dos reprodutores em programas de seleção para crescimento em *Spaurus aurata*.

Seis *STR* foram relatados por Yue e Orban (2002) nos genes *IGF-II*, *GH2*, *prolactina-I* e insulina de tilápia Moçambica (*O. mossambicus*) e tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Uma genotipagem de 24 peixes de cada espécie revelou que todos os seis *STR* foram polimórficos em ambas as espécies. Na tilápia Moçambica o número de alelos variou de 3 a 17 (média de 9,8), enquanto na tilápia do Nilo a variação foi de 4-21 (média de 10,5). A variação de H_e foi similar entre as espécies: 0,44-0,95 (média de 0,79) para tilápia Moçambica e 0,52-0,96 (média de 0,73) para tilápia do Nilo. Concluíram que estes *STR*

poderiam ser utilizados para mapeamentos de genes e de *QTL*'s importantes economicamente e em estudos de dinâmica evolutiva.

O *STR* encontrado por Yue e Orban (2002) no *GH2* ([CTGT]₇; no íntron-1) foi o mesmo encontrado na região do íntron 1 do *GHI* deste trabalho. A variação total observada no gene *GH2* (número de acesso no *GenBank*: M97765) para as espécies de tilápias Moçambica e do Nilo foram: número de alelos: 3 e 5; H_e : 0,44 e 0,55 e H_o : 0,29 e 0,50, respectivamente.

Os iniciadores desenhados neste trabalho, para região do íntron-1, não foram específicos para o gene *GHI*, e isto foi em decorrência da homologia desta região ser maior que 99% com o gene *GH2* da tilápia (BER; DANIEL, 1993). Fato que não reduz a importância do *STR*-Íntron como fonte de variabilidade entre populações (Tabela-2). A prospecção do *locus STR*-Íntron realizada acima confirma a homologia entre *GHI* e *GH2*, uma vez que não foi observada, em nenhum indivíduo, a presença de 3 ou 4 alelos durante a genotipagem (Figura-5).

O *STR*-Promotor não foi encontrado na sequência do *GH2* pela análise do programa Tandem Repeats Finder.

4.1 Diferenciação genética das variedades estudadas

Segundo Li et al. (2006), a necessidade de melhorar a qualidade genética da tilápia do Nilo é amplamente reconhecida e fundamental para assegurar o futuro da Tilapicultura. Os resultados observados neste estudo permitiram obter o perfil genético, por marcadores *STR* funcionais e genômicos (neutros) das quatro variedades estudadas.

A variedade “Universidade Federal de Lavras” foi obtida por décadas de seleção massal em uma região com estações climáticas bem definidas ao longo do ano, e por seu germoplasma ser inédito, utilizar seleção assistida por

marcadores em seu programa de melhoramento pode ser uma ferramenta importante para manter e/ou aumentar a variabilidade genética diminuindo os níveis de endogamia encontrados (MOJEKWU; ANUMUD, 2013).

As variedades UFLA e GIFT foram mais similares geneticamente. Esse resultado pode ser fruto de programas de seleção distintos, mas com objetivo final igual: desempenho superior. Para alcançar este objetivo, a variedade UFLA foi menos eficiente em relação ao tempo de seleção, uma vez que foi estabelecida seleção massal considerando uma população (Bouaké, *Oreochromis niloticus*) em relação à variedade GIFT que passou por processo de seleção entre e dentro de famílias oriundas de 8 populações escolhidas por pertencerem a grupos divergentes geneticamente (EKNATH et al., 1993).

Compreender mecanismos adaptativos e identificar as causas de variação entre populações é fundamental em programas de melhoramento que buscam novidades no mercado. Um estudo importante de variabilidade entre populações de *O. niloticus* “*Spring*” (adaptadas a sobreviver em temperaturas relativamente altas, de aproximadamente 36° C) e selvagens foi realizado por Ndiwa, Nyingi e Agnese (2014). Esses pesquisadores utilizaram 16 *loci STR* no estudo de divergência genética e encontraram polimorfismo suficiente para agrupar em dois grupos distintos: um com as três populações “*Spring*” (Bogaria Hotel, Chebala e Turtle) e o outro as populações selvagens. Os autores concluíram que ações de proteção dessas populações “*Spring*” e a gestão do pântano Loboí seriam prioridade absoluta para evitar a perda destes novos recursos.

Para caracterizar populações da mesma espécie, deve-se utilizar *loci* em grupos de ligação distintos e nível de polimorfismo alto (KOCHER et al., 1998). A utilização de *loci* com polimorfismo menor deve ser considerada apenas em casos onde populações possuam alelos privativos ou fixado (NDIWA; NYINGI; AGNESE, 2014). Neste trabalho, optamos em utilizar os loci UNH-005 e UNH-

866 nas análises de diferenciação genética já que apresentaram alelos privativos, mesmo sendo menos polimórficos (Figuras 14 e 26).

Rutten et al. (2004), ao avaliarem quatro variedades de tilápia (CHIT, GIFT, IDRC e GOTT) por 14 *loci STR*, encontraram números médios de alelos por *locus* similares aos aqui reportados, porém com maior variação no número de alelos por *locus* (entre 5 e 20, com média de 11 alelos). Já, Moreira et al. (2007), ao caracterizar as variedades CHIT, REDS e F1 recíprocas por cinco *loci STR*, encontram variações de 7 a 8 alelos por *locus*.

A variedade com menores índices de variabilidade aqui apresentada foi a REDS, no entanto, em função de sua vantagem comercial (coloração vermelha), realizar hibridizações com as demais variedades avaliadas pode ser uma alternativa interessante para empresas que comercializam tilápias vermelhas, aproveitando ganhos por heterose e alelos adaptados a condições ambientais adversas (SHIKANO; TANIGUCHI, 2003).

Romana-Eguia et al. (2004), ao compararem grupos de tilápias de coloração selvagens e híbridos de coloração vermelha, encontraram resultados superiores em relação aos relatados acima. Foi observada uma diferença de 2,5 alelos entre o grupo de variedade selvagem (UFLA, CHIT e CHIT) contra REDS, enquanto, Romana-Eguia et al. (2004) relataram 4,8 alelos. A variedade GIFT, utilizada nos dois trabalhos, teve um desvio médio de 4,5 alelos. Os índices de heterozigosidade observada e esperada seguiram o mesmo raciocínio. Uma explicação para essa discrepância dos resultados pode ser em função do número de marcadores *STR*, grupos de ligação e famílias GIFT utilizados não terem sido os mesmos. Mesmo assim, nos dois trabalhos foi possível distinguir o nível de variabilidade entre as variedades, prerrogativa fundamental para estabelecimento de programas de seleção bem sucedidos.

Rutten et al. (2004) observaram valores próximos de H_e nas variedades CHIT (0,62), GIFT (0,70), IDRC (0,71) e GOTT (0,70). Evidenciando que

processos de seleção, em variedades conhecidas como a CHIT e GIFT, alteram as proporções alélicas e genóticas em função do número de fundadores e, principalmente, pelo número efetivo fundador.

Valores menores de H_e para variedade CHIT (0,79) em relação às variedades REDS e seus híbridos F1 recíprocos (média = 0,93) foram relatados por Moreira et al. (2007), contrapondo aos valores reportados neste trabalho, onde a H_e da REDS foi a menor dentre as variedades estudadas.

Tambasco et al. (2000) argumentaram que os índices de heteroziguidade não devem ser considerados isoladamente em análises de mapeamento genético e parentesco, pois em seu trabalho o *locus* BM1224 apresentou excesso de homozigotos e, também, foi o de maior conteúdo de informação polimórfica ($PI_C = 0,685$). Neste trabalho, foi estimado um valor médio geral de PI_C de 0,68, sendo considerado um ponto de truncamento ideal em estudos de diferenciação genética valores de PI_C acima de 0,50 (BONSTEIN et al., 1980).

Em relação às estimativas de diferenciação genética, nos três níveis de comparação (Tabela 4) pode-se observar uma superioridade ao utilizar o índice D_{EST} (que levam em consideração as frequências alélicas dos *loci*) em relação ao índice F_{st} (que levam em consideração os níveis de heteroziguidade dos *loci*). Esta inferência de metodologias foi aplicada em razão dos valores calculados com base na estatística F de Wright, possivelmente, não refletirem o total da estruturação genética por considerar apenas os níveis de heteroziguidade entre populações em seu cálculo (WEIR; COCKERHAM, 1984; JOST, 2008).

Em primeira instância, os *loci STR* do gene *GHI* foram utilizados independente dos *STR* genômicos dado à importância do gene *GHI* no metabolismo do crescimento muscular e para futuras aplicações em programas de melhoramento (QUÉRÉ et al., 2010). Não foi observada diferenciação entre as variedades UFLA e GIFT independente do índice utilizado. As demais

comparações foram significativas e aumentaram em intensidade, ao utilizar o índice D_{EST} , apresentando variações de estruturação entre as variedades de moderada (UFLAxCHIT; GIFTxREDS e CHITxREDS) a alta (UFLAxREDS e GIFTxCHIT).

Em seguida, um nível de diferenciação levando em consideração apenas os *STR* genômicos foi calculado. Observando-se novamente um ganho considerável ao utilizar o índice D_{EST} em vez do índice F_{st} . Este ganho pode ter sido ocasionado em função dos alelos fixados e privativos descritos acima. Neste nível foi possível observar uma estruturação moderada entre as variedades UFLA e GIFT ($D_{EST}=0.09$) até então não observada pelos *loci STR* funcionais. As demais comparações variaram entre 0,28 (entre UFLAxCHIT) e 0,51 (GIFTxREDS e CHITxREDS).

E, por último, as contribuições de *loci STR* funcionais (*STR*-Promotor e *STR*-Íntron) e genômicos (dez *STR* neutros) foram realizadas objetivando aplicações em futuros programas de melhoramento animal assistidos por marcadores moleculares. Observa-se que o nível de diferenciação genética das variedades com a inclusão dos *loci STR*-Promotor e *STR*-Íntron favoreceu a discriminação das variedades por causa dos alelos privativos discutidos anteriormente, mesmo estando em regiões funcionais. Demonstra que as variedades UFLA e GIFT são realmente menos divergentes ($D_{EST}=0,10$), inclusive, se considerarmos estas duas variedades como um bloco em relação às variedades CHIT (D_{EST} médio=0,325) e REDS (D_{EST} médio =0,455). Neste nível da análise, a variedade REDS ficou ainda mais distante geneticamente em relação às demais variedades estudadas, tendo ápice de diferenciação genética com relação à variedade CHIT ($D_{EST}=0,58$).

A justificativa plausível da inserção dos *loci STR* do gene *GHI* foi baseada na 2ª lei de Mendel (Lei da segregação independente dos genes). Não saber a posição desses *STR* no genoma significa no pior das hipóteses utilizar

duas marcas por grupo de ligação. Sendo assim, a compreensão da dinâmica de *loci* funcionais é essencial em programas de melhoramento genético que utilizam *QTL*'s em seus índices de seleção.

Quéré et al. (2010) analisaram a estruturação genética de 4 populações de Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) por 4 *loci* funcionais (nos genes: *IGF-1*, *GH* e somatolactina) individualmente e juntos. Concluíram que a utilização conjunta de todos *loci* melhorou a distinção das populações avaliadas.

A importância da prospecção, conservação e uso dos recursos genéticos em aquicultura é uma questão pivotal para o desenvolvimento de programas de melhoramento que aproveitam das adaptações locais para produção de variedades mais produtivas (BARTLEY et al., 2009). Especificamente para tilápias, os recursos genéticos, ainda, não estão totalmente documentados e aproveitados para seu uso na aquicultura e muitos destes recursos estão ameaçados e irreversivelmente perdidos (EKNATH; HULATA, 2009; HALLERMAN; HILSDORF, 2013). A prospecção da variabilidade genética com o uso de marcadores em genes candidatos possibilitou evidenciar polimorfismos no gene *GHI* com potencial para ser inserido em programas de seleção, desde que este polimorfismo esteja associado a características de desempenho. Já, a caracterização genética das variedades usadas por *STR*'s genômicos (neutros) mostrou ser eficiente e ainda muito útil para se conhecer diferenças genéticas no estabelecimento de populações bases de um programa de melhoramento. Um fato importante deste trabalho foi caracterizar a variedade UFLA, demonstrando que esta variedade pode ser considerada um recurso genético de suma importância, devendo ser preservado e avaliado para sua introdução em programas de seleção face sua origem (descendentes das tilápias nilóticas, conhecidas como Bouaké introduzidas no Brasil na década de 1970 e que ficaram isoladas sob seleção massal na UFLA).

