

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/10/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Avaliação de parâmetros genéticos para
resistência à *Streptococcus agalactiae* e
correlação com o ganho de peso na fase
juvenil em tilápia (*Oreochromis niloticus*)**

Rubens Ricardo de Oliveira Neto

Médico Veterinário

JABOTICABAL -SP
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Avaliação de parâmetros genéticos para
resistência à *Streptococcus agalactiae* e
correlação com o ganho de peso na fase
juvenil em tilápia (*Oreochromis niloticus*)**

Rubens Ricardo de Oliveira Neto

Orientador: Dr. Diogo Teruo Hashimoto

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

JABOTICABAL -SP
2021

Oliveira Neto, Rubens Ricardo

O48a Avaliação de parâmetros genéticos para resistência à *Streptococcus agalactiae* e a correlação com o ganho de peso na fase juvenil em tilápia (*Oreochromis niloticus*) / Rubens Ricardo de Oliveira Neto. -- Jaboticabal, 2021
iii, 39 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2021

Orientador: Dr. Diogo Teruo Hashimoto
Banca examinadora: Dr. José Manuel Yáñez, Rafael Vilhena Reis Neto
Bibliografia

1. Melhoramento genético. 2. Resistência a doenças. 3. Herdabilidade. 4. Correlação genética. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Centro de Aqüicultura da Unesp - CAUNESP



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação de parâmetros genéticos para resistência à *Streptococcus agalactiae* (sorotipo 1b) em tilápia (*Oreochromis niloticus*)

AUTOR: RUBENS RICARDO DE OLIVEIRA NETO

ORIENTADOR: DIOGO TERUO HASHIMOTO

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

Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO (Participação Virtual)

. / Centro de Aqüicultura da UNESP

Prof. Dr. RAFAEL VILHENA REIS NETO (Participação Virtual)

Curso de Engenharia de Pesca / UNESP, Câmpus de Registro, Registro-SP

PhD. JOSÉ MANUEL YÁÑEZ LÓPEZ (Participação Virtual)

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Universidad del Chile (Santiago)

Jaboticabal, 02 de agosto de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força durante esses anos e pela oportunidade de aprender e trabalhar com que tanto amo que é a genética, de conhecer e compartilhar com pessoas cujo conhecimento é inspirador, além de ter a experiência de estudar e fazer parte de um centro de pesquisa e universidade tão importantes.

Aos pais e meus sogros que sempre me ajudaram e me apoiaram. Muito obrigado por tudo.

A minha namorada o que se esforçou para que eu pudesse caminhar em busca dos meus sonhos. Muito obrigado por tudo

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto, pela confiança, ajuda e apoio durante o desenvolvimento do trabalho. Muito obrigado por tudo.

A todos os meus amigos e colegas do LaGeAC. Muito obrigado pela ajuda e apoio prestado.

A todos os amigos e colegas do LAPOA. Muito obrigado pela ajuda e apoio prestado.

A Prof. Dr. Fabiana Pilarski por ceder o laboratório para análises de microbiologia. Muito obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Rafael Vilhena Reis Neto, muito obrigado pelas sugestões e ajuda nas análises estatísticas. Muito obrigado por tudo.

A CAPES pelo apoio financeiro e concessão da bolsa para desenvolver o projeto, sem essa ajuda, seria impossível realizar este estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao apoio financeiro da FAPESP Processo 2019/23029-0.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos do CAUNESP (funcionários e alunos). Muito obrigado por tudo

As pisciculturas que colaboraram com as informações, coleta de ovos e amostras. Muito obrigado pela colaboração.

Muito obrigado a todos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ganho médio diário (ADG) em gramas de uma população de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) (barras verdes) durante 60dias.	43
Figura 2 – curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para as três piores e melhores famílias durante o desafio experimental com <i>Streptococcus agalactiae</i> em Tilápia do Nilo.....	43
Figura 3 – Estado de sobrevivência (%) (barras verdes) usando ponto de corte (5 dias após a inoculação), e tempo médio de morte (dias) (barras cor-de-rosa) para as famílias de tilápia do Nilo infectadas com <i>Streptococcus agalactiae</i> Ib e ST-NT.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Correlações fenotípicas e genéticas (abaixo e acima da diagonal, respectivamente) entre estado de sobrevivência (SS), tempo de morte (TD) e ganho médio diário (ADG); heritabilidade (h^2) (diagonal principal) para resistência contra <i>Streptococcus agalactiae</i> estimado a partir de uma população de reprodução de <i>Oreochromis niloticus</i> . Erro padrão a frente dos valores de herdabilidade e correlações.....	44
--	----

