

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/02/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Seleção de marcadores moleculares em
associação a características de interesse
produtivo no tambaqui (*Colossoma
macropomum*)**

Raquel Belini Ariede

Bióloga

Jaboticabal, São Paulo

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Seleção de marcadores moleculares em
associação a características de interesse
produtivo no tambaqui (*Colossoma
macropomum*)**

Raquel Belini Ariede

Orientador: Dr. Diogo Teruo Hashimoto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Biologia de Organismos Aquáticos, Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2017

Ariede, Raquel Belini
A698s Seleção de marcadores moleculares em associação a características de interesse produtivo no tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Raquel Belini Ariede. -- Jaboticabal, 2017
v, 65 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, 2017

Orientador: Diogo Teruo Hashimoto

Banca examinadora: Fábio Porto-Foresti, Rafael Vilhena Reis Neto

Bibliografia

1. Tambaqui. 2. NGS. 3. Desafio bacteriano. 4. Microssatélites gene-associados. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura da UNESP.

CDU 639.31:636.082


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


Seleção de marcadores moleculares em associação a características de interesse
TÍTULO: produtivo no tabaqui (*Colossoma macropomum*)


AUTORA: RAQUEL BELINI ARIEDE

ORIENTADOR: DIOGO TERUO HASHIMOTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA,
pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO
Centro de Aquicultura - CAUNESP / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. FABIO PORTO FORESTI
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP


Prof. Dr. RAFAEL VILHENA REIS NETO
Coordenadoria de Curso de Pesca / Câmpus de Registro

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2017.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Jefferson e Angela e irmãos,
Jonatas e Rebeca.*

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter cuidado de mim durante este período de mestrado, me dando saúde e colocando pessoas especiais em meu caminho.

Agradeço aos meus pais, meus irmãos e meus cunhados que mesmo de longe me deram forças e confiaram em minha capacidade.

Aos meus avós e família que sempre me incentivaram e oraram por mim.

Ao Prof. Dr. e orientador Diogo Teruo Hashimoto pela oportunidade oferecida, pela paciência e pelos inúmeros aprendizados tanto profissional quanto pessoal, obrigada!

Ao Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti, que inicialmente me aceitou em seu laboratório como aluna de iniciação científica e à Rosangela Zaganini que me ensinou muito do que sei hoje!

A todos do Laboratório LaGeAC, Milena, Milene, Natália, Paulo, Ricardo, Valéria e Vito. Meus agradecimentos por toda colaboração e pelas risadas em dias de experimento.

Ao Prof. Sergio Ricardo Batlouni pela ajuda na reprodução e a Fabiana Pilarski que nos auxiliou no desafio bacteriano.

Aos meus amigos de Bauru, Ariadne, Bruna, Isabel, Pelego, PH, Aline e Livia que não deixaram a distância do dia a dia afetar em nossa amizade e me proporcionaram muitos momentos felizes e nos momentos em que precisei estavam ao meu lado, sou eternamente grata a vocês por isso.

Aos meus amigos de Jaboticabal, Milena, Xina e Thiago, o meu muito obrigada! A vocês que sempre estiveram comigo, me ajudando no projeto de mestrado e pelas inúmeras risadas em momentos de descontração e comilanças.

Muito obrigada a todos vocês!

APOIO FINANCEIRO

A CNPq pela Bolsa de Mestrado, Processo no 130629/2015-4.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO GERAL	7
1.1 Desenvolvimento da aquicultura e produção de tambaqui	7
1.2 Marcadores moleculares e sua aplicação em programas de melhoramento 8	
1.3 Caracterização de marcadores moleculares por sequenciamento de nova geração (<i>Next Generation Sequencing</i> - NGS)	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
MANUSCRITO 1	
Desenvolvimento de marcadores microssatélites utilizando sequenciamento de nova geração para <i>Colossoma macropomum</i>	13
Resumo	14
Abstract	15
1. Introdução	16
2. Material e métodos	18
2.1 Sequenciamento WGS e Bioinformática	18
2.2 Sequenciamento RNA-seq e Bioinformática	19
2.3 Validação e Genotipagem (RNA-seq e WGS).....	20
3. Resultados	22
3.1 <i>Whole Genome Shotgun</i> (WGS).....	22
3.2 RNA-seq	23
4. Discussão	24
5. Conclusão	26
6. Referências Bibliográficas	26
Lista de Figuras	32
Lista de Tabelas	33