5. CONCLUSÕES

- Foram encontrados dois *loci STR* no gene *GHI*, posições -693/-679 (região do promotor, motivo (ATTCT)8) e +140/+168 (região do íntron-1, motivo (CTGT)7).
- O *STR* da região do íntron-1 no gene *GHI* está presente nos dois genes *GHI* e *GH2*.
- Existe polimorfismo nos *loci STR*-Promotor e *STR* – Íntron e estes foram importantes fontes de variação para as variedades estudadas.
- Os alelos 186, 191 e 206 do *locus STR*-Promotor foram encontrados apenas nas variedades de coloração selvagem.
- O alelo 198 do *locus STR*-Íntron foi encontrado apenas na variedade CHIT.
- *Loci STR* funcionais podem ser utilizados em análises de divergência genética.
- A variedade UFLA mostrou ser um recurso genético distinto das outras variedades e que, por sua origem e história, deve ser preservado para seu uso em programas de melhoramento.
- A variedade CHIT apresentou maiores índices médios de diversidade genética, seguida pelas variedades UFLA e GIFT e, por último, a variedade REDS.
- Estudos de associação com características de desempenho dos *loci STR*-Promoter e *STR* – Íntron devem ser realizados para confirmar o potencial como possíveis *QTL*'s em programas seleção assistido por marcadores.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMULY, R. et al. 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**, Tokyo, v. 71, n. 3, p. 479–490, May 2005.

BARTLEY, D. M. et al. Use and exchange of aquatic genetic resources in aquaculture: information relevant to access and benefit sharing. **Reviews in Aquaculture**, Oxford, v. 1, n. 3-4, p. 157-160, Sept./Dec. 2009.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyse DNA sequences. **Nucleic Acid Research**, London, v. 27, n. 2, p. 573-580, Jan. 1999.

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

BER, R.; DANIEL, V. Structure and sequence of the growth hormone encoding gene from *Tilapia nilotica*. **Gene**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 245-250, Apr. 1992.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 32, n. 3, p. 314-333, May 1980.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura - Brasil 2008-2009**. Brasília: MPA, 2012.

BRIÑEZ, R. B.; CARABALLO, X. O.; SALAZAR, M. V. Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellites genetic markers. **Revista MVZ**, Cordoba, v. 16, n. 2, p. 2491-2498, May/Aug. 2011.

DAHM, R.; GEISLER, R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. **Marine Biotechnology**, New York, v. 8, n. 4, p. 329–345, July/Aug. 2006.

DAVIDS, A. H. et al. Genetic variation within and among three ostrich breeds, estimated by using microsatellite markers. **South African Journal of Animal Science**, Pretória, v. 42, n. 2, p. 156-163, 2012.

DE-SANTIS, C.; JERRY, D. R. Candidate growth genes in finfish: where should we be looking? **Aquaculture**, Amsterdam, v. 272, n. 1–4, p. 22–38, Nov. 2007.

EKNATH, A. E. et al. Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 111, n. 1-4, p. 171-188, Apr. 1993.

EKNATH, A. E.; ACOSTA, B. O. **Genetic improvement of farmed tilapias**. Philippines: ICLARM, 1998.

EKNATH, A. E.; HULATA, G. Use and exchange of genetics resources of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Reviews in Aquaculture**, Oxford, v. 1, n. 3-4, p. 197-213, Sept./Dec. 2009.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 564–567, May 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 479-491, June 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**. Roma: FAO, 2014. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/YB_Overview.pdf >. Acesso em: 12 out. 2014.

FREITAS, R. T. F. et al. **Espécies exóticas e nativas de importância para a piscicultura brasileira**. Lavras: Editora da UFLA, 2009.

GOUDET, J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. **Heredity**, London, v. 86, n. 6, p. 485–486, Nov. 1995.

HALLERMAN, E., HILSDORF, A. W. S. Conservation genetics of tilapias: seeking to define appropriate units for management. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 10., 2013, Jerusalém. **Anais...** Jerusalém: ISTA, 2013.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 73-84, jan./jun. 1995.

JOST, L. Gst and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 18, p. 4015–4026, Sept. 2008.

KALINOWSKI, S. T. Hw-quickcheck: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy-Weinberg expectation. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 974-979, Dec. 2006.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, Mar. 2007.

KOCHER, T. D. et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics**, Baltimore, v. 148, n. 3, p. 1225 - 1232, Mar. 1998.

LEE, W. J.; KOCHER, T. D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 49, n. 1, p. 169-171, July 1996.

LI, G. et al. Improving growth performance and caudal fin stripe pattern in selected F6-F8 generations of GIFT Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 37, n. 12, p. 1165-1171, 2006.

MELO, D. C. et al. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 220-224, out./dez. 2008.

MELO, D. C. et al. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 87-93, fev. 2006.

MOJEKWU, T. O.; ANUMUD, C. I. Microsatellite markers in aquaculture: application in fish population genetics. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, New York, v. 5, n. 4, p. 43-48, July/ Aug. 2013.

MOREIRA, A. A. et al. Genetic variability of two Nile tilapia strains by microsatellites markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 521-526, Aug. 2007.

NDIWA, T. C.; NYINGI, D. W.; AGNESE, J. F. N. A importante natural genetics resources of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) threatened by aquaculture activities in Loboi drainage, Kenya. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. 106972, Sept. 2014.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of human Genetics**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 225-233, Oct. 1977.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987.

O'CONNELL, M.; WRIGHT, J. M. Microsatellite DNA in Fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 7, n. 3, p. 331-363, Sept. 1997.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. Alburn: International Center for Aquaculture, 1995.

QUÉRÉ, N. et al. Genomic sequences and genetic differentiation at associated tandem repeat markers in growth hormone, somatolactin and insulin-like growth factor-1 genes of the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Living Resources**, Montruge, v. 23, n. 3, p. 285–296, July 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2010. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

ROMANA-EGUIA, M. R. R. et al. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, n. 1-4, p. 131–150, June 2004.

RUTTEN, M. J. M. et al. Genetic characterization of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using microsatellite markers. **Animal Genetics**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 33-37, Apr. 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual** 1–3. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 233-234, 2000.

SHIKANO, T.; TANIGUCHI, N. DNA markers for estimation of inbreeding depression and heterosis in the guppy *Poecilia reticulata*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 905-911, 2003.

TAMBASCO, D. D. et al. Caracterização molecular de animais da raça Nelore utilizando microssatélites e genes candidatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 1044-1049, jul./ago. 2000.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, Oct. 2011.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, July 2007.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lancaster, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

YUE, G. H.; ORBAN, L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 99-100, June 2002.

YUE, G.; LI, Y.; ORBAN, L. Characterization of microsatellites in the IGF-2 and GH genes of Asian Seabass (*Latescalcarifer*). **Marine Biotechnology**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 1-3, Jan. 2001.

ZIMMERMANN, S. O bom desempenho das Chitraladas no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 15-19, 2000.

ARTIGO 2: Associação de polimorfismo microssatélite no gene *GHI* com desempenho em um cruzamento absorvente entre as variedades *Red-Stirling* e *Chitralada*

Marco Aurélio Dessimoni Dias

Suhaila Karim Khalil Jaser

Aline de Assis Iago

Fernando Stopato da Fonseca

Caio Augusto Peraza

Júlio Sílvio de Sousa Bueno Filho

Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

RESUMO

Cruzamentos absorventes entre as variedades de tilápia, *O. niloticus*, *Red-Stirling* (GG1) e Chitralada (GG2) foram realizados com objetivo de avaliar a associação do polimorfismo presente nos *loci STR* localizados no promotor e no íntron-1 do gene do Hormônio de Crescimento 1 com características desempenho. Sete grupamentos genéticos (parentais, 1/2 chitralada e recíprocos, 3/4 chitralada e recíprocos, e 7/8 chitralada de mãe chitralada) foram avaliados em relação às características peso, comprimento padrão, altura e largura do corpo em quatro mensurações. A função *lmer* () do pacote *lme4* do programa R foi utilizada nesta análise para estimação dos efeitos do modelo. Como fontes de variação consideraram-se os efeitos fixos: sexo, idade e classe de peso inicial do animal; e aleatórios: grupamento genético, *STR*-Promotor e *STR*-Íntron. Foram encontrados 6 alelos no *STR*-Promotor dispostos em dezoito das vinte e uma combinações genotípicas possíveis. Os alelos 191 e 196 do *STR*-Promotor somam 80% do total de alelos nos indivíduos avaliados. Os genótipos 196/196, 191/196 e 196/201 foram os mais frequentes. No *STR*-Íntron foram encontrados 3 alelos, dos quais o alelo 198 não foi encontrado no grupamento GG1 e o genótipo homocigoto 198/198 estava presente apenas no grupamento 7/8 chitralada de mãe chitralada. Houve diferença no processo de hibridização ao utilizar matrizes GG1 e GG2. Ao avaliar a diversidade molecular, em função da estruturação dos grupamentos genéticos, verificou-se que, em média, 94,61% da variação total são devidos a variação individual, com nível médio de endogamia baixo ($F_{IS} = 0,021$). Os *loci STR*-Promotor e *STR*-Íntron foram importantes fontes de variação para as características avaliadas (exceto peso e comprimento padrão para o *STR*-Íntron) independente dos efeitos de sexo, idade, classe de peso inicial e grupamento genético. Para o *locus STR*-Promotor, em média, os genótipos 181/181, 181/191 e 196/206 apresentaram desempenhos superiores, e os genótipos 196/201, 201/201 e 191/196 os inferiores. Para o *locus STR*-Íntron os genótipos superiores foram 202/206 e 198/206, sendo observada uma tendência de superioridade dos genótipos com o alelo 198. Os polimorfismos encontrados nos *loci STR*-Promotor e *STR*-Íntron do gene *GHI* de *O. niloticus* estão associados às características de desempenho. As frequências alélicas *loci STR*-Promotor e *STR*-Íntron em machos e fêmeas são similares. Alelos com menor número de repetições em *tandem* foram associados a desempenhos superiores. A associação observada sugere que os polimorfismos encontrados podem ser considerados marcadores *QTL*'s e podem ser incorporados em programas de seleção em tilápias.

Palavras-chave: introgressão gênica. *GH*. *QTL*. *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

Crossbreeding between tilapia, *O. niloticus*, Red-Stirling (GG1) and Chitralada (GG2) strains were carried out aiming at assessing the association between microsatellite (*STR*) polymorphism on the promoter and intron-1 of Growth Hormone gene (*GH1*) loci and performance characteristics. Seven genetic groups (parental, $\frac{1}{2}$ Chitralada and reciprocal, $\frac{3}{4}$ Chitralada and reciprocal, and $\frac{7}{8}$ Chitralada from Chitralada dam) were evaluated by weight, standard length, body height and width. The function *lmer* () of the package *lme4* of R software were used to estimate the model effects. We considered as variation sources the fixed effects: sex, contemporary group of age and the animal initial weight class; and random: genetic group, *STR*-Promoter and *STR*-Intron. Six alleles were found in *STR*-Promoter ranging from eighteen to twenty-one possible genotypic combinations. The alleles 191 and 196 from *STR*-Promoter comprise 80% of the total alleles in assessed individuals, whereas 196/196, 191/196 and 196/201 genotypes were found more often. Three alleles were observed in *STR*-Intron, of which allele 198 were not found in the GG1 group and the homozygote genotype 198/198 were present only in the group $\frac{7}{8}$ chitralada from chitralada dam. Performance differences were detected during crossbreeding when using GG1 and GG2 as dams. Assessing the molecular diversity in function of the genetic groups structuration, we found that on average 94,61% of total variation is due to the individual variation, with low average level of inbreeding ($F_{IS} = 0,021$). The *STR*-Promoter and *STR*-Intron loci were important variation sources for evaluated characteristics (except for weight in *STR*-Intron), independently of sex, initial weight class and genetic group effects. For *STR*-Promoter locus on average the genotypes 181/181, 181/191 and 196/206 showed higher performance, and the genotypes 196/201, 201/201 and 191/196 the lower performance. For *STR*-Intron locus, the highest performance genotypes were 202/206 and 198/206, with superiority bias towards genotypes having allele 198. The polymorphisms found in *STR*-Promoter and *STR*-Intron of the *GH1* gene of *O. niloticus* are associated to performance characteristics. The allelic frequencies of *STR*-Promoter and *STR*-Intron loci in males and females are similar. Alleles with lower number of tandem repetitions were associated to higher performances. The observed association suggests that the found polymorphisms can be considered QTL markers and can be incorporated into tilapias selection programs.

Keywords: genetic introgression; *GH*; *QTL*; *Oreochromis niloticus*.

1 INTRODUÇÃO

Para peixes tropicais, os programas de tilápias e carpas são considerados referência, sendo a metodologia de seleção entre e dentro de famílias da variedade de tilápia “*Genetic Improvement of Farmed*” coordenado pelo *WorldFish Center* em 1990 a mais conhecida (EKNATH et al., 1993; PONZONI et al., 2005; PONZONI et al., 2007).

Com a globalização e o mercado cada vez mais competitivo, a busca por um diferencial de mercado é fundamental para indústrias manterem-se competitivas. Galbreath e Barnes (1981) já verificavam a preferência de 60% do mercado consumidor pelas tilápias vermelhas enquanto as tilápias com pigmentação escura pelos 40% restantes.

