

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 02/03/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Integração de métodos genômicos para seleção
de genótipos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)
resistentes à bactéria *Aeromonas hydrophila***

Vito Antonio Mastrochirico Filho

Jaboticabal
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Integração de métodos genômicos para seleção
de genótipos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)
resistentes à bactéria *Aeromonas hydrophila***

Vito Antonio Mastrochirico Filho

Orientador: Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Jaboticabal
2020

M423i	Mastrochirico Filho, Vito Antonio Integração de métodos genômicos para seleção de genótipos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) resistentes à bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i> / Vito Antonio Mastrochirico Filho. -- Jaboticabal, 2020 115 f. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Diogo Teruo Hashimoto 1. Peixe Doenças. 2. Genética animal. 3. Alinhamento de sequências (Bioinformática). 4. Melhoramento genético. 5. Expressão gênica. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

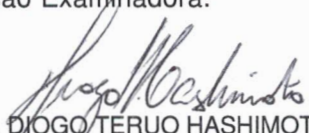
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Integração de métodos genômicos para seleção de genótipos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) resistentes à bactéria *Aeromonas hydrophila*

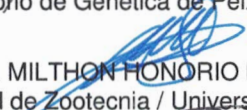
AUTOR: VITO ANTONIO MASTROCHIRICO FILHO

ORIENTADOR: DIOGO TERUO HASHIMOTO

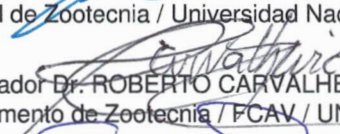
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO

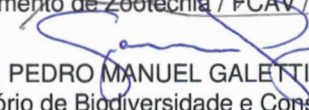
Laboratório de Genética de Peixes / Centro de Aquicultura - CAUNESP, Jaboticabal-SP


Prof. Dr. MILTHON HONÓRIO MUÑOZ BERROCAL

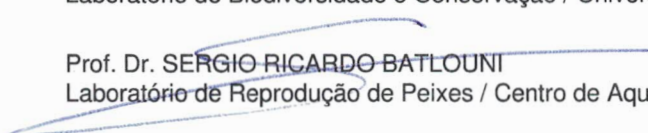
Facultad de Zootecnia / Universidad Nacional Agraria de la Selva, UNAS, Tingo María-Peru


Pesquisador Dr. ROBERTO CARVALHEIRO

Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. PEDRO MANUEL GALETTI JUNIOR

Laboratório de Biodiversidade e Conservação / Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos-SP


Prof. Dr. SÉRGIO RICARDO BATLOUNI

Laboratório de Reprodução de Peixes / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP, Jaboticabal-SP

Jaboticabal, 02 de março de 2020

Apoio Financeiro

Agradeço à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio das bolsas de estudo concedidas (Proc. FAPESP 2016/18294-9, período: 01/12/2016 a 31/12/2019; Proc. FAPESP 2017/26900-9, período: 15/02/2018 a 14/12/2018)

Agradeço ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio concebido (Proc. CNPq 140740/2016-3), como bolsa de estudos inicial com período de vigência de 03/2016 a 11/2016.

Agradecimentos

Essa tese de Doutorado é somente dedicada à Deus, à minha família, ao meu orientador e todos que contribuíram positivamente (seja como for) nesta etapa da minha vida. Dedico também esta tese aos simples de coração e à natureza.

Sumário

Resumo Geral	7
General Abstract	8
Introdução Geral	9
CAPÍTULO 1	28
Genetic parameters for resistance to <i>Aeromonas hydrophila</i> in the Neotropical fish pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	28
Abstract	29
1. Introduction	30
2. Material and Methods	33
3. Results	Destino não encontrado!
4. Discussion	42
5. Author contributions	45
6. Funding	45
7. References	45
CAPÍTULO 2	51
Development of a SNP linkage map and genome-wide association study for resistance to <i>Aeromonas hydrophila</i> in pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	51
Abstract	52
Background	53
Results	55
Discussion	64
Conclusion	68
Methods	69
References	77
CAPÍTULO 3	82
Transcriptome profiling of pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) challenged with pathogenic <i>Aeromonas hydrophila</i>: inference on immune gene response	82
1. Introduction	84
2. Methods	86
2.1. Ethic Statement	86
2.2. Generation of pacu families	87
2.3. Experimental challenge by <i>Aeromonas hydrophila</i>	87
2.4. Tissue Collection, RNA Isolation and Sequencing	90
2.5. Data Processing and Analysis	92