MANUSCRITO 2

Caracterização de marcadores microssatélites associados ao crescimento e análise de resistência à <i>Aeromonas hydrophila</i> em tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>.....	38
Resumo	39
Abstract	40
1. Introdução.....	41
2. Material e Métodos	42
2.1 Formação das famílias.....	43
2.2 Experimento de desafio bacteriano com <i>Aeromonas hydrophila</i>	43
2.3 Medições das características de crescimento	44
2.4 Avaliação dos marcadores microssatélites	45
3. Resultados	47
3.1 Análises de variância entre tempo de morte e taxa de mortalidade	47
3.2 Análises Morfométricas.....	47
3.3 Associação dos genótipos com as características de interesse	48
4. Discussão	48
5. Conclusão	51
6. Referências Bibliográficas.....	51
Lista de Figuras	55
Lista de Tabelas	56
3. DISCUSSÃO GERAL.....	59
4. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	60

RESUMO

O Tambaqui (*Colossoma macropomum*), natural das bacias do rio Amazonas e do rio Orinoco, possui características favoráveis ao sistema de cultivo e boa aceitação de mercado. Contudo, há poucos estudos genéticos realizados com esta espécie, especialmente de melhoramento genético. Para a construção de um mapa genético desta espécie, é necessário o desenvolvimento de um elevado número de marcadores moleculares. Desta forma, este estudo teve como objetivo caracterizar microssatélites gene-associados e neutros (não gênicos), obtidos por *Next Generation Sequencing* (RNA-seq e *Whole Genome Shotgun* - WGS, respectivamente), para serem disponibilizados em estudos de associação com QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e construção de um mapa genético. De modo geral, a avaliação de 200 marcadores (100 de cada conjunto) resultou em 45 *loci* polimórficos. Do conjunto de marcadores RNA-seq, as heterozigosidades observada e esperada (H_O e H_E) variaram de 0,09 a 0,73, e 0,09 a 0,85, respectivamente. Do conjunto WGS, H_O e H_E variaram de 0,33 a 0,95, e 0,28 a 0,92, respectivamente. Posteriormente, alguns microssatélites foram testados em três famílias de *C. macropomum* para buscar associações com características de resistência à bactéria e crescimento. Para o estudo de resistência, três famílias ($n = 120$), foram submetidas ao desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila*. Os dados do desafio apresentaram diferenças significativas nos tempos de morte e taxa de mortalidade entre as famílias. O crescimento foi avaliado por medidas morfométricas e peso, sendo que todas as características estavam correlacionadas significativamente ($p < 0,01$). Análises de associação microssatélite/fenótipo sugeriram que o marcador gene-associado c3842 (*tncrc6b*) está associado ao comprimento padrão (CP) e um marcador neutro (r912) com a altura 2 (A2). O presente estudo possibilitou prospectar marcadores moleculares associados com crescimento que poderão ser utilizados na validação de seleção assistida por marcadores em famílias de tambaqui. Em conclusão, estes dados servirão como subsídios biotecnológicos para acelerar o melhoramento genético do tambaqui, que é a principal espécie nativa produzida na América do Sul.

PALAVRAS-CHAVE: tambaqui, NGS, desafio bacteriano, microssatélites gene-associados.

ABSTRACT

Tambaqui (*Colossoma macropomum*), is a fish species of the Amazon and Orinoco rivers, with favorable traits to the production system and market acceptance. However, there are few genetic studies with this species, especially genetic improvement. For the construction of a genetic map of this species, the development of a high number of molecular markers is necessary. Thus, this study aimed to characterize gene-associated and neutral (non-gene) microsatellites obtained by Next Generation Sequencing (RNA-seq and *Whole Genome Shotgun* - WGS, respectively), to be available in association studies with Quantitative Trait Loci (QTLs) and construction of a genetic map. Overall, the evaluation of 200 markers (100 of each set) resulted in 45 polymorphic loci. In the RNA-seq data, the observed and expected heterozygosity (H_o and H_e) ranged from 0.09 to 0.73, and 0.09 to 0.85, respectively. In the WGS data, H_o and H_e ranged from 0.33 to 0.95, and 0.28 to 0.92, respectively. Subsequently, some microsatellites were tested in three families of *C. macropomum* to seek associations with bacterial resistance and growth characteristics. For the resistance study, three families ($n = 120$) were submitted to the bacterial challenge with *Aeromonas hydrophila*. The challenge data presented significant differences in time of death and mortality rate among the families. Growth was evaluated by morphometric measures and weight, and all the characteristics were significantly correlated ($p < 0.01$). Microsatellite/phenotype association analyzes have suggested that the gene-associated marker (*tnrc6b*) is associated with the standard length (CP) and a neutral marker (r912) with height 2 (A2). The present study made it possible to prospect for molecular markers associated with growth that could be used in the validation of marker - assisted selection in tambaqui families. In conclusion, these data will serve as biotechnology subsidies to accelerate the genetic improvement of tambaqui, which is the main native species produced in South America.