Dentre as tilápias vermelhas, a variedade *Red-Stirling* é uma variante mutacional obtida em 1979 de uma população de *O. niloticus* selvagem do Lago Manzala - Egito, e que tem sido mantida pelo Instituto de Aquicultura da Universidade de Stirling, Escócia (McANDREW; MAJUMDAR, 1983). A ausência de pigmentação escura, denominada neste projeto como coloração vermelha, é controlada por herança autossômica dominante, de tal modo que os genótipos **RR** e **Rr** correspondem à coloração vermelha e **rr** à coloração escura ou selvagem (HUSSAIN, 1994).

A variedade Chitralada ou Tailandesa, de coloração selvagem, foi desenvolvida no Japão e melhorada na Tailândia, no palácio real de Chitralada. Esta variedade caracteriza-se por apresentar alto desempenho. Em 1996 essa variedade foi introduzida no Brasil por meio de uma doação da *Asian Institute of Technology* (AIT) e foi amplamente difundida na produção nacional (ZIMMERMANN, 2000).

Evidências de que a variedade *Red-Stirling* apresenta menor crescimento e ganho em peso em relação à Chitralada são relatadas por Moreira, Moreira e

Hilsdorf (2005). O mesmo autor sugere que, para contornar esse fator limitante, poderiam ser realizados programas de melhoramento por seleção massal e/ou hibridizações com variedades de coloração selvagem. Lago (2014), ao estudar curvas de crescimento entre estas variedades, concluiu que a variedade *Red-Stirling* apresenta crescimento inferior em relação à variedade Chitralada e os demais híbridos. O autor, também, estimou as capacidades geral e específica (CEC) de combinação em dados de desempenho, indicando que os pais contribuem de forma diferenciada para as características peso corporal e comprimento padrão. Encontrou valores baixos para CEC, mesmo assim, observou ganhos superiores no híbrido RC1 atribuindo à heterose paterna e sugeriu que estudos adicionais fossem realizados para compreender os efeitos de heterose entre os sexos e como ela se manifesta biologicamente.

Abordagens em genes candidatos ao crescimento têm sido estudadas em peixes com a finalidade de identificar polimorfismos associados ao desempenho (KANG et al., 2002; YUE; ORBAN, 2002; ALMULY et al., 2005; PEREIRA et al., 2005; QUÉRÉ et al., 2010). Dentre os genes candidatos ao metabolismo do crescimento, o gene Hormônio do Crescimento (*GH*), direta ou indiretamente, é o principal regulador de crescimento somático pós-natal e estimula processos anabólicos, tais como a divisão celular e o crescimento muscular (DE-SANTIS; JERRY, 2007). Esse gene foi duplicado durante a origem evolucionária em alguns peixes (OHNO; WOLF; ATKIN, 1968; KOREN et al., 1989). Na tilápia, o evento de duplicação do segundo *GH* pode ter ocorrido depois da separação dos salmonídeos e suas sequências estão publicadas no *GeneBank*: *GHI* (BER; DANIEL, 1992) e *GH2* (BER; DANIEL, 1993).

Considerando a importância econômica das variedades vermelhas e no entendimento da variabilidade genética do gene *GHI* dos plantéis de tilápia, o presente estudo objetivou: (i) Avaliar a variabilidade genética, por marcadores microsatélites no gene *GHI* e (ii) Avaliar a associação dos polimorfismos do

gene *GHI* com características de desempenho em um esquema de cruzamento absorvente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento e obtenção dos grupamentos genéticos

O experimento foi realizado nas Fazendas Santa Ignês e Rio das Pedras, propriedades da Indústria Brasileira do Peixe Ltda. (IBP), localizadas às margens da Rodovia Dom Gabriel Bueno Paulino Couto, km 73,5, Serra do Japi, Jundiaí, SP (latitude 23°20' S, longitude 47°02' O, altitude média 695 m).

Para hibridização intraespecífica, duas variedades do plantel comercial da IBP, genotipicamente divergentes (MOREIRA et al., 2007), foram definidas para utilização conforme características apresentadas a seguir:

- *Red-Stirling*: apresenta baixo desempenho, docilidade (menos agressivas) e coloração vermelha (maior valor de mercado); e
- Chitralada: apresenta alto desempenho e coloração selvagem.

Inicialmente foram realizadas duas gerações de cruzamento absorvente para obtenção dos reprodutores. Desses reprodutores, sete hapas de reprodução foram montadas em esquema dialélico parcial para obtenção dos grupamentos genéticos (Tabela 6 e Anexo B). A proporção sexual utilizada na reprodução foi de 1 macho : 2 fêmeas, sendo os reprodutores sincronizados por duas semanas para obtenção de um maior número de pais por coleta de larvas (HAYLOR; MUIR, 1998).

Os hapas foram verificados diariamente e, após presença de nuvens, 800 larvas por grupamento genético foram coletadas semanalmente, em um total de quatro coletas, considerados grupo de contemporâneo para idade (GCI). Essas larvas foram transferidas para estufa e mantidas separadamente sob crescimento

restrito em hapas de alevinagem (Anexo C) instalados em dois tanques de concreto (lado a lado, com 30m² e 90 cm de profundidade).

Tabela 6 Grupamentos genéticos obtidos por cruzamento absorvente

Macho	Fêmea	Grupamento Genético	recodificação
REDS	REDS	REDS	GG1
CHIT	CHIT	CHIT	GG2
CHIT	REDS	½ CHIT:REDS	GG3
REDS	CHIT	½ REDS:CHIT	GG4
GG4	CHIT	¾ (GG4):CHIT	GG5
GG5	CHIT	7/8 (GG5):CHIT	GG6
CHIT	GG4	¾ CHIT: GG4	GG7

REDS= variedade Red-Stirling; CHIT= variedade Chitralada

Ao atingirem o peso mínimo de 1g, a primeira repicagem dos GCI foi realizada para uma densidade de estocagem de 100 alevinos por hapa. Neste manejo, nenhum animal de coloração tipo selvagem foi mantido nos grupamentos GG3, GG4, GG5, GG6 e GG7. Com 90 dias de cultivo, uma repicagem final foi realizada, durante o manejo de sexagem dos juvenis, mantendo-se aleatoriamente, 15 machos e 15 fêmeas por GCI. Esses juvenis foram identificados por meio de *microchips* eletrônicos e coletados nadadeira caudal para compor a biblioteca genômica.

2.2 Obtenção de DNA e Polimorfismo de *STR* no *GHI* gene

O DNA genômico foi extraído, usando o procedimento padrão fenol-clorofórmio, a partir de tecidos da nadadeira caudal (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A qualidade e concentração do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%, no qual foram aplicados 5µL de solução de DNA genômico e o marcador de peso molecular DNA Lambda/HindIII (Fermentas) e mensuração

com NanoVue™ (GE Healthcare). Finalmente, o DNA foi diluído para 100 ng/μL e estocado a -20 °C.

Dois pares de iniciadores foram desenhados, de acordo com a sequência publicada por Ber e Daniel (1993), número de acesso M97766 no *GeneBank*, para análise de associação de *loci STR* com características de desempenho nos grupamentos genéticos avaliados. As características e sequências dos iniciadores escolhidos para realização das análises de associação com desempenho estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 Característica e sequência dos iniciadores dos *loci STR*-Promotor e *STR*-Íntron

<i>Locus</i>	pb ¹	Motivo	<i>Forward</i> (5' – 3') com cauda M13 e <i>Reverse</i> (3' – 5')
<i>STR</i> -Promotor	202	attct	5'TGTA AACGACGGCCAGTCCAGCATGTTTG CACTGAGTA3' 5'GCCTAGCCATGGACACATTTA3'
<i>STR</i> -Íntron	206	ctgt	5'TGTA AACGACGGCCAGTACTGATGCCAGC CATGAACT3' 5'AGAACAAACGCTGGCTGTCT3'

¹=pares de base

2.3 Amplificação dos marcadores microssatélites e Genotipagem

As condições para amplificação foram estabelecidas no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura da Universidade de Mogi das Cruzes. As amplificações foram desenvolvidas no termociclador Veriti™ Dx (Applied Biosystems®) em 20 uL contendo 10 ng/μL de DNA; 0,5 UI de Taq DNA Polimerase (Fermentas); 1x buffer (100 mM Tris-HCL pH 8,8; 500 mM KCL); 2 mM de MgCl₂; 2,5 mM de dNTP; 10 uM de cada iniciador (Forward, Reverse e DNA oligo-M13 forward IRDye 700 (5'-/5IRD700/TGTA AACGACGGCCAGT -3')) e água esterilizada deionizada.

Amplificação dos dois *loci STR* procedeu sob as seguintes condições: etapa 1 - 1x aquecimento inicial (95°C/60 s); etapa 2 - 35x desnaturação

(95°C/40 s); anelamento (60°C / 60 s); extensão (72 °C / 30 s) e etapa 3 - 1x extensão final (72 °C / 420 s).

A eletroforese e a genotipagem dos *loci STR's* foram realizadas em um gel *Matrix Plus* de poliacrilamida desnaturante 6,5% e detectado pelo sequenciador automatizado *DNA Analyser 4300*, Li-Cor (IR2, Lincoln, Neb.). Um marcador de peso molecular de 50 a 350 pb marcado com o fluoróforo *IRDye®700* com iguais intensidades de bandas em 90% de solução de formamida e azul de bromofenol foi utilizado para determinação do tamanho das bandas. Imagens do gel foram capturadas e as bandas foram estimadas usando o projeto de microssatélites do programa *Saga^{GT} Client* (Li-cor Biosciences, Lincoln, Nebraska).

2.4 Análises Estatísticas Populacionais

Frequências alélicas e genotípicas foram estimadas por *locus* e grupamento genético pelo programa *HW-Quick-check* (KALINOWSKI, 2006). O software *MICRO-CHECKER* (OOSTERHOUT, 2004) foi utilizado para inferir causas de algum desvio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (*HWE*) em razão de alelos nulos.

Os parâmetros número de alelos (*A*) e riqueza alélica (*A_r*) foram calculados por *locus* e por grupamento genético usando o programa *FSTAT* (version 1.2; GOUDET, 1995).

O índice de diferenciação genético *D_{EST}* (JOST, 2008) em termos de comparações aos pares entre grupamentos genéticos foi mensurado pelo pacote *DEMEtics* implementado no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2004).

ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foi usado para investigar a estrutura genética populacional, usando análise de variância molecular (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992).

2.5 Avaliação de desempenho: peso corporal e medidas morfométricas

Após a identificação individual por *microchips* eletrônicos, os animais foram alocados em oito tanques-rede de 4 m³ e malha de 20 mm entrenós, com berçários de 2m³ de volume útil e malha multifilamento de 5 mm entrenós (Anexo D). Para explorar o máximo desempenho e diminuir dominância, os juvenis foram classificados em quatro classes de peso por sexo. Durante o manejo da segunda mensuração, os berçários foram retirados.

Peso corporal e medidas morfométricas foram realizados em quatro mensurações com intervalos de 21 dias (Figura 30). As medidas morfométricas foram tomadas com a utilização de um ictiômetro e um paquímetro de acordo Santos et al. (2007): comprimento padrão (CP), da extremidade anterior da cabeça ao menor perímetro do pedúnculo caudal e; largura e altura do corpo tomadas nas regiões do 1º raio da nadadeira dorsal (L e A).

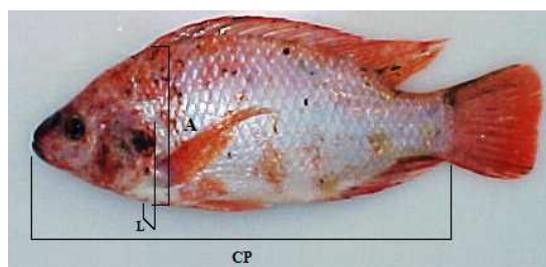


Figura 30 Medidas morfométricas em *O. niloticus*: comprimento padrão (CP), a altura (A) e largura (L) corporal. Peixe: $\frac{3}{4}$ de Chitralada: $\frac{1}{4}$ de Red-Stirling (Fonte: Marco Aurélio Dessimoni Dias, 2014)

2.6 Estudo de associação das características de desempenho avaliadas com o polimorfismo do *GHI*

As características estudadas na análise de associação com os *STR* no gene *GHI* em quatro mensurações foram peso, comprimento padrão, altura e largura do corpo. Foi utilizado um modelo linear misto univariado, em cada mensuração, considerando-se como efeitos fixos: grupo de contemporâneos de idade, classe de peso inicial e sexo do animal; e aleatórios: grupamento genético, *STR*-Promotor e *STR*-Íntron.

Na forma matricial, o modelo correspondente é:

$$y = X\beta + Z_1g_{gg} + Z_2g_{STR-Promotor} + Z_3g_{STR-Íntron} + e$$

Em que:

y o vetor de observações das características;

β o vetor de efeitos fixos somados à média;

g_{gg} o vetor de efeito aleatório de grupamento genético com distribuição $\sim N(0, I\sigma_{\gamma_1})$ e $\gamma_1 = \sigma_e / \sigma_{gg}$;

$g_{STR-Promotor}$ o vetor de efeito aleatório de *STR*-Promotor com distribuição $\sim N(0, I\sigma_{\gamma_2})$ e $\gamma_2 = \sigma_e / \sigma_{STR-Promotor}$;

$g_{STR-Íntron}$ o vetor de efeito aleatório de *STR*-Íntron com distribuição $\sim N(0, I\sigma_{\gamma_3})$ e $\gamma_3 = \sigma_e / \sigma_{STR-Íntron}$;

e o vetor de erros com distribuição $\sim N(0, I\sigma_e)$;

X , Z_1 , Z_2 e Z_3 representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos, respectivamente.