3. Results	93
3.1. Disease challenge experiment	93
3.2. Sequencing and de novo Assembly	94
3.3. Gene annotation	95
5. Discussion	103
5.1. Cytokines and signaling	104
4.2. Phagocytosis	104
4.3. Pattern recognition receptors	105
4.4. Complement system	105
6. Conclusion	106
7. Author Contributions	107
8. Funding	108
9. References	108
Conclusão Geral	114

Resumo Geral

O pacu *Piaractus mesopotamicus* é considerado uma das mais importantes espécies de peixe cultivadas no Brasil. Apesar desta representatividade, esta espécie possui poucas informações genéticas disponíveis, principalmente em relação à resistência às enfermidades. A infecção por *Aeromonas hydrophila* é responsável por grandes prejuízos econômicos na produção de pacu. Experimentos de desafio, baseados em testes de sobrevivência por exposição dos organismos a patógenos específicos, têm sido realizados para buscar estimativas confiáveis para seleção de famílias geneticamente resistentes às enfermidades. Portanto, os principais objetivos deste estudo foram: 1) avaliar a herdabilidade de resistência do pacu à infecção por *A. hydrophila*; 2) caracterizar a arquitetura genética com a identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) relacionados com resistência à *A. hydrophila*, por meio de sequenciamento/genotipagem de SNPs (RAD-Seq, *restriction site associated DNA sequencing*); 3) caracterizar genes do sistema imune, por meio de sequenciamento RNA-Seq, de indivíduos de pacu submetidos ao desafio de resistência à *A. hydrophila*. Moderados valores de herdabilidade foram encontrados para sobrevivência e tempo de morte, indicando que a resistência contra *A. hydrophila* em pacu pode ser melhorada por programas de melhoramento genético. 17.453 SNPs foram identificados pela técnica RAD-Seq, para investigar a arquitetura genética da resistência à infecção por *A. hydrophila* pelo estudo de associação genômica ampla (GWAS), e identificar loci associados à característica de resposta imune. Um mapa de ligação foi construído com 27 grupos de ligação (GLs). O comprimento dos grupos de ligação variou de 79,95 (GL 14) a 137,01 (GL 1) cM com um comprimento total de 2.755,60 cM. 22 QTLs em 17 GLs associados com resistência à *A. hydrophila* sugeriram uma arquitetura de resistência poligênica afetada por múltiplos loci com pequena variância genética aditiva. Com relação às análises de RNA-Seq, 57 genes pertencentes sistema imune do pacu foram significativamente expressos durante o período crítico da infecção, enquanto que 23 genes foram significativamente expressos quando a mortalidade atingiu o *plateau*. A prática de integração de métodos genômicos para aplicação de programas de melhoramento genético abordando a resistência do pacu à infecção por *A. hydrophila* é fundamental para acelerar a produção aquícola nacional de maneira sustentável.

General Abstract

Pacu *Piaractus mesopotamicus* is considered one of the most important cultivated fish species from Brazil. Despite this representativeness, few genetic information is available for *P. mesopotamicus*, especially regarding disease resistance. *Aeromonas hydrophila* infection is responsible for major economic losses in *P. mesopotamicus* production. Challenge experiments have been performed to evaluate reliable estimates on selection of families genetically resistant to diseases. Therefore, the main objectives of this study were: 1) evaluate the resistance heritability in 36 *P. mesopotamicus* families subjected to *A. hydrophila* challenge; 2) characterize the genetic architecture identifying QTLs (Quantitative Trait Loci) related to *A. hydrophila* resistance by SNP sequencing / genotyping; 3) characterize genes belonging to immune system of individuals submitted to the disease resistance challenge, by transcriptome analysis (RNA-Seq). Moderate heritability values were found for survival rate and time of death, indicating that resistance against *A. hydrophila* in *P. mesopotamicus* can be improved by breeding programs. 17,453 SNPs were identified by RAD-Seq technique to investigate the genetic architecture of resistance to *A. hydrophila*. When a linkage map was constructed, the length of linkage groups (27 linkage groups) varied from 79.95 (LG 14) to 137.01 (LG 1) cM, with a total integrated map length of 2,755.60 cM. 22 QTLs in 17 LGs associated with *A. hydrophila* resistance suggested a polygenic resistance architecture affected by multiple loci with small additive genetic variance. With respect to RNA-Seq analyzes, 57 genes belonging to the pacu immune system were significantly expressed during the critical period of infection, while 23 genes were significantly expressed when mortality reached the plateau. The practice of integrating genomic methods for the application of breeding programs addressing pacu resistance to *A. hydrophila* infection is essential to accelerate national aquaculture production in a sustainable manner.

Introdução Geral

1.1. Aspectos gerais

A demanda global por proteínas derivadas de pescado tem aumentado ao longo das últimas décadas, principalmente devido ao crescimento populacional e da preferência por alimentos saudáveis (Bacher, 2015). De acordo com os últimos relatório da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2014; 2018), os índices globais de captura pela pesca predatória atingiram um dos maiores valores já registrados em 2012 (91,3 milhões de toneladas), com uma pequena queda registrada em 2016 (90,9 milhões de toneladas). Portanto, os principais estoques de peixes têm sido explorados pela pesca em níveis considerados insustentáveis e, por esta razão, uma tendência de redução de produção de pescado tem sido observada.

No contexto da sobreexploração de espécies exercida pela pesca, a aquicultura terá que suprir a maior parte do aumento na demanda por pescado. Esta importância da aquicultura ocorre em um momento em que o mundo se tornou mais consciente sobre questões ambientais, e consumidores passaram a exigir produtos de procedência sustentável (Bacher, 2015).

De acordo com as últimas estatísticas disponíveis, em 2016, a produção de peixes pela aquicultura apresentou rápido crescimento e já representa 46,8% da produção total mundial de pescado, com uma participação cada vez mais crescente da América do Sul, e principalmente do Brasil, no cenário da aquicultura mundial (FAO, 2018).

No Brasil, a partir da década de 2000, a aquicultura passou a ser alvo de investimentos privados e ações do próprio Governo Federal. Como resultado, a piscicultura brasileira registrou um expressivo incremento de sua produção de 170 mil

toneladas em 2002 (FAO, 2004) para uma produção total de 485,2 mil toneladas em 2017 (IBGE, 2017), o que mostra que o Brasil tem melhorado a sua posição global de produção nos últimos anos (FAO, 2018). Desta forma, há um crescente interesse pelo aumento da produção de pescado no Brasil, com a utilização de peixes de melhor qualidade, juntamente com o desenvolvimento de pacotes tecnológicos direcionados para o crescimento da produção de peixes nativos. O que mostra a necessidade que programas de melhoramento e manejo genético sejam colocados em prática.

Programas de melhoramento genético são cruciais para o desenvolvimento da aquicultura, não só como objetivo de aumentar o desempenho produtivo das espécies cultivadas, mas também melhorar os organismos cultivados em relação à resistência a doenças (Gjedrem, 1997). Atualmente, já foram realizados vários experimentos de seleção em larga escala para aumentar a taxa de crescimento, resultando em ganhos de 10-20% (média de 12,5%) por geração (Gjedrem *et al.*, 2012). Porém, para o desenvolvimento de uma produção sustentável deve-se levar em consideração a seleção dos organismos com melhor eficiência imunológica (Olesen *et al.*, 2000; Gonen *et al.*, 2015; Evenhuis *et al.*, 2015).

Piscicultores têm selecionado peixes por apenas algumas décadas, sendo que a maioria da produção aquícola é baseada em unidades geneticamente não tratadas (Gjedrem *et al.*, 2012). Ainda existem vários entraves para que o melhoramento genético baseado na seleção seja amplamente difundido para as principais espécies da aquicultura, como insuficiente conhecimento genético de espécies e programas de melhoramento, além da captura regular de espécimes selvagens para reposição de matrizes reprodutoras (Gjedrem *et al.*, 2012). O Brasil apresenta excelentes recursos naturais e uma rica biodiversidade de peixes com potencial para melhoramento genético, sendo que aproximadamente 40 espécies nativas de rios brasileiros são

utilizadas para aquicultura nacional (Godinho, 2007). Entretanto, a maioria dos cultivos no Brasil é realizada com espécies exóticas de outros países. Este panorama é surpreendente e revela a carência por projetos de melhoramento e inovação genética com enfoque nas espécies nativas do Brasil.

A tilápia GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), uma linhagem de espécie exótica que sofreu um processo de seleção genética, tem ganhado cada vez mais espaço no mercado nacional. O projeto GIFT demonstrou o uso da reprodução seletiva para melhorar o desempenho da produção da tilápia do Nilo (Ponzoni *et al.*, 2011), pois após cinco gerações, o desempenho de crescimento da GIFT resultou em ganhos na ordem superior a 80% (WorldFish Center, 2004). Isto demonstra que são necessários investimentos em projetos de melhoramento genético nacional, para que as espécies nativas também possam suprir a demanda de pescado com qualidade.

5. Conclusion

Transcriptome analysis by RNA-seq allowed the identification and comparative quantification of gene expression in pacu infected by *A. hydrophila*. *De novo* liver transcriptome assembled in this study enables capturing expression levels of specific transcripts associated with important immune pathways, such as the coagulation factor and complement system cascades. Using this transcriptome, we have described

for the first time the response of pacu infected by *A. hydrophila* in two critical periods of infection (PM and HM) comparing individuals belonging two distinct groups based on different phases of bacterial infection (acute mortality and plateau of mortality). To our knowledge this is the first descriptive study on transcriptome analysis of infected pacu that may serve as a reference to understand the genetic mechanisms underlying the host-pathogen interaction. The differences in the transcriptomic responses to a standardized *A. hydrophila* challenge was able to provide a initial data set to begin to understand the impact of selective breeding on genetic basis of disease resistance. Therefore, further studies trying to connect the genomic and genetic basis of resistance to *A. hydrophila* are fundamental to enable the implementation of *A. hydrophila* resistance into pacu breeding programs. Despite these limitations, these results may suggest possible suppression of genes belonging to the immune system that may contribute to susceptibility to infection, as for example genes related with complement system and coagulation factor cascades. Such suppression of important immune system genes will serve as subsidies for future studies aiming at the use of prophylactic and immunostimulating treatments that could increase the pacu resistance when exposed to infectious outbreaks of *A. hydrophila*.

6. Author Contributions

Conceptualization: VM and DH; Formal analysis: VM, DR, RH, DH; Funding acquisition: VM and DH; Investigation: VM, MH, RK, MF, RA and DP; Methodology: VM, MH, RK, MF, RA and DP; Project administration: DH; Supervision: DH, DR and RH; Roles/Writing – original draft: VM and DH; Writing – review & editing: VM, MH, RH, MF, RA, DP, DR, RH and DH.

7. Funding

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP grant 2016/21011-9, 2017/26900-9, and 2016/18294-9), Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (International Call FAPESP-CONICYT 2018/08416-5), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq grant 311559/2018-2), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES - Finance Code 001), and BBSRC Institute Strategic Program Grants (BB/P013759/1 and BB/P013740/1). No potential conflict of interest was reported by the authors.

8. References

- Abdelhamed, H., Ibrahim, I., Baumgartner, W., Lawrence, M. L., Karsi, A. (2017). Characterization of histopathological and ultrastructural changes in channel catfish experimentally infected with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Front. Microbiol.* 8(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01519>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556.Gene>
- Belém-Costa, A., Cyrino, J. E. P. (2006). Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Sci. Agric.* 63(3), 281–284. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162006000300011>

- Benavides, M.V., Maciel, P.O. (2015). Melhoramento de espécies aquícolas com foco na resistência a doenças. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura.
- Bird, S., Tafalla, C. (2015). Teleost Chemokines and Their Receptors. *Biology* 4(4), 756–784. <https://doi.org/10.3390/biology4040756>
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* 34(5), 525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., Lee, T. J., Leigh, N. D., Kuo, T., Davis, F. G., Bateman, J., Bryant, S., Guzikowski, A. R., Tsai, S. L., Coyne, S., Ye, W. W., Freeman, R. M., Peshkin, L., Tabin, C. J., Regev, A., Haas, B. J., White, J. L. (2017). A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Rep.* 18(3), 762–776. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.063>
- Carraschi, S. P., Cruz, C., Neto, J., G., M., Moraes, F., R., Júnior, O., D., R., Neto, A., N., Bortoluzzi, N., L. (2012). Evaluation of experimental infection with *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Holmberg, 1887). *Int. J. Fish. Aquac.* 4(5), 81–84. <https://doi.org/10.5897/IJFA11.008>
- Chaudhry, H., Zhou, J., Zhong, Y., Ali, M. M., McGuire, F., Nagarkatti, P. S., Nagarkatti, M. (2015). Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *In Vivo* 27(6), 669–684. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378830/>
- Cipriano, R. C., Bullock, G. L., Pyle, S. W. (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Fish disease leaflet. Washington: U.S. Fish and Wildlife Service.
- Dang, Y., Xu, X., Shen, Y., Hu, M., Zhang, M., Li, L., Lv, L., Li, J. (2016). Transcriptome analysis of the innate immunity-related complement system in spleen tissue of *Ctenopharyngodon idella* infected with *Aeromonas hydrophila*. *PLoS ONE* 11(7), e0157413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157413>
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. Rome: FAO.
- Farias, T. H. V., Levy-Pereira, N., Alves, L. de O., Dias, D. de C., Tachibana, L., Pilarski, F., Belo, M. A. de A., Ranzani-Paiva, M. J. T. (2016). Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. *Anim. Feed Sci. Tech.* 211, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.11.004>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., et al. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a

- pangenome. Nat. Biotechnol. 29(7), 644–652.
-
- <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R. D., Friedman, N., Regev, A. (2014). *De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity*. Nat Protoc. 8(8). <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- IBGE. (2016). Produção da pecuária municipal v. 44. Rio de Janeiro: IBGE
- Jiang, N., Fan, Y., Zhou, Y., Wang, W., Ma, J., Zeng, L. (2018). Transcriptome analysis of *Aeromonas hydrophila* infected hybrid sturgeon (*Huso dauricus* × *Acipenser schrenckii*). Sci. Rep. 8(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36376-2>
- Jiang, H., Wang, M., Fu, L., Zhong, L., Liu, G., Zheng, Y., Chen, X., W. (2020). Liver transcriptome analysis and cortisol immune-response modulation in lipopolysaccharide-stimulated in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Fish Shellfish Immun. 101(March), 19–50. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.024>
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., Tanabe, M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic Acids Res. 40(D1), 109–114. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>
- Kumar, R., Sahoo, P. K., Barat, A. (2017). Transcriptome profiling and expression analysis of immune responsive genes in the liver of Golden mahseer (*Tor putitora*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immun. 67, 655–666. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.053>
- Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., Saksida, S. M. (2015). Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. Ann. Rev. Mar. Sci. 7(1), 471–496. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
- Langmead, B., Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat. Methods 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Li, W., Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics 22(13), 1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Maekawa, S., Wang, P. C., Chen, S. C. (2019). Comparative Study of Immune Reaction Against Bacterial Infection from Transcriptome Analysis. Front. Immunol. 10(February), 153. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00153>

- Mahapatra, K. Das, Gjerde, B., Sahoo, P. K., Saha, J. N., Barat, A., Sahoo, M., Mohanty, B.R., Ødegard, J., Rye, M., Salte, R. (2008). Genetic variations in survival of rohu carp (*Labeo rohita*, Hamilton) after *Aeromonas hydrophila* infection in challenge tests. *Aquaculture* 279, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.054>
- Marancik, D., Gao, G., Paneru, B., Ma, H., Hernandez, A. G., Salem, M., Yao, J., Palti, Y., Wiens, G. D. (2015). Whole-body transcriptome of selectively bred, resistant-, control-, and susceptible-line rainbow trout following experimental challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Front. Genet.* 5(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00453>
- Mastrochirico-Filho, V. A., Ariede, R. B., Freitas, M. V., Lira, L. V. G., Agudelo, J. F. G., Pilarski, F., Neto, R. V. R., Yáñez, J. M., Hashimoto, D. T. (2019). Genetic parameters for resistance to *Aeromonas hydrophila* in the Neotropical fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 513(August), 734442. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734442>
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., Roumenina, L. T. (2015). Complement system part II: role in immunity. *Front. Immunol.* 6:257, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>
- Ødegård, J., Olesen, I., Dixon, P., Jeney, Z., Nielsen, H. M., Way, K., Joiner, C., Jeney, G., Ardó, L., Rónyai, A., Gjerde, B. (2010). Genetic analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) strains. II: Resistance to koi herpesvirus and *Aeromonas hydrophila* and their relationship with pond survival. *Aquaculture* 304(1–4), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.017>
- Owens, L. (2019). “Disease principles”, in *Aquaculture: Farming aquatic animals and plants*, 3rd Edition, eds. J. S. Lucas, P. C. Southgate, C. S. Tucker (Chichester: Wiley-Blackwell), 203-216
- Pimentel, J. da S. M., Carmo, A. O. do, Maciel, D. de C. L., Siqueira, F. de F., Kalapothakis, E. (2014). Complete mitochondrial genome sequence of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Mitochondrial DNA* 1736, 1–2. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.971297>
- Polinski, M. P., Bradshaw, J. C., Inkpen, S. M., Richard, J., Fritsvold, C., Poppe, T. T., Rise, M. L., Garver, K. A., Johnson, S. C. (2016). De novo assembly of Sockeye salmon kidney transcriptomes reveal a limited early response to piscine reovirus with or without infectious hematopoietic necrosis virus superinfection. *BMC Genomics*, 17(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3196-y>
- Powell, S., Szklarczyk, D., Trachana, K., Roth, A., Kuhn, M., Muller, J., et al. (2012). eggNOG v3.0: Orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. *Nucleic Acids Res.* 40(D1), 284–289. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1060>
- Qin, C., Gong, Q., Wen, Z., Yuan, D., Shao, T., Wang, J., Li, H. (2017). Transcriptome analysis of the spleen of the darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachellii* in response

- to *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immun.* 70, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.042>
- Rebl, A., Goldammer, T. (2018). Under control: The innate immunity of fish from the inhibitors' perspective. *Fish Shellfish Immun.* 77(February), 328–349. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.016>
- Shan, S. J., Liu, D. Z., Wang, L., Zhu, Y. Y., Zhang, F. M., Li, T., An, L. G., Yang, G. W. (2015). Identification and expression analysis of *irak1* gene in common carp *Cyprinus carpio* L.: indications for a role of antibacterial and antiviral immunity. *J. Fish Biol.* 87, 241–255. <https://doi.org/10.1111/jfb.12714>
- Silva, B. C., Mourinho, J. L. P., Vieira, F. N., Jatobá, A., Seiffert, W. Q., Martins, M. L. (2012). Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*×*Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquac. Res.* 43(6), 908–916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02905.x>
- Smith-Unna, R., Bournsnel, C., Patro, R., Hibberd, J. M., Kelly, S. (2016). TransRate: reference free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Res.* 26(8), 021626. <https://doi.org/10.1101/gr.196469.115>
- Song, X., Hu, X., Sun, B., Bo, Y., Wu, K., Xiao, L., Gong, C. (2017). A transcriptome analysis focusing on inflammation-related genes of grass carp intestines following infection with *Aeromonas hydrophila*. *Sci. Rep.* 7(January), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep40777>
- Stentiford, G. D., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., Williams, B. A. P., Withyachumnarnkul, B., Itsathitphaisarn, O., Bass, D. (2017). New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. *PLoS Pathogens* 13(2), 1–6. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>
- Stratev, D., Odeyemi, O. A. (2017). An overview of motile *Aeromonas* septicaemia management. *Aquac. Int.* 25(3), 1095–1105. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0100-3>
- Sudhagar, A., Kumar, G., El-Matbouli, M. (2018). Transcriptome analysis based on RNA-Seq in understanding pathogenic mechanisms of diseases and the immune system of fish: A comprehensive review. *Int. J. Mol. Sci.* 19(1), 245. <https://doi.org/10.3390/ijms19010245>
- Tort L, Balasch J.C, M. S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptative responses. *Inmunologia* 22(3), 277–286. <http://www.inmunologia.org/Upload/Articles/6/0/602.pdf>
- Tran, N. T., Gao, Z., Zhao, H., Yi, S., Chen, B., Zhao, Y., Lin, L., Liu, X., Wang, W. (2015). Transcriptome analysis and microsatellite discovery in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) after challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immun.* 45(1), 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.034>
- Wang, R., Sun, L., Bao, L., Zhang, J., Jiang, Y., Yao, J., Song, L., Feng, J., Liu, S., Liu, Z. (2013). Bulk segregant RNA-seq reveals expression and positional candidate

genes and allele-specific expression for disease resistance against enteric septicemia of catfish. BMC Genomics 14(1), 929. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-929>

Woynárovich, A., Van Anrooy, R. (2019). Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 624. Rome: FAO.

Xiong, X., Chen, Y., Liu, L., Wang, W., Robinson, N.A., Gao, Z. (2017). Estimation of genetic parameters for resistance to *Aeromonas hydrophila* in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). Aquaculture 479, 768–773. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.011>

Yang, W., Li, N., Li, M., Zhang, D., An, G. (2016). Complete Genome Sequence of Fish Pathogen *Aeromonas hydrophila* JBN2301. Genome Announc. 4(1), 16–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01615-15.Copyright>

Zanuzzo, F. S., Sabioni, R. E., Montoya, L. N. F., Favero, G., Urbinati, E. C. (2017). *Aloe vera* enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. Fish Shellfish Immun. 65, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.013>

Conclusão Geral

No Brasil, a aquicultura passou a ser reconhecida como uma atividade potencialmente lucrativa, e uma alternativa importante para a produção de alimentos de alto valor nutricional. A atividade passou então a ser alvo de pesquisas científicas com o objetivo de acelerar a produção de espécies de peixes em escala industrial. Portanto, a pesquisa proposta teve como objetivo fornecer subsídios para o desenvolvimento da produção de uma das principais espécies de peixes cultivadas no Brasil através da implementação de programas de melhoramento genético, para assim promover o desenvolvimento da aquicultura de peixes nativos com medidas menos impactantes e com o uso cada vez menor de recursos.

Até o momento da presente tese, estudos direcionados para obtenção de subsídios genéticos para o pacu ainda não são suficientes para a implantação de técnicas eficientes de melhoramento genético direcionados para a resistência contra uma das principais causas de mortalidades de estoques produtivos da espécie. Portanto, a pesquisa proposta espera contribuir com dados moleculares que serão fundamentais para acelerar o desenvolvimento da aquicultura do pacu no Brasil através do desenvolvimento de linhagens mais resistentes à infecção.

É esperado que o presente trabalho contribua para um melhor entendimento sobre questões relacionadas à herdabilidade e arquitetura genética de resistência, além de uma melhor compreensão sobre o funcionamento do mecanismo de resposta imune do pacu contra a infecção por *A. hydrophila*, para assim identificar e avaliar o papel de marcadores moleculares SNP em regiões genômicas envolvidas no processo de regulação do processo de defesa contra este organismo patogênico. Sendo assim, o trabalho espera identificar SNPs exclusivos em famílias de pacu que possam contribuir,

através de mecanismos de expressão ou inibição de genes associados ao sistema imune, na resistência ou susceptibilidade quando submetidas à infecção bacteriana.

Desta maneira, é fundamental que estas práticas sejam aplicadas rapidamente para espécies nativas do Brasil, em especial o pacu, pois permitirá acelerar a produção aquícola nacional, além de aumentar a produtividade piscícola de maneira mais sustentável. Além disso, de forma prática e aplicada, os resultados da análise genética por marcadores SNPs permitirão identificar regiões relacionadas à resistência a doenças, com o objetivo de direcionar programas de melhoramento genético por seleção genômica, a fim de evitar problemas decorrentes da perda de produção por infecção de uma das bactérias que mais causam prejuízos para a aquicultura mundial.