KEY-WORDS: tambaqui, NGS, bacterial challenge, microsatellite gene-associated.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Desenvolvimento da aquicultura e produção de tambaqui

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), o desenvolvimento da aquicultura superou o crescimento populacional, resultando na expansão da aquicultura nas últimas três décadas. Em 2014, a produção total da aquicultura foi de 73,8 milhões de toneladas. Destes, 49,8 milhões de toneladas é composta por peixes, e o restante por moluscos, crustáceos e outros animais aquáticos (FAO, 2016). De forma geral, a Ásia foi a que mais contribuiu com a produção de peixes cultivados para consumo humano, e o Brasil encontra-se em 14º lugar na lista dos 25 países que mais contribuíram com a aquicultura mundial (FAO, 2016).

A aquicultura brasileira apresentou expressivo avanço nos últimos anos e, em 2015, segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), atingiu um valor de produção de R\$ 4,39 bilhões, com a maior parte (69,9%) oriunda da criação de peixes, seguida pela criação de camarões (20,6%). A produção total de peixes da piscicultura brasileira foi de 483,24 mil toneladas em 2015, representando um aumento de 1,5% em relação ao ano anterior (IBGE, 2016).

A tilápia (*Oreochromis* spp.) é a espécie mais cultivada (219,33 mil toneladas), representando 45,4% da produção de peixes no Brasil (IBGE, 2016). O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é uma espécie de peixe nativa e ocupa o segundo lugar no *ranking* nacional de produção de peixes (135,86 mil toneladas), com aproximadamente 28% da produção brasileira. Além disso, somando os híbridos produzidos tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) e tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*),

a contribuição de tambaqui na aquicultura chega a representar 173,301 mil toneladas (IBGE, 2016). Como visto, a aquicultura no Brasil tem crescido de forma significativa, evidenciando ainda mais a necessidade de estudos genéticos, tanto para o melhoramento quanto para conhecimento biológico das espécies.

O Brasil dispõe de recursos naturais e uma rica biodiversidade de peixes com potencial para melhoramento genético, do qual aproximadamente 23 espécies nativas de rios brasileiros são utilizadas para aquicultura nacional (IBGE, 2016). A maior parte dos cultivos é feita com espécies exóticas, principalmente a tilápia (Ponzoni *et al.*, 2011), evidenciando a necessidade de programas de melhoramento em espécies nativas do Brasil.

1.2 Marcadores moleculares e sua aplicação em programas de melhoramento

Programas de melhoramento genético são importantes para o desenvolvimento da aquicultura. A taxa de crescimento é uma das características mais visadas em programas de melhoramento, pois como evidenciado em um estudo com tilápia pode-se obter respostas de seleção para crescimento em uma taxa de 10 – 20% por geração (Gjedrem e Thodesen, 2005). Contudo, pesquisas sobre crescimento e genes relacionados em espécies nativas do Brasil são escassos, sendo a maior parte desenvolvida em espécies de países asiáticos (Ma *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2014).

Além do crescimento, outra característica de interesse para a aquicultura é a seleção dos organismos resistentes a doenças (Gjedrem, 2010). A intensificação da produção na piscicultura associado com a elevada densidade de estocagem, ocasiona estresse nos peixes e, com isso, é praticamente inevitável a transferência

de patógenos, como bactérias, viroses, fungos e parasitas (Gjedrem, 2015). Na aquicultura mundial, a infecção por *Aeromonas hydrophila* é responsável por surtos de mortandade e por grandes prejuízos econômicos no setor aquícola e está diretamente associada às modificações nas condições ambientais e aos fatores de estresse no cultivo intensivo, que levam à imunossupressão do sistema imunológico dos peixes e, conseqüente, morte (Esteve *et al.*, 1995; Janda *et al.*, 1996).