As funções *lmer* () e *ranef* () do pacote *lme4* foram utilizadas para estimação e predição dos efeitos aleatórios do modelo linear misto descrito acima (BATES et al., 2014). Para consistência da base de dados, foram realizadas análises visuais, sendo a função *boxcox* () do pacote *MASS* utilizada para corrigir problemas de normalidade, ao calcular a verossimilhança perfilhada, que maximiza o parâmetro lambda (BOX; COX, 1964).

Para as características em que se observou efeito significativo dos *loci STR* foram realizadas comparações múltiplas, por meio da aplicação do Teste de Scott & Knott (SCOTT; KNOTT, 1974), ao nível de 5 % de significância.

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre mensurações, dentro das características, para confirmar a classificação final dos genótipos, utilizando o procedimento *PROC CORR* do pacote computacional *Statistical Analysis System* (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1999).

3 RESULTADOS

3.1 Dinâmica dos *loci STR* do gene *GHI* nos Grupamentos Genéticos

Perfis genéticos dos *locus STR*-Promotor, obtidos por cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia *Red-Stirling* e Chitralada, podem ser visualizados por grupamento genético e por sexo dentro de grupamento genético nas Figuras 31 e 32 e Tabela 8.

Erros de genotipagem no *locus STR*-Promotor foram descartados pela presença de alelos nulos, uma vez que houve evidências de alelos nulos somente nos grupamentos puro *Red-Stirling* (GG1) e nos híbridos onde a mãe possui maior proporção de alelos de *Red-Stirling* (GG3 e GG7). Esses grupamentos apresentaram desvio ao equilíbrio por excesso de homozigotos.

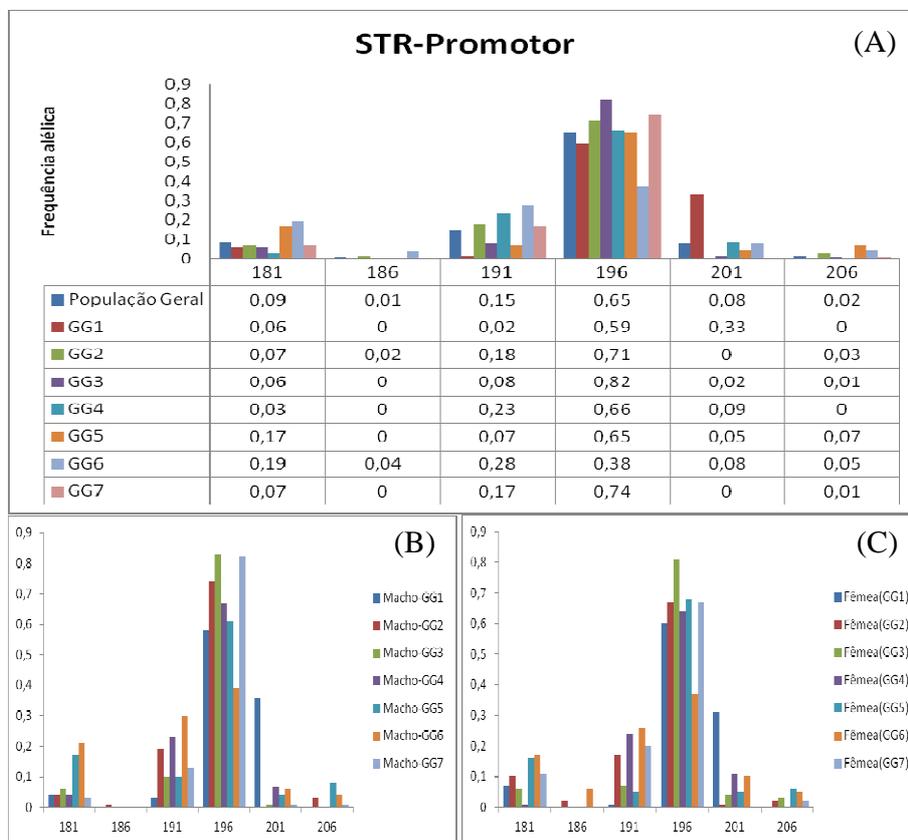


Figura 31 Histograma das frequências alélicas do *locus* STR-Promotor. (A) Por Grupamento Genético: GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: $\frac{1}{2}$ CHIT:REDS; GG4: $\frac{1}{2}$ REDS:CHIT; GG5: $\frac{3}{4}$ (GG4):CHIT; GG6: $\frac{7}{8}$ (GG5):CHIT; GG7: $\frac{3}{4}$ CHIT:(GG4). (B) Machos. (C) Fêmeas

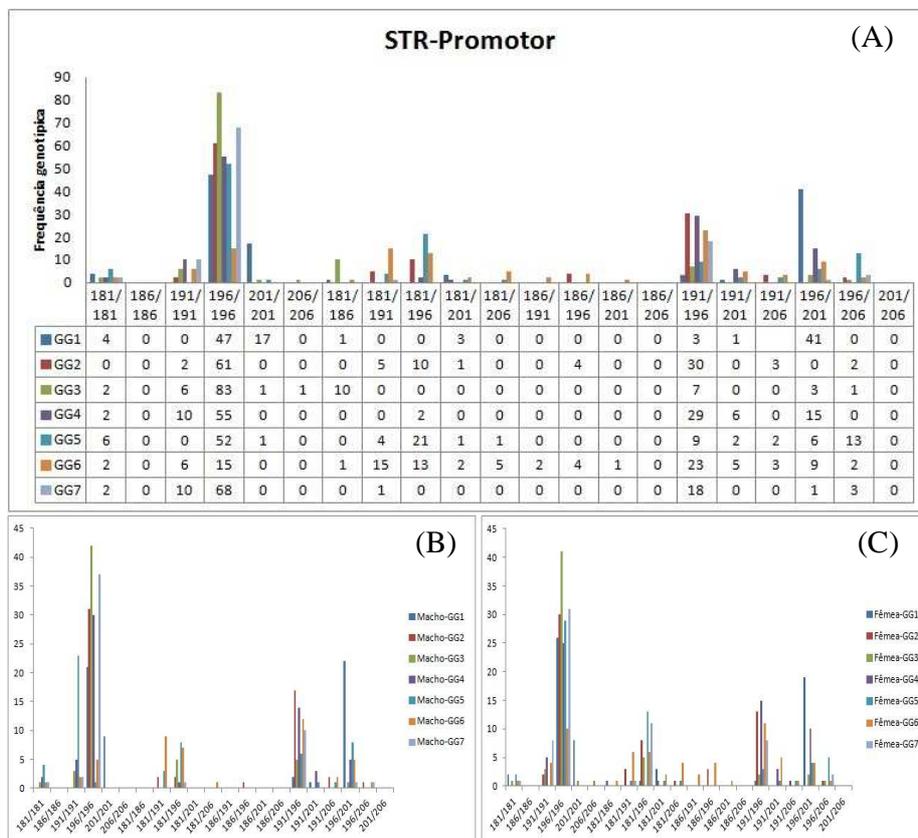


Figura 32 Histograma das frequências genotípicas do *locus* STR-Promotor. (A) Por agrupamento genético: GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: $\frac{1}{2}$ CHIT:REDS; GG4: $\frac{1}{2}$ REDS:CHIT; GG5: $\frac{3}{4}$ (GG4):CHIT; GG6: $\frac{7}{8}$ (GG5):CHIT; GG7: $\frac{3}{4}$ CHIT:(GG4). (B) Machos. (C) Fêmeas

Tabela 8 Descritiva do *locus STR*-Promotor obtido por cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia *Red-Stirling* e Chitralada: número de alelos (A), riqueza alélica (A_r), estimativa de alelos nulos (A_n), estimativa média de diversidade gênica de Nei's (h_s), conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e); equilíbrio de Hardy - Weinberg (P_{HW}); coeficiente de endogamia (F_{IS})

	GG1	GG2	GG3	GG4	GG5	GG6	GG7	Média
A	5	6	5	4	5	6	5	5,14
A_r	5	5,91	5	4	5	6	4,94	5,12
H_o	0,42	0,47	0,18	0,44	0,50	0,79	0,30	0,44
H_e	0,54	0,47	0,32	0,51	0,54	0,75	0,42	0,51
P_{HW}	0,00**	0,51 ^{NS}	0,00**	0,02*	0,11 ^{NS}	0,15 ^{NS}	0,00**	-
F_{IS}	0,22	0	0,44	0,14	0,07	-0,05	0,29	0,16
Machos								
A	4	5	4	4	5	5	5	4,57
A_r	3,99	4,80	3,76	3,99	5	5	4,70	4,46
H_o	0,44	0,45	0,19	0,38	0,51	0,82	0,25	0,43
H_e	0,55	0,42	0,29	0,50	0,58	0,72	0,31	0,48
P_{HW}	0,06*	0,33 ^{NS}	0,00**	0,02*	0,09*	0,07*	0,06*	-
F_{IS}	0,20	-0,07	0,34	0,24	0,12	-0,14	0,19	0,13
Fêmeas								
A	5	6	5	4	5	6	4	5
A_r	4,48	5,67	4,99	3,76	5	6	3,93	4,83
H_o	0,41	0,49	0,18	0,49	0,49	0,76	0,35	0,45
H_e	0,54	0,51	0,34	0,52	0,51	0,76	0,50	0,53
P_{HW}	0,01**	0,40 ^{NS}	0,00**	0,33 ^{NS}	0,43 ^{NS}	0,56 ^{NS}	0,00**	-
F_{IS}	0,24	0,04	0,47	0,06	0,04	0	0,30	0,16

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ^{NS} = não significativo; ¹ = desvio padrão; GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: ½ CHIT:REDS; GG4: ½ REDS:CHIT; GG5: ¾ (GG4):CHIT; GG6: 7/8 (GG5):CHIT; GG7: ¾ CHIT: (GG4)

Foram encontrados seis alelos, dos quais a frequência dos alelos 191 e 196 somam 80%, fato que refletiu na frequência dos genótipos. Dezoito das vinte e uma combinações genotípicas foram encontradas. Os genótipos 196/196, 191/196 e 196/201 foram mais frequentes.

Foi observada a presença de alelos privativos no *STR*-Promotor do grupamento genético Chitralada (186 e 206), dos quais somente o alelo 206 foi observado nos híbridos (exceto GG4). O alelo186 foi encontrado tanto em machos e quanto em fêmeas do grupamento GG2 e apenas em fêmeas híbridas

GG6. Os demais alelos estão presentes de forma similar em machos e fêmeas independente de grupamento genético.

Os grupamentos Chitralada (GG2) e híbridos provenientes de mães Chitralada (exceto GG4) não apresentaram desvio em relação ao *EHW*. Ao avaliar os híbridos GG4, GG5 e GG6, verifica-se que esse comportamento foi oposto entre sexos. Não foi observada diferença entre sexos em relação ao *EHW* nos demais híbridos (GG3 e GG7) provenientes de mães Red-Stirling.

Exceto nos GG2 ($F_{IS}=0,00$) e GG6 ($F_{IS}=-0,05$), um excesso de homozigotos foi observado dentro dos grupamentos ($F_{IS}=0,16$), demonstrando que o processo de introgressão gênica por cruzamento absorvente para o *locus STR-Promotor* é funcional.

Perfis genéticos dos *locus STR-Íntron* obtidos por cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia *Red-Stirling* e Chitralada podem ser visualizados por grupamento genético e por sexo dentro de grupamento genético nas Figuras 33 e 34 e Tabela 9.

Não houve evidência de alelos nulos no *locus STR-Íntron* em nenhum grupamento genético. Foi genotipado um total de três alelos (198, 202 e 206), dos quais o alelo 198 não foi observado apenas no grupamento *Red-Stirling* (GG1). O genótipo homozigoto 198/198 foi encontrado somente no grupamento GG6. Os grupamentos GG5 (nas fêmeas) e GG7 (ambos os sexos) apresentaram desvio ao *EHW*, não sendo observado nos demais.

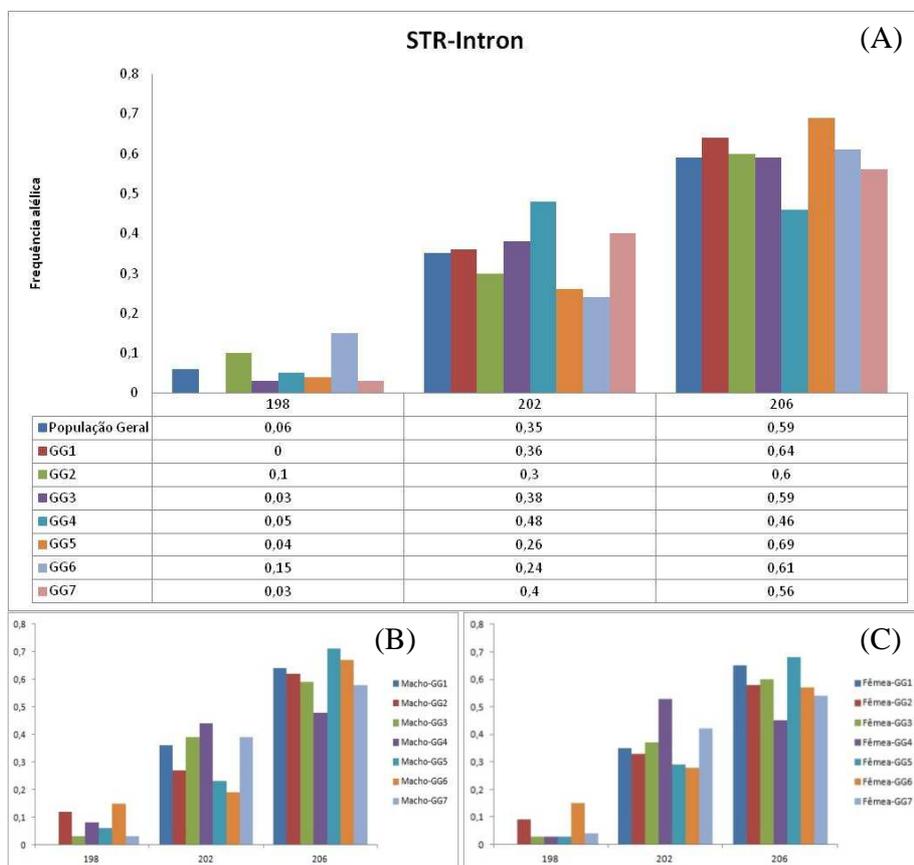


Figura 33 Histograma das frequências alélicas do *locus STR-Íntron*. (A) Por grupamento genético: GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: $\frac{1}{2}$ CHIT:REDS; GG4: $\frac{1}{2}$ REDS:CHIT; GG5: $\frac{3}{4}$ (GG4):CHIT; GG6: $\frac{7}{8}$ (GG5):CHIT; GG7: $\frac{3}{4}$ CHIT:(GG4). (B) Machos. (C) Fêmeas

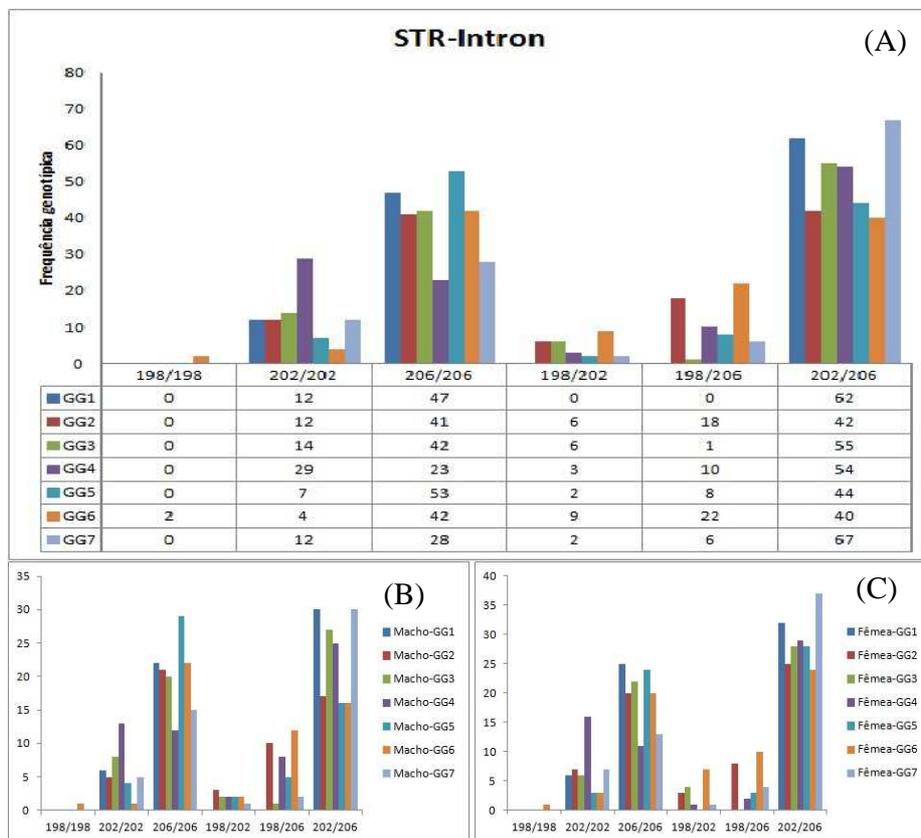


Figura 34 Histograma das frequências genotípicas do locus *STR*-Intron. (A) Por grupamento genético: GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: $\frac{1}{2}$ CHIT:REDS; GG4: $\frac{1}{2}$ REDS:CHIT; GG5: $\frac{3}{4}$ (GG4):CHIT; GG6: $\frac{7}{8}$ (GG5):CHIT; GG7: $\frac{3}{4}$ CHIT:(GG4). (B) Machos. (C) Fêmeas

Tabela 9 Descritiva do locus *STR*-Íntron obtido por cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia *Red-Stirling* e Chitralada: número de alelos (A), riqueza alélica (A_r), estimativa de alelos nulos (A_n), estimativa média de diversidade gênica de Nei's (h_s), conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e); equilíbrio de Hardy - Weinberg (P_{HW}); coeficiente de endogamia (F_{IS})

	GG1	GG2	GG3	GG4	GG5	GG6	GG7	Média
A	2	3	3	3	3	3	3	2,86
A_r	2	3	3	3	3	3	3	2,86
H_o	0,51	0,55	0,53	0,56	0,47	0,60	0,65	0,55
H_e	0,46	0,54	0,51	0,55	0,45	0,55	0,52	0,51
P_{HW}	0,14 ^{NS}	0,45 ^{NS}	0,38 ^{NS}	0,43 ^{NS}	0,31 ^{NS}	0,11 ^{NS}	0,00**	-
F_{IS}	-0,11	-0,02	-0,04	-0,02	-0,05	-0,09	-0,25	-0,08
Machos								
A	2	3	3	3	3	3	3	2,86
A_r	2	3	2,99	3	3	3	2,99	2,85
H_o	0,52	0,54	0,52	0,58	0,41	0,56	0,62	0,54
H_e	0,47	0,54	0,51	0,58	0,45	0,50	0,51	0,51
P_{HW}	0,29 ^{NS}	0,52 ^{NS}	0,51 ^{NS}	0,52 ^{NS}	0,27 ^{NS}	0,20 ^{NS}	0,06*	-
F_{IS}	-0,11	0	-0,02	0	0,09	-0,12	-0,22	-0,05
Fêmeas								
A	2	3	3	3	3	3	3	2,86
A_r	2	3	2,99	2,98	2,99	3	2,99	2,85
H_o	0,51	0,57	0,53	0,54	0,53	0,63	0,68	0,57
H_e	0,46	0,55	0,51	0,53	0,45	0,58	0,53	0,52
P_{HW}	0,28 ^{NS}	0,41 ^{NS}	0,40 ^{NS}	0,45 ^{NS}	0,09*	0,20 ^{NS}	0,01**	-
F_{IS}	-0,04	-0,02	-0,18	-0,09	-0,28	-0,09	-0,28	-0,11

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ^{NS}= não significativo; ¹= desvio padrão; GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: ½ CHIT:REDS; GG4: ½ REDS:CHIT; GG5: ¾ (GG4):CHIT; GG6: 7/8 (GG5):CHIT; GG7: ¾ CHIT: (GG4)

Comparações entre os grupamentos genéticos podem ser visualizados na Tabela 10. Não foi observada variação, entre os grupamentos híbridos GG3 e GG7, provenientes de fêmeas *Red-Stirling* (GG1). No entanto, ao se comparar os híbridos provenientes de fêmeas Chitralada (GG2), constata-se diferenciação durante a introgressão gênica (GG4 x GG5=0,074; GG4 x GG5=0,118 GG5 x GG6=0,087). Ao comparar os grupamentos puros com os híbridos, observa-se que o grupamento GG1 foi mais divergente (variando de 0,060 a 0,151) do que o GG2 (variando de 0,032 a 0,086).

Tabela 10 Diferenciação genética entre sete grupamentos genéticos, obtido por cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia Red-Stirling e Chitralada. Índices de fixação D_{EST} (abaixo da diagonal) e valor-P (acima da diagonal)

	GG1	GG2	GG3	GG4	GG5	GG6	GG7
GG1	-	**	**	**	**	**	**
GG2	0,079	-	**	**	**	**	*
GG3	0,067	0,011	-	**	**	**	0,13 ^{NS}
GG4	0,081	0,032	0,035	-	**	**	**
GG5	0,060	0,016	0,027	0,074	-	**	**
GG6	0,151	0,086	0,150	0,118	0,087	-	**
GG7	0,076	0,005	0,003	0,003	0,029	0,115	-

**P<0,01; *P<0,05; ^{NS}= não significativo; GG1: REDS; GG2: CHIT; GG3: ½ CHIT:REDS; GG4: ½ REDS:CHIT; GG5: ¾ (GG4):CHIT; GG6: 7/8 (GG5):CHIT; GG7: ¾ CHIT:(GG4)

Análise de variância molecular, em três níveis de hierarquização, pode ser visualizada na Tabela 11. Ao avaliar a divisão da variação molecular, verifica-se que, independente da estruturação dos grupamentos genéticos, em média, 94,61% da variação total dos *loci STR* é em virtude da variação individual. Não houve diferenciação molecular entre sexos dos peixes com relação a grupamento genético e nem entre idades dos peixes dentro de grupamento genético. A endogamia média entre indivíduos dentro de grupamento genético foi baixa ($\Phi_{IS} = 0,021$).

Tabela 11 – Análise de variância molecular (AMOVA) em três níveis de hierarquização

	Componentes Variância (% explicação)	Φ -statistics (<i>P</i>)
por Grupamento Genético (GG)		
Entre GG	0,0276(5,31)	$\Phi_{ST} = 0,052$ (0,000)
Entre indivíduos dentro GG	0,0022(0,42)	$\Phi_{IS} = 0,021$ (0,155)
Dentro indivíduos	0,4910(94,28)	$\Phi_{IT} = 0,72$ (0,000)
por Sexo dentro de GG		
Entre Sexos	-0,0034(-0,66)	$\Phi_{CT} = 0,007$ (0,000)
Entre GG dentro de sexo	0,0270(5,21)	$\Phi_{SC} = 0,052$ (0,408)
Entre Indivíduos dentro GG	0,0025(0,49)	$\Phi_{IS} = 0,006$ (0,0058)
Dentro indivíduos	0,4910(94,96)	$\Phi_{IT} = 0,050$ (0,830)
por GCI* entre Sexo dentro de GG		
Entre GCI	0,020(3,81)	$\Phi_{CT} = 0,000$ (0,000)
Entre GG dentro de GCI	0,018(3,51)	$\Phi_{SC} = 0,000$ (0,000)
Entre Indivíduos dentro GG	-0,010(-1,94)	$\Phi_{IS} = 0,819$ (0,014)
Dentro indivíduos	0,491(94,61)	$\Phi_{IT} = 0,002$ (0,001)

*grupo de contemporâneo de idade; *P* = testes de significância (1.023 permutações)

3.2 Associação dos loci STR do gene *GHI* com características de desempenho em tilápia

Os efeitos fixos de sexo, GCI e classe de peso inicial foram significativos sendo, assim, mantidos no modelo. O desempenho de ganho em peso (g) nas quatro mensurações dos machos (47,79; 69,27; 124,46 e 213,77; respectivamente) foram, em média, superior ao das fêmeas (41,47; 59,06; 94,68 e 151,67; respectivamente). O mesmo comportamento foi verificado nas características: comprimento padrão (11,00; 13,04; 15,23 e 17,55 cm x 10,54; 12,29; 14,10 e 15,91cm), altura (4,24; 4,73; 5,31 e 6,62 cm x 4,01; 4,26; 4,77 e 5,79 cm) e largura (2,01; 2,24; 2,68 e 3,15 cm x 1,89; 2,09; 2,44 e 2,84 cm). No entanto, essas diferenças fenotípicas não podem ser explicadas somente pelos

loci STR do gene *GHI*, uma vez que não houve diferenciação genotípica entre sexos (Tabela 11).

Neste estudo não foram feitas abordagens sobre o desempenho direto dos grupamentos genéticos. No entanto, seus efeitos foram inseridos no modelo para assegurar a hipótese de que o ordenamento dos *loci STR* significativos seja corrigido pelos grupamentos genéticos avaliados no cruzamento absorvente.

As análises de associação foram realizadas por mensuração. De maneira geral, o *locus STR*-Promotor foi associado às características mensuradas. O ordenamento das características foi realizado somente nas mensurações cujos efeitos dos *STR* foram significativos (Tabelas 12 e 13).

Ao observarmos os quatro genótipos do *locus STR*-Promotor de melhor desempenho fenotípico, constata-se que os alelos 181 e 196 estão presentes na mesma proporção. Contrapondo, os alelos 191 e 201 estão em maior frequência nos genótipos de pior desempenho, sendo o alelo 201 privativo da variedade *Red-Stirling*. Foi observada segregação do alelo 201 entre os grupamentos genéticos híbridos (Figura 31) resultando em desempenho fenotípico inferior em relação ao grupamento Chitralada.

Dentre os genótipos encontrados no *STR*-Promotor (Figura 32), os com melhores desempenhos considerando todas as características em todas as mensurações foram 181/181, 181/191, 196/206 e 196/196. Verifica-se uma constância no ordenamento entre os quatro melhores e os quatro piores independente da característica.

Tabela 12 Ordenamento do *locus STR*-Promotor (valores fenotípicos)^{número de peixes}, sobre a característica peso (g) e comprimento padrão (cm), obtidos em um esquema de cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia *Red-Stirling* e Chitralada

Genótipos*	Mensuração			
	1°	2°	3°	4°
	PESO			
181/181	2(49,71) ^{14b}	2(69,78) ^{14b}	3(117,00) ^{14c}	3(202,00) ^{13b}
181/186	7(64,00) ^{1a}	11(86,00) ^{1a}	11(143,00) ^{1a}	-
181/191	1(49,77) ^{22b}	4(70,71) ^{21b}	6(121,61) ^{18c}	2(202,52) ^{17b}
181/196	3(46,67) ^{60c}	6(66,71) ^{59b}	15(110,07) ⁵⁶	5(179,64) ^{55c}
181/201	13(39,57) ^{7f}	5(59,29) ^{7d}	4(97,14) ^{7c}	7(158,00) ^{7d}
181/206	5(47,17) ^{6c}	7(67,33) ^{6b}	10(107,33) ^{6c}	13(163,00) ^{6d}
186/191	10(38,00) ^{2g}	14(49,50) ^{2f}	14(70,00) ^{2e}	12(145,00) ^{1d}
186/196	4(44,00) ^{7d}	10(62,57) ^{2c}	8(102,71) ⁷	4(166,00) ^{7d}
186/201	12(30,00) ^{1h}	2(46,00) ^{1g}	12(73,00) ^{1e}	12(129,00) ^{1d}
191/191	6(44,03) ^{29d}	8(64,03) ^{29c}	5(111,09) ^{23c}	11(185,00) ²³
191/196	14(45,76) ^{100d}	18(66,56) ^{97b}	18(117,40) ^{90c}	6(195,14) ^{87b}
191/201	16(42,55) ^{11e}	13(61,91) ^{11c}	13(104,50) ^{10c}	14(171,50) ^{10c}
191/206	15(48,57) ^{7b}	15(68,00) ^{7b}	9(111,67) ^{3c}	9(175,00) ^{3c}
196/196	11(44,48) ^{321d}	1(64,70) ^{317c}	1(112,31) ²⁹⁰	10(187,80) ²⁸⁰
196/201	18(41,20) ^{54e}	17(56,44) ^{54e}	17(92,04) ^{45e}	16(154,70) ^{43d}
196/206	9(44,61) ^{18d}	3(68,11) ^{18b}	2(130,37) ^{16b}	1(222,12) ^{16a}
201/201	17(42,00) ^{13e}	16(50,17) ^{12f}	16(70,55) ^{11e}	17(112,80) ^{10e}
206/206	8(42,00) ^{1e}	9(61,00) ^{1c}	7(100,00) ^{1c}	8(159,00) ^{1d}
	COMPRIMENTO PADRÃO			
181/181	4(11,03) ^{14b}	2(13,09) ^{14a}	4(14,95) ¹⁴	4(17,19) ^{13b}
181/186	9(12,20) ^{1a}	10(11,41) ^{1d}	12(16,20) ^{1a}	-
181/191	2(11,04) ^{22b}	4(13,17) ^{21a}	11(15,09) ^{18c}	3(17,30) ^{17b}
181/196	15(10,85) ^{60b}	6(12,78) ^{59a}	10(14,73) ^{56c}	6(16,66) ⁵⁵
181/201	5(10,48) ^{7c}	5(12,40) ^{7b}	3(14,27) ^{7c}	11(16,00) ^{7e}
181/206	13(10,78) ^{6b}	13(13,05) ^{6a}	14(14,71) ^{6c}	13(16,40) ^{6c}
186/191	10(10,30) ^{2d}	14(11,65) ^{2b}	15(12,60) ^{2f}	14(15,10) ^{1g}
186/196	7(10,79) ^{7b}	9(12,61) ^{7b}	5(14,69) ^{7c}	2(16,59) ^{7c}
186/201	11(9,60) ^{1e}	11(11,40) ^{1d}	13(13,20) ^{1e}	12(15,30) ^{1f}
191/191	14(10,68) ^{29c}	7(12,62) ²⁹	8(14,61) ^{23c}	5(16,87) ^{23c}
191/196	18(10,89) ^{100b}	18(12,85) ^{97a}	16(14,98) ^{90c}	9(17,08) ^{87b}
191/201	17(10,54) ^{11c}	13(12,35) ^{11b}	9(14,63) ^{10c}	15(16,37) ^{10c}
191/206	12(11,11) ^{7b}	15(12,90) ^{7a}	7(15,07) ^{3c}	10(16,77) ^{3c}
196/196	1(10,78) ^{321b}	1(12,73) ^{317b}	1(14,79) ^{290c}	8(16,88) ^{280c}
196/201	6(10,53) ^{54c}	17(12,11) ^{54b}	17(13,78) ^{45c}	16(15,78) ^{43d}
196/206	3(10,87) ^{18b}	3(12,92) ^{18a}	2(15,37) ^{16b}	1(17,74) ^{16a}
201/201	16(10,36) ^{13d}	16(11,38) ^{12d}	18(12,74) ^{11f}	17(14,14) ^{10h}
206/206	8(10,60) ^{1c}	8(12,60) ^{1b}	6(14,40) ^{1c}	7(16,50) ^{1c}

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo Teste de Scott & Knott (P>0,05)

Tabela 13 Ordenamento do *locus STR*-Promotor (valores fenotípicos) número de peixes, sobre as características altura e largura do corpo em um esquema de cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia *Red-Stirling* e *Chitralada*

Genótipos*	Mensuração			
	1°	2°	3°	4°
ALTURA (cm)				
181/181	2(4,33) ^{14b}	-	3(5,23) ^{14a}	2(6,52) ^{13b}
181/186	9(4,71) ^{1a}	-	10(5,12) ¹	-
181/191	1(4,36) ^{22b}	-	5(5,28) ^{18a}	6(5,53) ^{17e}
181/196	11(4,18) ^{60dd}	-	14(5,03) ^{56b}	14(6,13) ⁵⁵
181/201	8(3,91) ^{7e}	-	6(4,78) ^{7c}	5(5,88) ^{7d}
181/206	5(4,25) ^{6c}	-	15(4,56) ^{6d}	13(5,96) ^{6d}
186/191	6(3,99) ^{2e}	-	8(4,79) ^{2c}	7(5,84) ^{1d}
186/196	13(4,01) ^{7e}	-	13(4,90) ^{7b}	8(5,98) ^{7d}
186/201	10(3,41) ^{1f}	-	12(4,34) ^{1e}	11(5,52) ^{1e}
191/191	3(4,12) ^{29d}	-	4(5,11) ^{23b}	4(6,27) ^{23c}
191/196	18(4,18) ^{100d}	-	17(5,19) ^{90a}	16(6,34) ^{87c}
191/201	14(4,22) ^{11c}	-	7(4,99) ^{10b}	10(6,08) ^{10d}
191/206	16(4,25) ^{7c}	-	11(5,06) ^{3b}	12(6,11) ^{3d}
196/196	4(4,12) ^{321d}	-	2(5,09) ^{290b}	3(6,28) ^{280c}
196/201	12(4,01) ^{54e}	-	18(4,72) ^{45c}	17(5,81) ^{43d}
196/206	15(4,11) ^{18d}	-	1(5,36) ^{16a}	1(6,62) ^{16a}
201/201	17(4,01) ^{13e}	-	16(4,39) ^{11e}	15(5,24) ^{10f}
206/206	7(4,06) ^{1e}	-	9(4,80) ^{1b}	9(5,85) ^{1d}
LARGURA (cm)				
181/181	-	-	8(2,60) ^{14d}	5(3,27) ^{13a}
181/186	-	-	7(2,91) ^{1a}	-
181/191	-	-	4(2,71) ^{18c}	2(3,15) ^{17b}
181/196	-	-	10(2,53) ^{56d}	6(2,98) ^{55d}
181/201	-	-	9(2,47) ^{7d}	7(3,06) ^{7c}
181/206	-	-	2(2,67) ^{6c}	15(2,86) ^{6d}
186/191	-	-	16(2,23) ^{2e}	9(2,89) ^{1d}
186/196	-	-	3(2,56) ^{7d}	4(2,93) ^{7d}
186/201	-	-	15(2,15) ^{1f}	11(2,65) ^{1e}
191/191	-	-	12(2,59) ^{23d}	3(3,07) ^{23c}
191/196	-	-	13(2,66) ^{90c}	14(3,03) ^{87d}
191/201	-	-	6(2,55) ^{10d}	12(2,94) ^{10d}
191/206	-	-	5(2,57) ^{3d}	8(3,01) ^{3d}
196/196	-	-	14(2,56) ^{290d}	13(3,00) ^{280d}
196/201	-	-	17(2,43) ^{45d}	16(2,85) ^{43d}
196/206	-	-	1(2,78) ^{16b}	1(3,24) ^{16a}
201/201	-	-	18(2,21) ^{11e}	17(2,55) ^{10f}
206/206	-	-	7(2,51) ^{1d}	10(2,87) ^{1d}

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo Teste de Scott & Knott (P>0,05)

O genótipo 181/186 não foi verificado na 4^o mensuração, assim, sua classificação final foi subestimada nesta mensuração. Sua classificação nas mensurações significativas ficou entre 7-8^o lugar. Os demais genótipos foram constantes.

Os coeficientes da correlação de Pearson e o nível de significância entre os ordenamentos dos genótipos do *locus STR*-Promotor em cada mensuração por característica podem ser visualizados na tabela 14.

Tabela 14 Correlação de Pearson (abaixo da diagonal) e nível de significância (acima da diagonal) entre os ordenamentos genotípicos do *locus STR*-Promotor em cada característica avaliada por mensuração

	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o
	PESO (G)				ALTURA (CM)			
1 ^o	-	0,00**	0,06*	0,00**	-	-	0,02**	0,01**
2 ^o	0,67	-		0,01**	-	-	-	-
3 ^o	0,45	0,85	-	0,03**	0,53	-	-	0,00**
4 ^o	0,66	0,59	0,52	-	0,55	-	0,95	-
	COMPRIMENTO PADRÃO (CM)				LARGURA (CM)			
1 ^o	-	0,00**	0,01**	0,06*	-	-	-	-
2 ^o	0,68	-	0,00**	0,00**	-	-	-	-
3 ^o	0,58	0,80	-	0,00**	-	-	-	0,02**
4 ^o	0,46	0,72	0,65	-	-	-	0,55	-

**P<0,01; *P<0,05; ^{NS}= não significativo

Os índices observados de correlação da classificação dos genótipos nas características entre as mensurações foram de médio a alto, refletindo a estabilidade do desempenho fenotípico observado no ordenamento dos genótipos do *locus STR*-Promotor dentre as características avaliadas.

Dentre as características avaliadas, apenas altura e largura do corpo foram associadas com o polimorfismo presente no *locus STR*-Íntron em distintas mensurações. O ordenamento dos genótipos do *locus STR*-Íntron, cujos efeitos de associação com as características avaliadas foram significativos, estão dispostos na Tabela 15.

O alelo 198, privativo da variedade Chitralada, apresentou tendência de superioridade uma vez que o genótipo homozigoto foi observado em apenas dois peixes do grupamento genético GG6 com fenótipos de 10,4 e 11 cm comparados ao desempenho médio de 9,83 cm do melhor genótipo 202/206 (n=306; mínimo= 7,6; máximo=12,60cm).

Essa tendência de superioridade do alelo 198 no *STR*-Íntron foi confirmada nas características altura (1º mensuração) e largura (1º e 2º mensuração), onde genótipos com sua presença (198/206 e 198/202) tiveram bons resultados. Os genótipos homozigotos 202/202 e 206/206 foram, em média, associados aos piores desempenhos fenotípicos.

Os coeficientes da correlação de Pearson e o nível de significância entre os ordenamentos dos genótipos do *locus STR*-Íntron em cada mensuração por característica podem ser visualizados na tabela 16. Verificar que o comportamento do *locus STR*-Íntron foi similar entre as características com correlação altas entre mensurações em cada característica.

Tabela 15 Ordenamento do *locus STR*-Íntron (valores fenotípicos) ^{número de peixes}, sobre as características altura e largura do corpo em um esquema de cruzamento absorvente entre as variedades de tilápia Red-Stirling e Chitralada

Genótipos*	Mensuração			
	1°	2°	3°	4°
ALTURA (cm)				
198/198	4(4,46) ^{2a}	-	-	-
198/202	3(4,23) ^{22b}	-	-	2(6,41) ^{20a}
198/206	2(4,21) ^{57b}	-	-	3(6,29) ^{51b}
202/202	6(4,09) ^{73c}	-	-	4(6,20) ^{57b}
202/206	1(4,14) ^{299c}	-	-	1(6,22) ^{262b}
206/206	5(4,11) ^{232c}	-	-	5(6,22) ^{199b}
LARGURA (cm)				
198/198	3(2,07) ^{2a}	3(2,35) ^{2a}	-	-
198/202	1(2,01) ^{22b}	2(2,27) ^{22b}	-	-
198/206	5(1,96) ^{57c}	4(2,20) ^{55c}	-	-
202/202	6(1,91) ^{73d}	6(2,16) ^{72d}	-	-
202/206	2(1,96) ^{299d}	1(2,16) ^{293d}	-	-
206/206	4(1,94) ^{232d}	5(2,15) ^{230d}	-	-

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo Teste de Scott & Knott (P>0,05)

Tabela 16 Correlação de Pearson (abaixo da diagonal) e nível de significância (acima da diagonal) entre os genótipos do *locus STR*-Íntron nas mensurações nas quais seus efeitos foram verificados

	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
	ALTURA (cm)				LARGURA (cm)			
1°	-	-	-	0,03**	-	0,02**	-	-
2°	-	-	-	-	0,89	-	-	-
3°	-	-	-	-	-	-	-	-
4°	0,56	-	-	-	-	-	-	-

**p<0,01; *p<0,05; ^{NS}= não significativo

4 DISCUSSÃO

4.1 Potencial de *locus STR* no *GHI* como *QTL's*

Os resultados do presente trabalho estão embasados na: (i) escolha de variedades contrastantes, (ii) aleatoriedade e tamanho amostral, (iii) no monitoramento molecular em processos de hibridização por *loci STR* presente nas regiões do promotor e do íntron 1 do gene *GHI* e (iv) análise estatística da associação desses *loci* com características de desempenho fenotípico dos grupamentos genéticos avaliados.

Dentre as variedades estudadas foi observada a presença de alelos privativos, ou seja, ausentes na variedade contrastante. No *locus STR*-Promotor os alelos com menor número de expansão: 181 (frequências similares nos grupamentos GG1 e GG2), 186 (privativo do GG2) e 191 (16% a mais no GG2) foram associados ao melhor desempenho e o alelo 201 (privativo do GG1) associado ao pior desempenho. Ao observar o *locus STR*-Íntron, constata-se que dentre os três alelos, o alelo privativo 198 do grupamento GG2 está associado ao melhor desempenho.

Estudos comprovando a associação de polimorfismo *STR* funcionais e definição dos melhores alelos e genótipos são escassos. Komatsu et al. (2011) realizaram um estudo de associação entre cinco polimorfismos, tanto de *SNPs* quanto de *STR's*, no gene receptor de grelina - *GHSR* (*growth hormone secretagogue receptor*) com características de carcaça em bovinos Wagyu. Dois *STR* estavam presentes neste estudo, um no promotor ((TG)_n) e outro no íntron-1 ((GTTT)_n). Os autores encontraram efeito associativo apenas em relação ao *STR* do promotor e constataram que, dentre os quatro alelos de maior frequência, o menor alelo (TG)₁₉ foi associado ao melhor desempenho para as características peso de carcaça e ganho médio diário. As hipóteses

relacionadas a processos transcricionais e transducionais foram levantadas pelos autores para justificar o melhor desempenho desse alelo. Para comprovar estas hipóteses, os autores realizaram uma simulação de estruturas secundárias dos *mRNA*'s formados por indivíduos com a presença dos alelos (TG)₁₉, (TG)₂₂, (TG)₂₃, (TG)₂₄, (TG)₂₉ e (TG)₃₄; e com os haplótipos com *STR-SNP*'s ((TG)₁₉-A e (TG)₂₄-C). Verificaram que os níveis de atividade da estrutura secundária do *mRNA* são afetados pela presença dos alelos (TG)₁₉ e não-(TG)₁₉ ou entre A e C. Assim, concluíram que o alelo (TG)₁₉ é um potencial e economicamente viável marcador em bovinos Wagyu.

Em tilápias, um trabalho pioneiro foi desenvolvido por Strelman e Kocher (2002) ao associar níveis de expressão do gene prolactina-1 (*prll*) e *STR* presentes no promotor deste gene ((CA)_n, posição -200 do gene). Os autores realizaram um desequilíbrio de ligação, entre *O. mossambicus* (adaptada a maiores concentrações salina) e *O. niloticus* (não adaptada) e desafiaram os genótipos (CA)_{35x35} (CA)_{35x14} (CA)_{14x14} em três concentrações salinas (0; 16 e 32 ppt). Verificou que fêmeas cresceram mais que machos, mas não diferiram em relação à expressão de *prll*; e que peixes com os genótipos (CA)_{14x14} em água doce (0 ppt) expressaram, aproximadamente, duas a sete vezes mais *prll* que indivíduos com os genótipos (CA)_{35x14} e (CA)_{35x35}, respectivamente. Propuseram que *STR* de comprimento variável no promotor pode induzir conformações no DNA que dificultariam a ligação de fatores transcricionais.

Evidências das hipóteses mencionadas podem ser extrapoladas para *STR* presentes no íntron dos genes e são relatadas em revisões (LI et al., 2004; DE-SANTIS; JERRY, 2007; MARQUES-RESENDE et al., 2011). Abordagens de *splicing* de *mRNA* e silenciamento gênico, também, são abordados por Li et al. (2004) (Apêndice A).

Uma vez compreendida como as variações alélicas podem influenciar as variações fenotípicas, a dinâmica dos alelos na composição dos genótipos dos

loci STR do gene *GHI* nos grupamentos genéticos passa a ter papel preponderante para se iniciar um programa de seleção assistida por marcadores.

Pode-se observar que os grupamentos Chitralada e Red-Stirling (GG1), para o *locus STR*-Promotor, comportaram-se de forma distinta em relação ao *EHW*. Isso foi em razão do menor número de alelos e da alta homozigosidade do GG1, independente de sexo ($A = 4$ e 5 ; e $F_{IS} = 0,20$ e $0,24$, respectivamente, para machos e fêmeas).

Para o *locus STR*-Íntron foi observado desvio de em relação ao *EHW* apenas nos híbridos GG5 (machos) e GG7 (ambos os sexos). Esse comportamento era esperado em todos híbridos em virtude do processo de introgressão gênica do alelo 198 presente na variedade Chitralada.

O processo de introgressão gênica geral, dos *loci STR* do *GHI*, demonstra uma superioridade da variedade Chitralada ao ser utilizado como mãe por causa do aumento na probabilidade de encontrar alelos privativos e favoráveis ao incremento fenotípico na população formada (Tabela 10). Essa superioridade está relacionada à relação reprodutiva implementada na condução experimental e na coleta aleatória de reprodutores no plantel, uma vez que 94,61% da variação total dos *loci STR* é devida a variação individual (Tabela 11).

4.2 Estudo de associação dos *loci STR* do *GHI* com características de desempenho

No *locus STR*-Promotor, uma redução drástica na frequência do alelo 201 foi observada, ao utilizar fêmeas da variedade Red-Stirling na formação dos grupamentos híbridos GG3 (2%) e GG7 (0%), em relação a fêmeas Chitralada nos híbridos GG4 (9%), GG5 (5%); e, no grupamento GG6 (8%), onde foi encontrada a presença do alelo 186 (4%), privativo da variedade Chitralada

(Figura 31). Essa dinâmica para o *locus STR-Íntron* favoreceu o incremento das características avaliadas pelo aumento da frequência do alelo 198 nos grupamentos híbridos oriundos de fêmea Chitralada, atingindo o ápice de 15 % no grupamento 7/8 de Chitralada (GG6), podendo ser observado 2 peixes homozigotos, um macho e uma fêmea (Figura 33). Esses resultados foram confirmados pelos índices de diferenciação genética D_{est} ao considerar os dois *loci STR* juntos (Tabela 10).

Algumas comparações podem ser feitas para ilustrar a superioridade dos três genótipos extremos de cada característica para o *STR-Promotor*. Em média, esse peixe “dominante” pesaria 54 g a mais em relação a um peixe “recessivo”, fruto das proporções morfométricas mais vantajosas: 1,74 cm no comprimento padrão, 0,42 cm na altura e 0,35 cm na largura.

Já para o *locus STR-Íntron*, as diferenças morfométricas entre os extremos seriam 0,16 cm altura na e 0,09 cm na largura. Comparações que não dizem muito, ao considerarmos a superioridade fenotípica dos peixes com genótipo 198/198, em relação aos peixes “recessivos” 0,32 e 0,16, respectivamente, para altura e largura.

Pela análise de variância molecular, conclui-se que a seleção para peso praticada em tilápia é funcional uma vez que 94,61% da variação total dos *loci STR* são devidos à variação individual, independentes de sexo, e que a endogamia provocada no processo de hibridização foi baixa $\Phi_{IS} = 0,021$ (Tabela 11).

Os resultados do presente estudo comprovaram, pela primeira vez, uma associação estatisticamente significativa entre o desempenho de tilápias em sistemas de criação intensiva e o polimorfismo *STR*'s encontrados no promotor e no íntron 1 do *GHI*. A busca de regiões genômicas associadas ao desempenho, conhecidas como *QTLs*, tem sido o objetivo de vários melhoristas para o desenvolvimento de programas de seleção baseados nestas regiões (*Marker-*

Assisted Selection - MAS) (DEKKERS, 2004). Desta forma, a associação encontrada pode se transformar em uma ferramenta de grande valor para ser incluída em programas de seleção quantitativa para desempenho que atualmente são realizadas, principalmente, com a variedade GIFT. Não podemos deixar de mencionar que os resultados encontrados deverão, também, ser corroborados por estudos de expressão gênica do gene do Hormônio do Crescimento seja por *RT-PCR* ou por *RNA-Seq*. É importante salientar que tal associação entre níveis de expressão e polimorfismo de *STR* em prolactina foi observada por Streelman e Kocher et al. (1998), o que sugere que os níveis de *GH* podem, também, ser regulados pela presença de expansões ou contrações de *STR's* no promotor e no íntron, contribuindo em maior ou menor grau no desempenho em de tilápias em criações comerciais.

5 CONCLUSÕES

- Os polimorfismos encontrados nos *loci* *STR*-Promotor e *STR*-Íntron do gene *GHI* de *Oreochromis niloticus* estão associados às características de desempenho.
- As frequências alélicas *loci* *STR*-Promotor e *STR*-Íntron em machos e fêmeas são similares.
- Alelos com menor número de repetições em *tandem* foram associados a desempenhos superiores.
- Os *loci* *STR*-Promotor e *STR*-Íntron podem ser considerados marcadores *QTL*'s podendo ser incorporados em programas de melhoramento em tilápias.
- Estudos de expressão gênica ligados à configuração espacial do gene *GHI* e do *mRNA* do GH poderão contribuir para melhor compreensão da ação dos *loci* *STR*-Promotor e *STR*-Íntron.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMULY, R. et al. 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**, Tokyo, v. 71, n. 3, p. 479–490, May 2005.

BATES, D. et al. “**lme4**: linear mixed-effects models using Eigen and S4.”[S.l.: s.n.], 2014. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=lme4>>. Acesso em: 9 out. 2014.

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

BER, R.; DANIEL, V. Structure and sequence of the growth hormone encoding gene from *Tilapia nilotica*. **Gene**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 245-250, Abr. 1992.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 26, n. 2, p. 211-252, Abr. 1964.

DEKKERS, J. C. M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 13, p. 313–328, Jan. 2004.

DE-SANTIS, C.; JERRY, D. R. Candidate growth genes in finfish: where should we be looking? **Aquaculture**, Amsterdam, v. 272, n. 1–4, p. 22–38, Nov. 2007.

EKNATH, A. E. et al. Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 111, n. 1-4, p. 171-188, Apr. 1993.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 564–567, May 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Amsterdam, v.131, n. 2, p.479 – 491, June 1992.

GALBREATH, B. F.; BARNES, T. A. Consumer preference for color and size of tilapia sold in supermarkets. In: ANNUAL CATFISH FORMED OF AMERICA RESEARCH WORKSHOP, 30., 1981, Stuttgart. **Proceeding...** Stuttgart: FAO, 1981. p. 47-48.

GOUDET, J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. **Heredity**, London, v. 86, n. 6, p. 485–486, Nov. 1995.

HAYLOR, G.; MUIR, J. **A fish hatchery manual for Africa**. Stirling: Pisces Press, 1998.

HUSSAIN, M. G. Genetics of body color inheritance in Thai and Egyptian red tilapia strains. **Asia Fisheries Science**, Tokyo, v. 7, n. 4, p. 215-224, July 1994.

JOST, L. Gst and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 18, p. 4015–4026, Sept. 2008.

KALINOWSKI, S. T. Hw-quickcheck: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy-Weinberg expectation. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 974-979, Dec. 2006.

KANG, J. H. et al. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 494-498, June 2002.

KOMATSU, M. et al. Genetic association between GHSR1a 5'UTR-microsatellite and nt-7(C>A) loci and growth and carcass traits in Japanese Black cattle. **Journal Animal Science**, v. 82, n. 3, p. 396–405, June 2011.

KOCHER, T. D. et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics**, Baltimore, v. 148, n. 3, p. 1225 - 1232, Mar. 1998.

KOREN, Y. et al. Carp growth hormone: molecular cloning and sequencing of cDNA. **Gene**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 309-315, Apr. 1989.

LAGO, A. A. **Retrocruzamento entre as variedades de *Oreochromis niloticus* Red-Stirling e Chitralada**. 2014. 122 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

LI, Y. C. et al. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 6, p. 991–1007, June 2004.

MARQUES-RESENDE, K. F. et al. Implication of the changing concept of genes on plant breeders work. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 11, n. 4, p. 345-351, Dec. 2011.

McANDREW, B. J.; MAJUMDAR, K. C. Tilapia stock identification using electrophoretic markers. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 30, n. 1-4, p. 249-261, Jan. 1983.

MOREIRA, A. A. et al. Genetic variability of two Nile tilapia strains by microsatellites markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 521-526, Aug. 2007.

MOREIRA, A. A.; MOREIRA, H. L. M.; HILSDORF, A. W. S. Comparative growth performance of two Nile tilapia (Chitralada and Red-Stirling), their crosses and the Israeli tetra hybrid ND-56. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1049-1055, Aug. 2005.

OHNO, S.; WOLF, U.; ATKIIN, N. B. Evolution from fish to mammals by gene duplication. **Hereditas**, Lund, v. 59, n. 1, p. 169-187, Feb. 1968.

OOSTERHOUT, C. V. et al. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 535-538, Sept. 2004.

PEREIRA, A. P. et al. Association of GH and IGF-1 polymorphism with growth traits in a synthetic beef cattle breed. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 2, p. 230-36, Feb. 2005.

PONZONI, R. W. et al. Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 247, n. 1-4, p. 203-210, June 2005.

PONZONI, R. W. et al. Genetic improvement of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) -present and future. In: The Eighth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. **Proceeding...** Cairo: ISTA, 2007. p. 33-52.

QUÉRÉ, N. et al. Genomic sequences and genetic differentiation at associated tandem repeat markers in growth hormone, somatotactin and insulin-like growth factor-1 genes of the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Living Resources**, Montruge, v. 23, n. 3, p. 285-296, July 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2010. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

REFSTIE, T. Genetic and environmental sources of variation of body weight and length of rainbow trout fingerlings. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 351-357, Apr. 1980.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual 1–3. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, V. B. et al. Avaliação de curvas de crescimento morfométrico de linhagens de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1486-1492, set./out. 2007.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Auckland, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **User's guide**: statistical: version 8. Cary: SAS Institut, 1999.

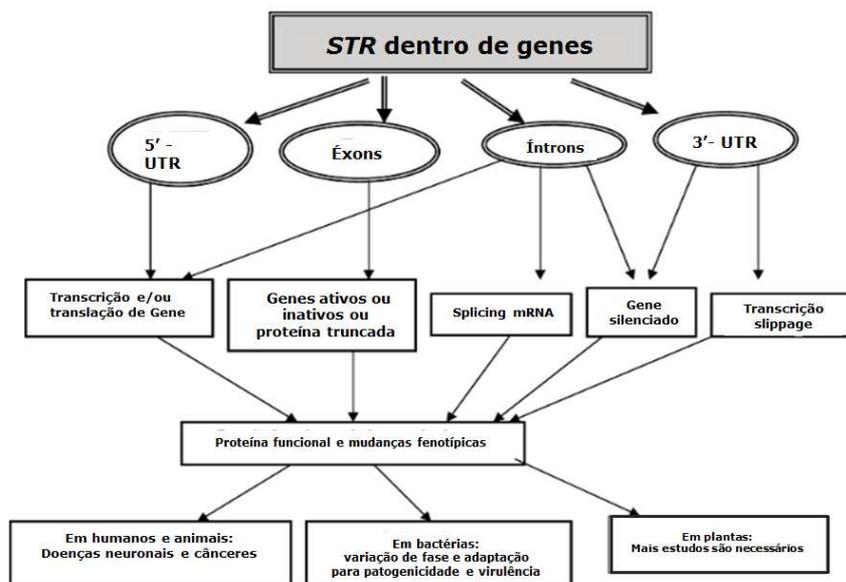
STREELMAN, J. T.; KOCHER, T. D. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia. **Physiological Genomics**, London, v. 9, n. 1, p. 1-4, Jan. 2002.

YUE, G. H.; ORBAN, L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 99–100, June 2002.

ZIMMERMANN, S. O bom desempenho das Chitraladas no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 15-19, 2000.

ANEXOS

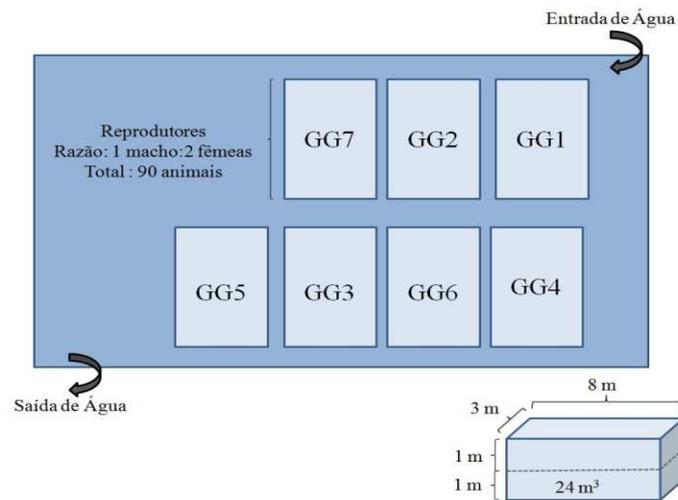
ANEXO A Funções regulatórias de *STR* dentro de éxons, 3' UTR, 5'UTR, e íntrons (Adaptado de Li *et al.*, 2004)



ANEXO B FASE DE REPRODUÇÃO

Croqui - fase de reprodução

Grupamento Genético	Pai	Mãe
GG1	REDS	REDS
GG2	CHIT	CHIT
GG3	CHIT	REDS
GG4	REDS	CHIT
GG5	GG4	CHIT
GG6	GG5	CHIT
GG7	CHIT	GG4



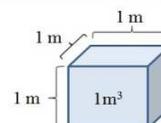
ANEXO C FASE DE ALEVINAGEM

Croqui - fase de alevinagem

Grupamento Genético	Pai	Mãe
GG1	REDS	REDS
GG2	CHIT	CHIT
GG3	CHIT	REDS
GG4	REDS	CHIT
GG5	GG4	CHIT
GG6	GG5	CHIT
GG7	CHIT	GG4

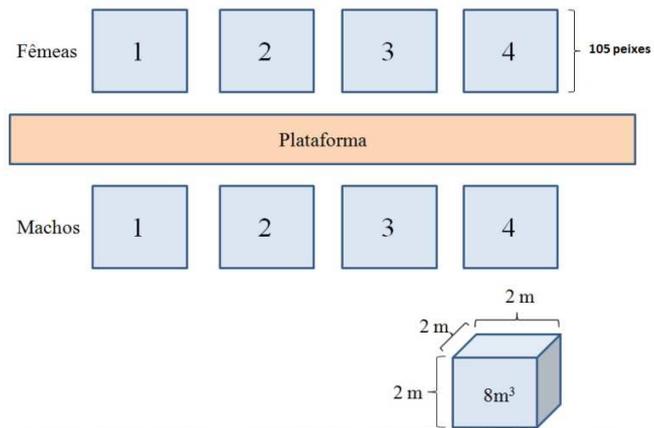
GG4	GG5	GG6	GG1	GG3	GG2	GG7
GG3A	GG6A	GG7A	GG2A	GG4A	GG5A	GG1A

GG6B	GG7B	GG3B	GG5B	GG1B	GG4B	GG2B
GG2C	GG1C	GG5C	GG7C	GG6C	GG3C	GG4C



ANEXO D FASE DE DESEMPENHO

Croqui -fase de desempenho



APÊNDICES

APÊNDICE A Ofício de doação de alevinos ao DZO/UFLA


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Julio de Mesquita Filho"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRARIAS E VETERINARIAS
UNESP

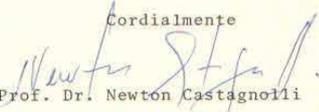
Jaboticabal, 23 de novembro de 1977.

Prezado Colega,

Em atenção ao vosso ofício DZO - 376 de 10 do corrente mes, adiantamos que prazeirozamente oferecemos ao Setor de Piscicultura da Co - irmã até 500 alevinos de Tilapia nilotica, podendo ser retiradas no final deste mês ou mesmo em qualquer dia útil do mês de dezembro, no periodo das 7:00 às 11:00 horas e das 13:00 às 17:00 horas.

Sendo o que se apresenta, de momento,

Cordialmente


 Prof. Dr. Newton Castagnolli
 Resp. p/ Setor de Piscicultura - F.C.A.V.-UNESP-

Ilmo. Sr.
 Prof. Marcio da Costa Soares
 DD. Chefe do DZO - ESAL
 Escola Superior de Agricultura de Lavras.
 LAVRAS - M.G.


 11/11/77

APÊNDICE B Ofício de solicitação de transporte para buscar 2.000 alevinos de Tilápia Nilótica

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

DO: Auxiliar de Ensino - Alvaro João L. Almeida
AD: Sr. Chefe do DZO
ASSUNTO: Solicitação, faz
DATA: 9/11/77

Prezado Senhor,

No dia 8 p.p., recebemos a visita do Dr. Jaques Bard, assessor da EPAMIG na área de Piscicultura. O contato com o Dr. Bard foi bastante proveitoso para nós em face do seu alto grau de conhecimentos na área. Visto que o nosso Posto de Piscicultura está em condições de funcionamento venho solicitar que:

- 1- Seja pedido junto aos órgãos competentes da ESAL, o fornecimento do caminhão Mercedes pequeno, para uma viagem, (até o fim do mês de novembro) à cidade de Jaboticabal para buscar 2 000 alevinos de Tilápia Nilótica.
- 2- Construção urgente da barragem na área do DZO para dar continuidade ao trabalho; lagoas de estabilização do esterco de suínos. Construção do sistemas de escoamento em 2 das 3 lagoas já existentes.
- 3- Entrar em contato com o Dr. Eurípedes Pacheco responsável pela área da Subestação Experimental de Lavras, para saber da possibilidade de fornecer as lagoas lá existentes para o setor de Piscicultura.

Os itens pedidos se justificam por:

Item 1: Iniciar imediatamente trabalhos de pesquisa na área de alimentação de Tilápias com esterco de suínos e na área de adubação de tanques visando maior produção de plâncton.

Item 2: a- Continuar o trabalho cujo suporte financeiro é fornecido pelo C.N.P.q e há necessidade de obtenção de resultados.
b- Estudar a possibilidade da criação econômica de Tilápias em 2 das 3 represas.

Item 3: Possibilidade de produção anual de até 2000kg de Tilápias nos açudes, utilizando somente esterco de suínos.

Certo de contar com o vosso apoio costumeiro,

ATENCIOSAMENTE,
Alvaro João L. Almeida
Alvaro João L. Almeida
Responsável pelo Setor

APÊNDICE C Parecer favorável da Comissão de Ética no uso de animais


comissão de ética no uso de animais

Título: Avaliação quantitativa e molecular do cruzamento entre as variedades de *Oreochromis niloticus*, *Red Stirling* e *Chitralada*.
Protocolo: 004/2013
Natureza do Pedido: Pesquisa
Área de conhecimento: Genética
Professor responsável: Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

Parecer

Segue abaixo parecer Relatório Parcial de Pesquisa por parte do professor responsável Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf.

1. **Quanto ao preenchimento do protocolo:** As informações estão corretas.
2. **Conclusões finais:** Face ao apresentado, o Relatório Parcial de Pesquisa foi considerado **APROVADO**.

Mogi das Cruzes, 27 de março de 2014.



Prof.^a Maria Santina de Castro Morini
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade de Mogi das Cruzes – UMC

Av. Cândido Xavier de Almeida Souza, 200 – Prédio II – Sala 21-21 - CEP 08780-911 - Mogi das Cruzes - São Paulo - Brasil
Tel./Fax: (011) 4798-7085 e-mail: ceua@umc.br