Sumário

1. Introdução geral	4
1.1 Aspectos gerais	4
1.2 Tilápia no Brasil e melhoramento genético	4
1.2.1 Melhoramento genético de tilápia com enfoque para resistência a doenças	6
1.3 Aspectos gerais de <i>Streptococcus agalactiae</i>	8
1.4 Referências	11
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3. Atividades desenvolvidas	18
3.1 Capítulo 1	19
3.1.1 INTRODUCTION	20
3.1.2 MATERIALS AND METHODS	22
3.1.3 RESULTS	29
3.1.4 DISCUSSION	31
3.1.5 REFERENCES	34

RESUMO

A Tilápia do Nilo é uma das principais espécies de produção de aquicultura continental, sendo o principal peixe cultivados no Brasil. Surtos de estreptococose, associados a infecção por *Streptococcus agalactiae*, têm sido relatados em fazendas comerciais de peixes em todo o mundo e na maioria das vezes causam altas taxas de mortalidade. *Streptococcus agalactiae* é uma bactéria gram-positiva que possui diferentes sorotipos (diferenciados pela especificidade dos polissacarídeos capsulares), além de diferentes variantes genéticas, que podem ser restritas de acordo com a região geográfica. Por essa razão, as vacinas não são totalmente eficazes, enquanto o melhoramento genético é uma alternativa viável e sustentável para produzir animais resistentes a esta bactéria. O objetivo deste estudo foi realizar um desafio experimental contra *S. agalactiae* (sorotipo Ib, tipo de sequência não tipável), usando uma cepa circulante em pisciculturas da região Centro-Sudeste no Brasil, para estimar componentes de variância genética e herdabilidade para resistência em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de uma população experimental do Brasil. Além disso, estimar os parâmetros genéticos para o ganho de peso na fase juvenil a partir de um desafio de crescimento com duração de 60 dias. O peso corporal (BW) do peixe ao final do período de avaliação de crescimento foi, em média, 78,7 g ($\pm 51,7$ g) e o ganho médio diário (ADG) foi de 0,72 g ($\pm 0,45$). Para o desafio bacteriano, foram desafiados 775 peixes a infecção por *S. Agalactiae*. Cerca de 712 peixes morreram durante o período de avaliação, correspondendo a uma mortalidade acumulativa total de 91,87 %. O tempo de morte (TD) e sobrevivência (SS) (considerando animais resistentes aqueles que sobreviveram após o dia 5, aplicando um limiar ajustado para 50% da mortalidade) variaram consideravelmente entre as famílias, o que indicou uma alta variação fenotípica relacionada à resistência contra *S. agalactiae*. Os resultados mostraram valores de herdabilidade baixos a moderados para resistência as características nessa população de tilápia do nilo, estimada em 0,24 ($\pm 0,09$) para TD e 0,27 ($\pm 0,09$) para SS. A herdabilidade para ADG foi considerada moderada a alta, com valor de 0,40 ($\pm 0,09$). Correlações fenotípicas entre as características de resistência *S. agalactiae* e ADG foram positivos e baixos, com valores de 0,16 (SS/ADG) e 0,18 (TD/ADG). As correlações genéticas do ADG com as duas características de resistência foram baixas (próximas de zero). As correlações fenotípicas e genéticas entre TD e SS foram elevadas e positivas (0,72 e 0,52, respectivamente). A presença de variação genética significativa para resistência contra *S. agalactiae*, indica que essa característica está sob controle genético moderado e o melhoramento genético é plausível, portanto, viável e complementar ao controle da doença na aquicultura.

Palavras-chaves: Melhoramento genético, Resistência a doenças, Herdabilidade, Correlação genética.

ABSTRACT

Nile Tilapia is the most farmed tropical fish species globally, being the main fish produced in Brazilian aquaculture. Outbreak of streptococcal, associated with *Streptococcus agalactiae* infection, has been reported on commercial fish farms worldwide and it often results in high mortality rates. *Streptococcus agalactiae* is a gram-positive bacterium that has different serotypes (specificity in its capsular polysaccharide), in addition to different genetic variants, which can be restricted according to the geographic region. For this reason, vaccines are not fully effective, while genetic improvement can be a viable and sustainable alternative to produce resistant animals against this pathogen. The objective of this study was to estimate components of genetic variance and heritability for resistance in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* from an experimental population in Brazil, through a disease challenge against *S. agalactiae* (serotype Ib, sequence type non-typable), using a circulating strain in fish farms of the Central-Southeast region in Brazil. Moreover, we also evaluated the quantitative genetic parameters in relation to weight gain in the juvenile phase tested in a growth challenge for 60 days. Body weight (BW) of the fish at the end of the growth evaluation period was on average 78.7 g ($\pm$ 51.7g) and the average daily gain (ADG) was 0.72 g ($\pm$ 0.45). About the bacterial challenge, of the 775 fish challenged by *S. agalactiae*, 712 died during the period of evaluation, corresponding to a total cumulative mortality of 91.87 %. Time of death (TD) and survival (SS) (considering resistant animals those surviving after day 5, i.e., threshold for 50% of mortality) varied considerably among families, which indicated a high phenotypic variation related to resistance against *S. agalactiae*. The results showed low to moderate heritability values for resistance traits in this Nile tilapia population, estimated at 0.24 ($\pm$ 0.09) for TD and 0.27 ($\pm$ 0.09) for SS. Heritability for ADG was considered moderate to high, with a value of 0.40 ($\pm$ 0.09). Phenotypic correlations between the traits of resistance *S. agalactiae* and ADG were positive and low, with values of 0.16 (SS/ADG) and 0.18 (TD/ADG). The genetic correlations of ADG with the two resistance traits were low (close to zero). Phenotypic and genetic correlations between TD and SS were high and positive (0.72 and 0.52, respectively). The presence of significant genetic variation for resistance against *S. agalactiae* in this experimental Nile tilapia indicates that this trait is under moderate genetic control and genetic improvement is plausible, therefore, a viable and complementary alternative to control this disease in aquaculture.

Keywords: Selective breeding, Disease resistance, heritability, Genetic correlation.

1. Introdução geral

1.1 Aspectos gerais

A demanda mundial por pescado tem aumentado nas últimas décadas, principalmente em função do crescimento populacional e da busca por alimentos mais saudáveis. Neste contexto, a aquicultura é a alternativa mais viável para continuar aumentando a oferta nos próximos anos, visto que a pesca se encontra com a captura estabilizada desde a década de 1990 (FAO, 2018). Os dados apresentados pela FAO (2018), indicaram que a produção global de peixes atingiu 179 milhões de toneladas em 2018, das quais 88% são utilizados para consumo humano direto. No Brasil, a piscicultura tem acompanhado o crescimento mundial. Na última década, o país teve um crescimento significativo e atingiu um valor de produção de R\$ 4,40 bilhões (IBGE, 2017). Apesar de várias espécies serem produzidas na piscicultura nacional, somente algumas têm recebido destaque no crescimento, tais como tilápia e peixes redondos (incluindo os híbridos). Atualmente, foram produzidas 323,7 mil toneladas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*); e 152 mil toneladas de tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e seus híbridos, que somados representam mais de 80% da produção continental do Brasil (IBGE, 2019).

In conclusion, the presence of genetic variation for resistance against *S. agalactiae* Ib (NS) in the experimental breeding population of Nile Tilapia herein studied indicates this trait is under moderate genetic control and the genetic improvement is, therefore, a feasible and complementary alternative to control the disease in aquaculture. The results of this study also suggest that the selection for resistance *S. agalactiae* Ib (NS) does not negatively affect weight gain during the juvenile phase in Nile Tilapia, and vice versa. However, others experiment must be performed during different growth periods (*e.g.*, harvest weight) to conclude that bacterial resistance does not affect growth and genetic improvement can be made simultaneously for both traits.

Funding

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP grant 2019/23029-0), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination of Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES - Finance Code 001). No potential conflict of interest was reported by the authors.

3.1.5 REFERENCES

ABUSELIANA, A, et al. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis* sp.). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 20, p. 2640-2646, 2010.

- ARIEDE, Raquel B. et al. Genetic (co) variation between resistance to *Aeromonas hydrophila* and growth in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 523, p. 735225, 2020.
- BARRÍA, Agustin et al. Novel insights into the genetic relationship between growth and disease resistance in an aquaculture strain of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, v. 511, p. 734207, 2019.
- BARRÍA, Agustin et al. Genetic parameters for resistance to Tilapia Lake Virus (TiLV) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 522, p. 735126, 2020.
- BARONY, Gustavo M. et al. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 13538, 2017.
- BASSINI, L. N., Lhorente, J. P., Oyarzún, M., Banger, R., Yáñez, J. M., Neira, R. 2019. Genetic parameters for *Piscirickettsia salmonis* resistance, sea lice (*Caligus rogercresseyi*) susceptibility and harvest weight in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 510, 276-282
- CHEN, Ming et al. Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE genotype. **Vaccine**, v. 30, n. 42, p. 6088-6092, 2012.
- CHIDEROLI, Roberta T. et al. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, p. 4551, 2017.
- CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. Special topics in tropical freshwater fish farming intensive. TecArt editora. São Paulo, p. 343-383, 2004.
- FAGUNDES, L. C. et al. Transferência passiva de soro hiperimune anti-*Streptococcus agalactiae* e seu efeito profilático em tilápias-do-nilo infectadas experimentalmente:

- sobrevivência e títulos de anticorpos. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 68, n. 2, p. 379-386, 2016.
- FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **The state of world fisheries and aquaculture**, 2018. Disponível em: <[http:// www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture](http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture) >.
- FESSEHAYE, Yonas et al. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 148-158, 2006.
- FIGUEIREDO, Henrique C. P.; LEAL, Carlos A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. SPE, p. 8-14, 2008.
- GJEDREM, Trygve. Disease resistant fish and shellfish are within reach: a review. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 3, n. 1, p. 146-153, 2015.
- GODOY, D. T. et al. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. **Letters in applied microbiology**, v. 57, n. 6, p. 476-483, 2013.
- IBGE 2019. **Pesquisa Pecuária Municipal – 2018**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2018>>.
- JONES, Nicola et al. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2530-2536, 2003.
- JORY, D. E.; ALCESTE, C.; CABRERA, T. R. Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norte América. **Panorama Acuicola**, Sonora, v. 5, n. 5, p. 50-53, 2000.
- JOSHI, Rajesh et al. Bayesian genomic models boost prediction accuracy for survival to *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromus niloticus*). *Genetics Selection Evolution*, v. 53, n. 1, p. 1-10, 2021a.

- JOSHI, Rajesh et al. Genomic selection for resistance to Francisellosis in commercial Nile tilapia population: geneldtic and genomic parameters, correlation with growth rate and predictive ability. **Aquaculture**, v. 537, p. 736515, 2021b.
- KAPLAN, Edward L.; MEIER, Paul. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American statistical association**, v. 53, n. 282, p. 457-481, 1958.
- LAFRENTZ, Benjamin R. et al. Controlled challenge experiment demonstrates substantial additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 458, p. 134-139, 2016.
- LAFRENTZ, Benjamin R. et al. Genetic (co) variation between harvest weight and resistance to both *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* capsular type Ib in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 529, p. 735726, 2020.
- LEAL, Carlos A.G. et al. *Streptococcus agalactiae* sequence type 283 in farmed fish, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 4, p. 776, 2019.
- MARCUSSO, Paulo Fernandes; SALVADOR, Rogério; DE ALMEIDA MARINHO-NETO, Fausto. Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 2, p. 165-169, 2017.
- MARTINS ML. 1998. Doenças infecciosas e parasitárias de peixes. 2.ed. Jaboticabal: **FUNEP**. 66p
- MONTEIRO, Sérgio Henrique et al. Antibiotic residues and resistant bacteria in aquaculture. **Pharmaceut. Chem. J**, v. 5, p. 127-147, 2018.
- POYART, Claire et al. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1985-1988, 2007.
- SHOEMAKER, Craig; KLESIUS, Phillip. Streptococcal disease problems and control: a review. **Tilapia aquaculture**, v. 2, 1997.

- SHOEMAKER, Craig A. et al. Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* capsular type Ib: Is genetic resistance correlated? **Aquaculture**, v. 468, p. 193-198, 2017.
- SUEBSONG, Wasana et al. Selection response for *Streptococcus agalactiae* resistance in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of fish diseases**, v. 42, n. 11, p. 1553-1562, 2019.
- SUKHAVACHANA, Sila et al. Heritability estimates and selection response for resistance to *Streptococcus agalactiae* in red tilapia *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, v. 502, p. 384-390, 2019.
- YÁÑEZ, José M. et al. Negative genetic correlation between resistance against *Piscirickettsia salmonis* and harvest weight in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, v. 459, p. 8-13, 2016.
- YÁÑEZ, J. M.; JOSHI, R.; YOSHIDA, G. M. Genomics to accelerate genetic improvement in tilapia. **Animal Genetics**, v. 51, n. 5, p. 658-674, 2020.
- THODESEN, Jørn et al. Genetic improvement of tilapias in China: Genetic parameters and selection responses in growth, pond survival and cold-water tolerance of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) after four generations of multi-trait selection. **Aquaculture**, v. 396, p. 32-42, 2013.
- WONMONGKOL, P. et al. Genetic parameters for resistance against *Flavobacterium columnare* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758). **Journal of fish diseases**, v. 41, n. 2, p. 321-328, 2018.