Os avanços na pesquisa genômica melhoraram significativamente as ferramentas disponíveis para o estudo de características comercialmente importantes. Os marcadores moleculares são empregados para detectar associações entre genótipo e o fenótipo desejável, indicando a sua localização no genoma e a intensidade com que estes *loci* afetam uma característica (Gutierrez *et al.*, 2015). Estudos de *loci* de características quantitativas (QTLs) são particularmente úteis para compreender o direcionamento de características que são difíceis de medir diretamente sobre os candidatos de seleção (Villanueva *et al.*, 2011; Taylor, 2014). Estudos de marcadores moleculares para associação com características de interesse zootécnico, têm merecido destaque em diversas espécies de peixes (Korol *et al.*, 2007), mas ainda não foram aplicados para espécies nativas do Brasil.

A capacidade de determinar as regiões que afetam características economicamente importantes levou à implementação de programas de seleção baseados na identificação de animais com genótipos favoráveis (Gutierrez *et al.*, 2015). Com a identificação de um QTL, é possível realizar a seleção assistida por marcadores (MAS), a qual permite selecionar indivíduos que possuem determinadas características de interesse (Korol *et al.*, 2007; Goddard e Hayes,

2009). Na aquicultura a seleção assistida por marcadores pode ser uma ferramenta valiosa para os programas de seleção, melhorando a precisão da seleção e, por conseguinte, o ganho genético (Sonesson, 2007). Os investimentos em programas de melhoramento são únicos, porque os ganhos genéticos obtidos em tais programas são cumulativos (Weller, 2006). A genética quantitativa e a reprodução seletiva representam um campo recente da ciência, e esta técnica no setor aquícola está em fase inicial em comparação com as indústrias de plantas e outros animais cultivados (Gjedrem, 2012). A herdabilidade relativamente alta para características economicamente importantes em peixe e crustáceos, combinada com alta fecundidade e intervalos de geração curtos (1-4 anos) na maioria das espécies, explica os altos ganhos genéticos obtidos em muitos programas de aquicultura (Gjedrem, 2012).

1.3 Caracterização de marcadores moleculares por sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS)

Entre os marcadores moleculares, os microsatélites são um dos marcadores mais utilizados em estudos de genética de peixes. Os microsatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), são elementos repetitivos, formados por arranjos de repetições em *tandem*, de dois a seis nucleotídeos de comprimento e estão entre os locos mais polimórficos dos genomas (Ferguson *et al.*, 1995; Milach, 1998; Matioli, 2001). O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do número dos elementos repetidos, provavelmente devido aos erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA (Studart, 2001), demonstrando altos níveis de polimorfismo alélico (Oliveira *et al.*, 2006). Devido ao alto polimorfismo e

codominância, os marcadores microssatélites foram os mais utilizados nos últimos anos em estudos de peixes (Liu *et al.*, 2008).

Considerando os avanços biotecnológicos e genéticos, a prospecção e desenvolvimento de marcadores estão cada vez mais acessíveis, de modo a contribuir para o conhecimento biológico e genético de muitas espécies aquáticas. Atualmente, o NGS possibilita a descoberta de milhões de marcadores moleculares, que podem estar associados a características de interesse econômico, como crescimento e resistência a doenças, com maior rapidez e baixo custo (Davey *et al.*, 2011). Uma das estratégias utilizada é o *Whole Genome Shotgun* (WGS), que consiste no sequenciamento aleatório do DNA genômico, para prospecção de marcadores neutros frequentemente utilizado em genomas de peixes (Carvalho *et al.*, 2011; Carvalho e Beheregaray, 2011). O sequenciamento do transcriptoma é outra estratégia para a descoberta de genes, e pode ser utilizada em espécies cujo genoma ainda não está disponível (Grabherr *et al.*, 2011). Esta metodologia tem demonstrado ser muito eficaz para identificação de microssatélites gene-associados em peixes (Ji *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2013; Gross *et al.*, 2013). Análises feitas em peixes, com marcadores obtidos do transcriptoma, tem demonstrado êxito na busca de associações entre marcadores moleculares e características de interesse, como crescimento, resposta imune e diferenciação das gônadas (Ma *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS