

Avanços das biotecnologias genéticas e reprodutivas de espécies nativas

FENACAM'16
X Simpósio
Internacional de Aquicultura

Eduardo Sousa Varela
PhD, Genética e Biologia Molecular
Pesquisador
Embrapa Pesca e Aquicultura



Embrapa

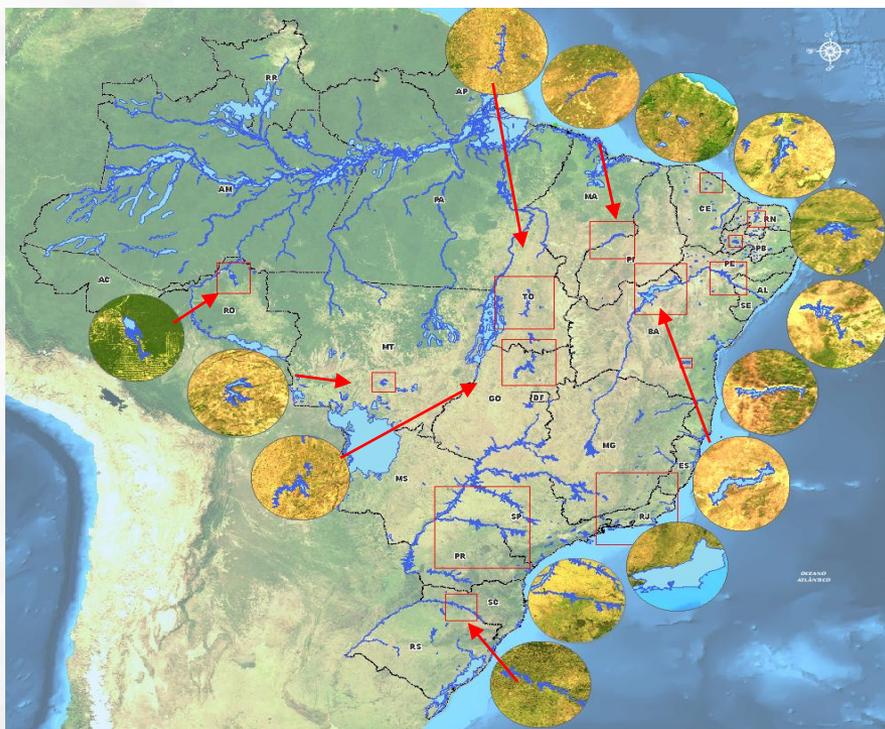
“Aumentar a Produção para Atender a Crescente Demanda Interna com um Olhar Atento no Promissor Mercado Internacional”

Desafios:



- Volume de produção
- Melhorias nos sistemas produtivos
- Diversificação de produtos

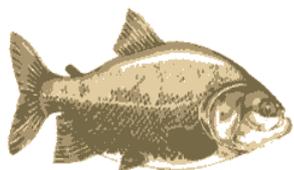
Bacias hidrográficas brasileiras e Parques aquícolas: Diversidade de ambientes para o cultivo



**As espécies produzidas
serão desafiadas a:**

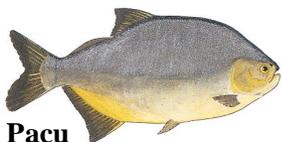
- ✓ SISTEMA DE PRODUÇÃO
- ✓ INTERAÇÃO GENÓTIPO AMBIENTE
- ✓ RESISTÊNCIA A PARASITOSSES E ENFERMIDADES

Espécies Nativas: Oportunidade de atendimento ao mercado interno e internacional



Tambaqui

Colossoma macropomum



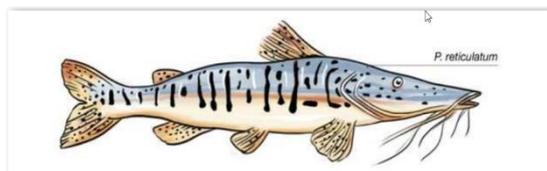
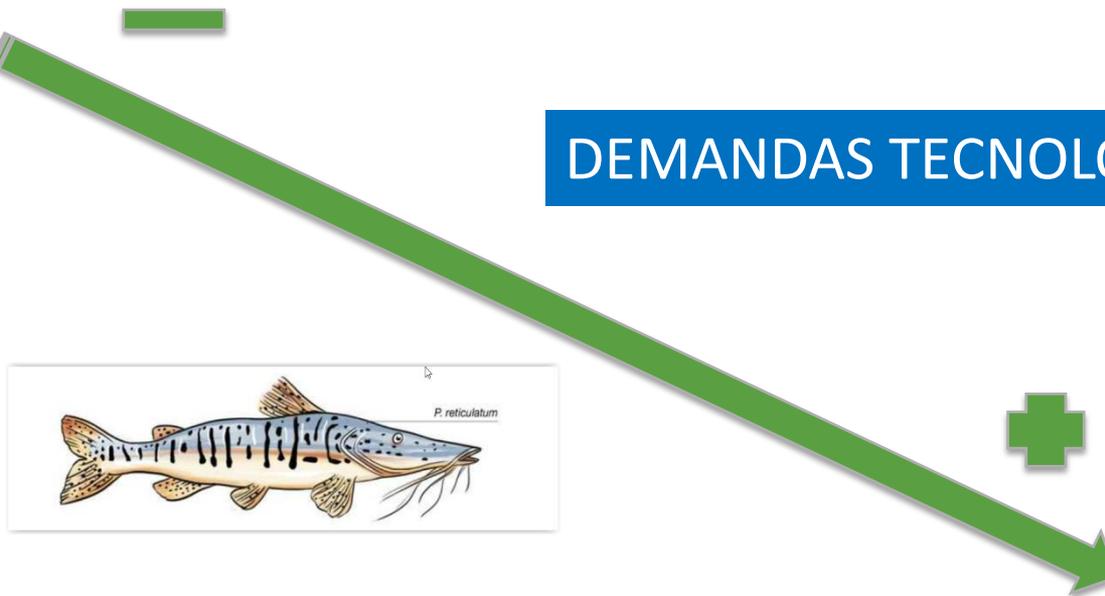
Pacu

Piaractus mesopotamicus

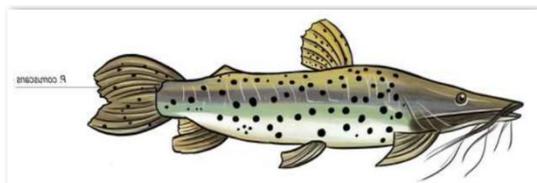


Pirapitinga

Piaractus braquipomum



Surubins - *Pseudoplatystoma sp.*



Pirarucu

Arapaima gigas

Entraves tecnológicos comuns para espécies nativas e estratégias

- Espécies ainda em fase de domesticação
 - Amostragem recente
 - N_e ?
- Falta de germoplasma qualificado no mercado
 - Linhagens com diferentes atributos
 - Populações de ampla base genética
 - Programas de melhoramento
- Gestão e certificação de reprodutores
 - Híbridos
 - Gestão de genealogia

Tendências da Biotecnologia na Pecuária Mundial

- Aplicação de técnicas de NexGenSeq para geração de dados moleculares
 - RNASeq
 - Genotipagem por sequenciamento
 - Descoberta de QTLs por associação do Genoma versus Fenótipo (GWAS)
 - Melhoramento animal: Seleção Genômica
- Reprodução assistida por implantação hormonal

Estratégia da Embrapa na adoção de novas Biotecnologias

Para acelerar Ganhos Genéticos

- ✓ Geração do genoma completo
- ✓ Geração de Populações Segregantes de ampla base genética
- ✓ Aplicação de GWAS e GS

Para Gestão e Certificação de reprodutores

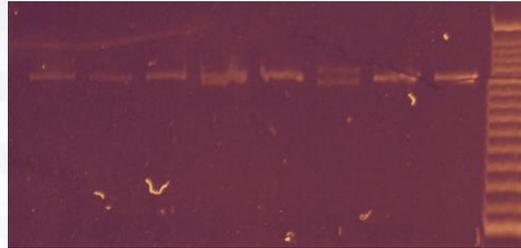
- ✓ Geração de painéis de marcadores moleculares
- ✓ Controle da reprodução Baseada no DNA
- ✓ Reprodução assistida por implantação de hormônios

PRINCIPAIS AVANÇOS

Sequenciamento e montagem do genoma do tambaqui (*Colossoma macropomum*)



Homozigosidade (SSR)



Criopreservação do sêmen



DNA copies of the genome



Sequence Reads



Assembled genome



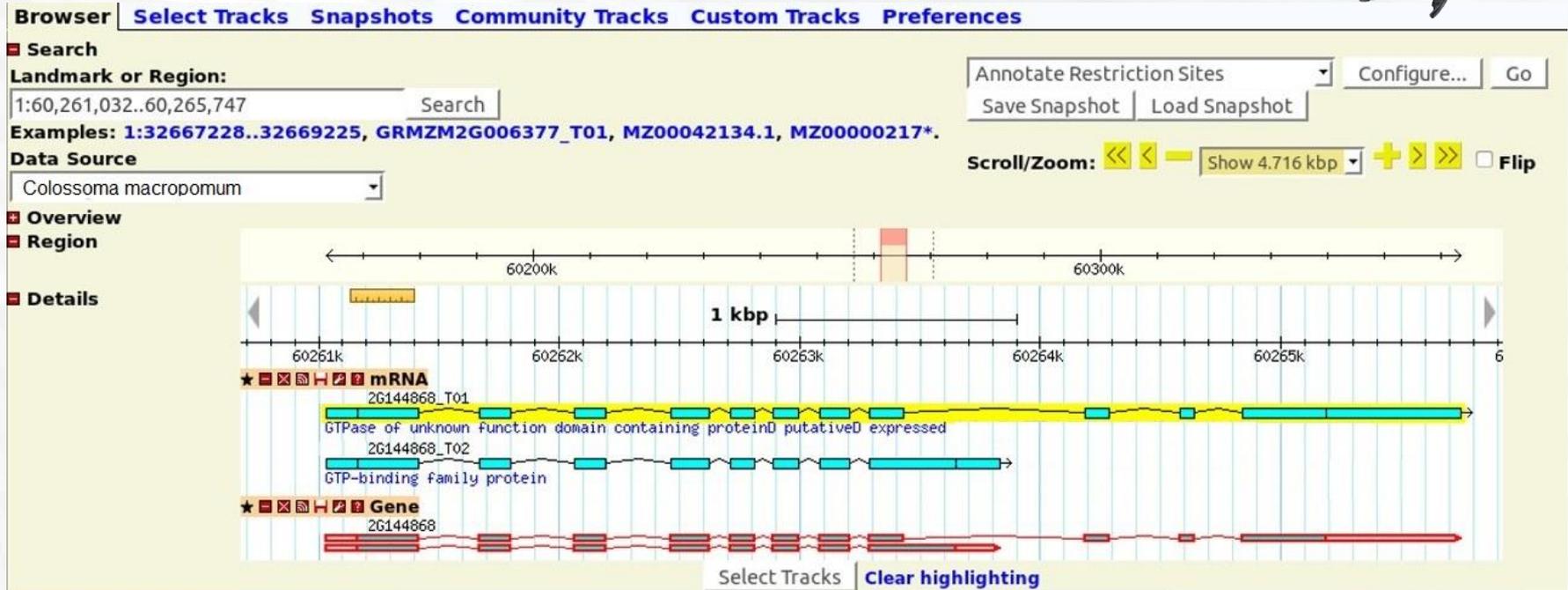
MONTAGEM DO GENOMA DO TAMBAQUI

- Bibliotecas de DNA 400bp SG
- Bibliotecas de 800bp SG
- Bibliotecas MP (10Kbp < 15Kbp < 5Kbp)

	nts in scaffs > 1000 (Gbp)	longest scaffold (Mbp)	N50 (Mbp)	#scaffs N50	N90 (Mbp)	#scaffs N90
1ª Montagem	1.29	9.1	0.71	389	0.07	2,877
2ª Montagem	1.36	18.0	2.00	162	0.2	1,009

Descoberta dos Genes no Tambaqui

- Resultados:
 - 23,632 genes encontrados
 - ~ 20,000 compartilham com *A. mexicanus*



Montagem do Genoma da Cachara

Estratégia similar ao executado com o tambaqui.

Resultados obtidos:

Total nucleotides in assembly: 1.2 GB

Assembly stats:

N50: 2.359.149 (124 scaffolds)

N90: 373.275 (589 scaffolds)

N95: 178.077 (804 scaffolds)

N99: 1.001 (4831 scaffolds)

Gap filling

- antes: ~ 46%

- depois: ~ 27%

CEGMA:

- Completos: ~ 90%

- Parciais: ~ 8%



Desenvolvimento de um painel molecular para identificação de híbrido pacu-tambaqui-Caranha



Tambaqui
(*Colossoma macropomum*)



Pacu
(*Piaractus mesopotamicus*)



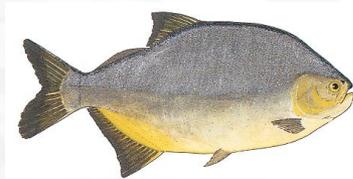
Caranha/Pirapitinga
(*Piaractus brachypomus*)

Pool – 63 indivíduos

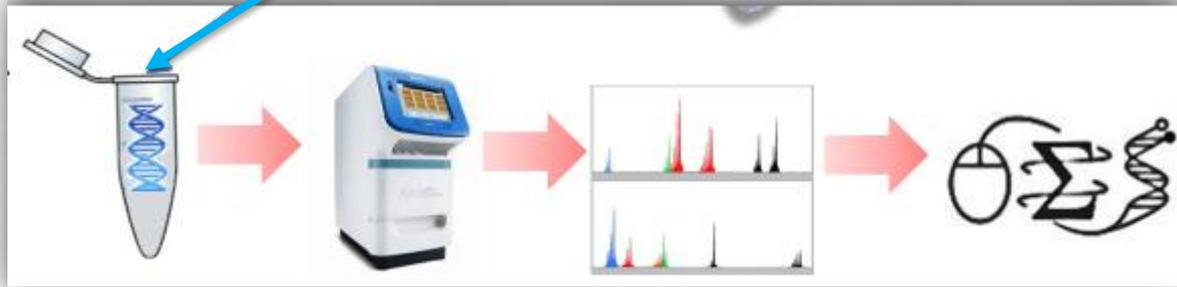
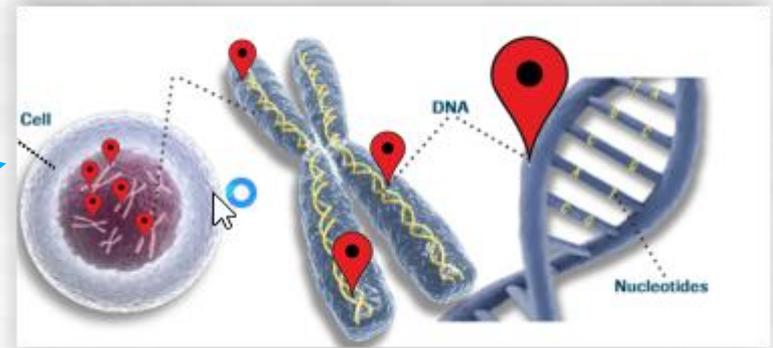
Pool - 24 indivíduos

Pool – 44 indivíduos

Identificando as mutações (SNPs) entre os animais



Como identificar os SNPs?



Isolamento
do DNA

PCR

Genotipagem

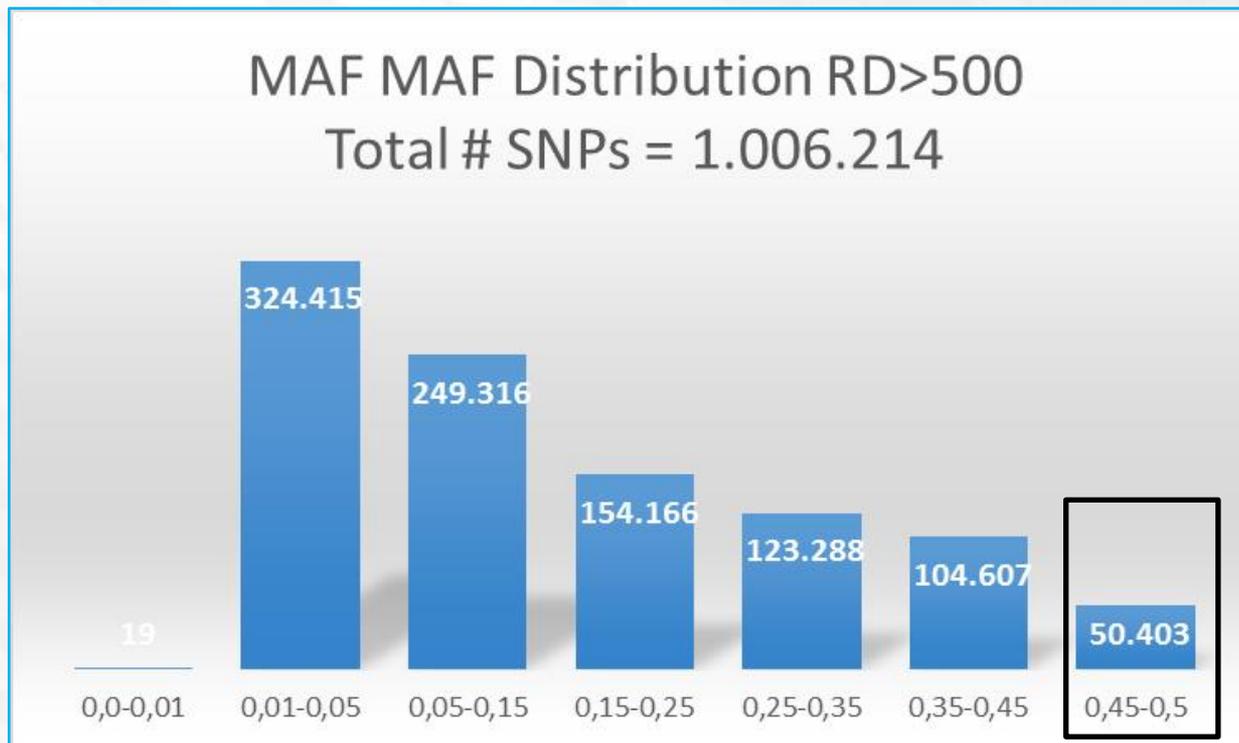
Análise
Estatística

SNP Discovery within and between related species

Total de SNP Descobertos entre Tambaqui-Pacu-Caranha:

» 1,06 Milhões

» Informativos = 50 mil



Mineração de SNPs

- Identificação de marcadores para compor painel de certificação de pureza específica
- Filtros
 - Cobertura
 - MAF
 - SNPs adjacentes
 - Localização

Mineração de SNPs

Simulação	População	Hipóteses	Número de Marcadores	
			alpha de 5%	alpha de 1%
	Puro	$H_0: p=1$ x $H_1: p<1$	1	1
	F1	$H_0: p=0.5$ x $H_1: p<0.5$	1	1
1	F2	$H_0: p=0.75$ x $H_1: p<0.75$	3	4
2	BC1	$H_0: p=0.5$ x $H_1: p<0.5$	5	7
3	BC2	$H_0: p=0.25$ x $H_1: p<0.25$	11	17
4	BC3	$H_0: p=0.125$ x $H_1: p<0.125$	23	35
5	BC4	$H_0: p=0.0625$ x $H_1: p<0.0625$	47	72
6	BC5	$H_0: p=0.03125$ x $H_1: p<0.03125$	95	145
7	BC6	$H_0: p=0.015625$ x $H_1: p<0.015625$	191	293

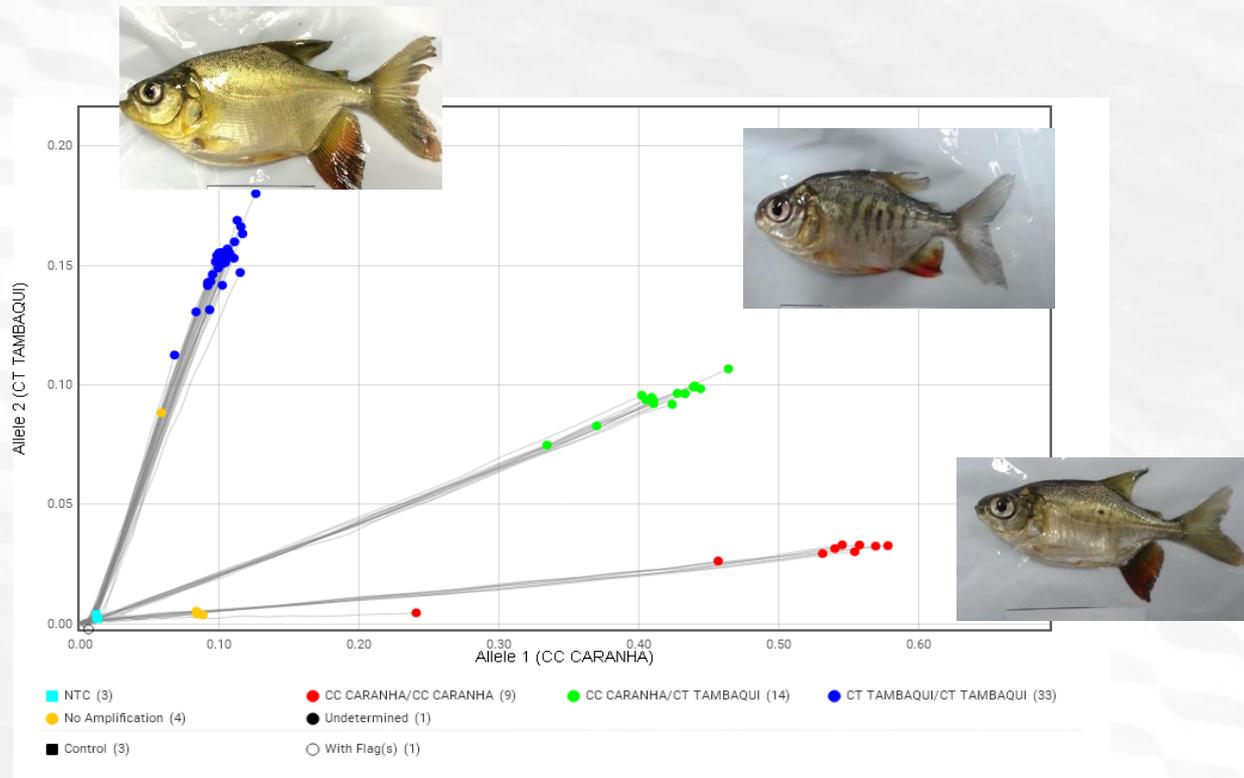
- 1115 SNPs candidatos para identificação de introgressão

Identificação de híbridos F1



- ✓ Desafio em discriminar os morfotipos de alevinos
- ✓ Melhorar a gestão dos reprodutores
- ✓ Busca de um método simples, rápido e eficaz na identificação das espécies e híbridos

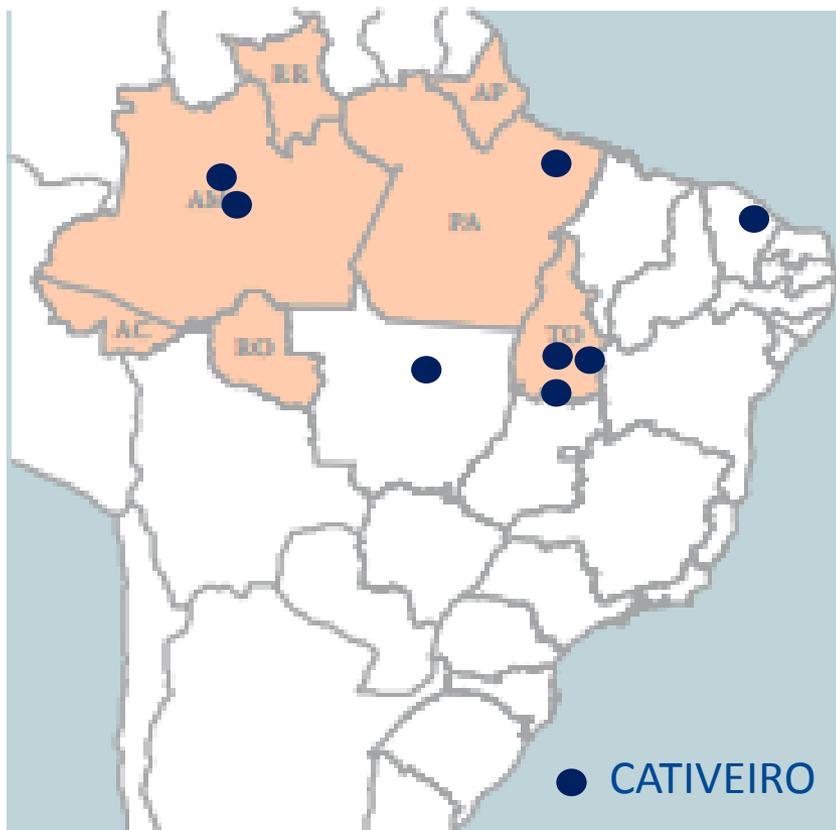
✓ Plotagem de discriminação alélica De puros e híbridos F1



Abordagem baseada em marcador molecular para estimar parentesco genético em espécies nativas

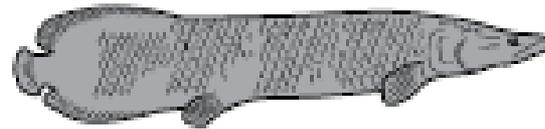
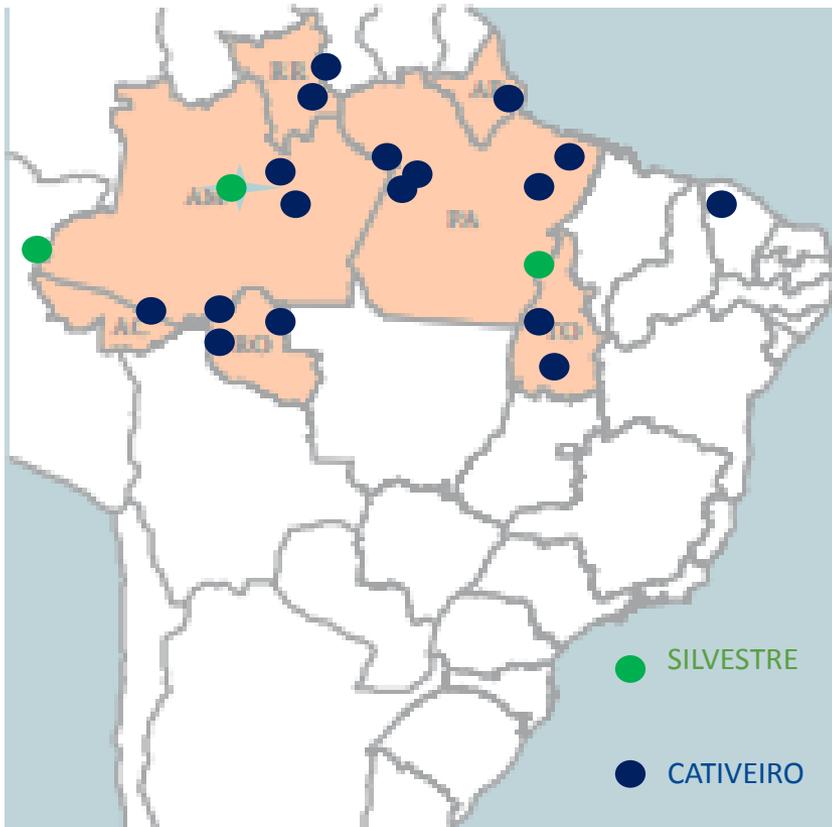
- ✓ Espécies demandadas: Tambaqui e Pirarucu
- ✓ Desafio em classificar o vínculo genético de animais sem informação de genealogia no setor
- ✓ Melhoria na gestão de BAGs,
- ✓ Abordagem baseadas em SSR/SNP polimórficos disponíveis

Amostragem dos Plantéis de Tambaqui na EMBRAPA



Em torno de 400 amostras
+ 25 progênies

Amostragem dos Plantéis de Pirarucu



Em torno de 600 amostras
+ 15 progênies

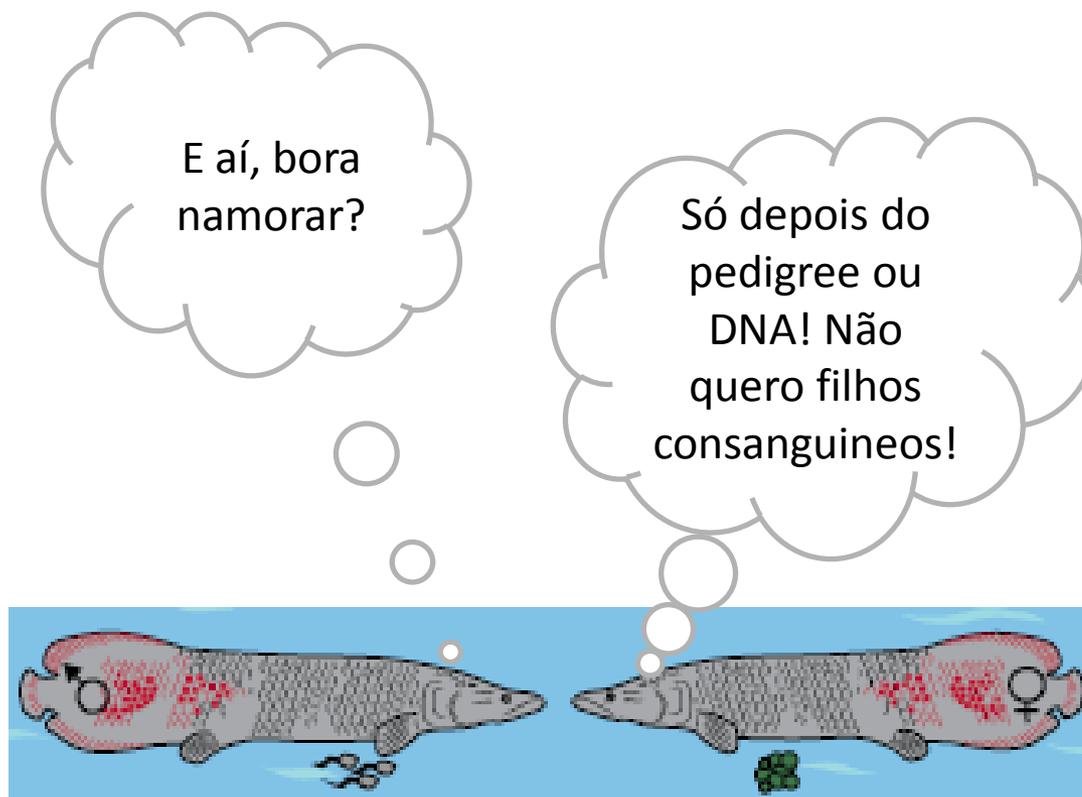
PASSO 1: Identificação pelo microchip



PASSO 2: Coleta de material genético para análise de DNA

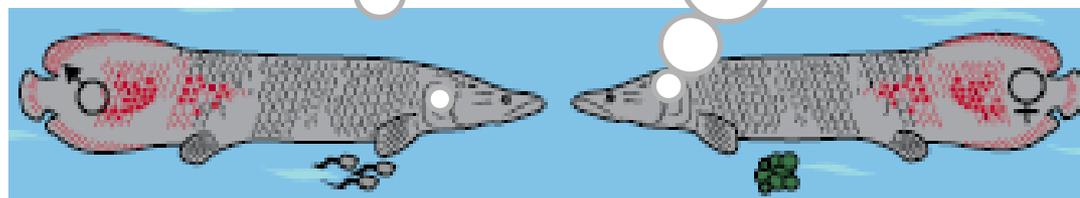


Parentesco Genético e acasalamentos baseados em DNA



Esperando... Vai já
começar a Chover...
Meu chip é o
M112827

Bora lá ver a matriz
de parentesco pelo
DNA!
Meu chip é o
F112768



Matriz de Parentesco genético pelo DNA

Machos

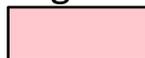


	M107613	M107625	M110332	M110495	M110616	M112827	M112919	M113697	M120110	M120573
F110224	1	0	0	0	0	1	-3.7647	0	0	0
F110342	0	0	1	0	0	0	0	0	-3	-3
F110392	-2.545	0	0	-3.1667	0	-2.545	-3.7647	0	-3.1667	0
F110422	0	0	-3	0	0	0	0	0	1	1
F110457	0.1137	0	0	-0.0417	0	0.1137	-3.7647	0	-0.0203	0
F110462	-2.545	0	1	-3.1667	0	-2.545	-3.7647	0	-3.0811	-3
F111052	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F111069	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F112735	0.1137	0	0	-0.0417	0	0.1137	-3.7647	0	-0.0417	0
F112768	-3.1667	0	1	-3.1667	0	-3.1667	0	0	-3.0811	-3
F112785	0	0	-3	0	0	0	0	0	1	1
F112843	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0
F112886	1	0	0	0	0	1	-3.7647	0	0	0
F112900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F113526	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fêmeas



Legenda:

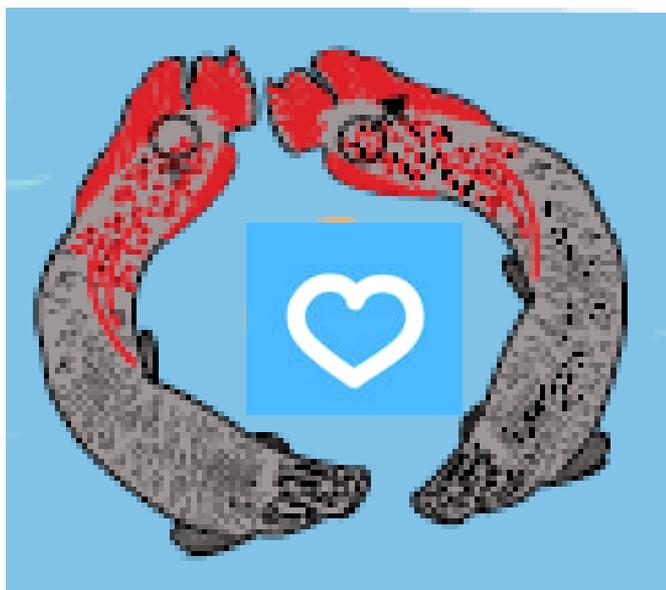


Casais consanguíneos



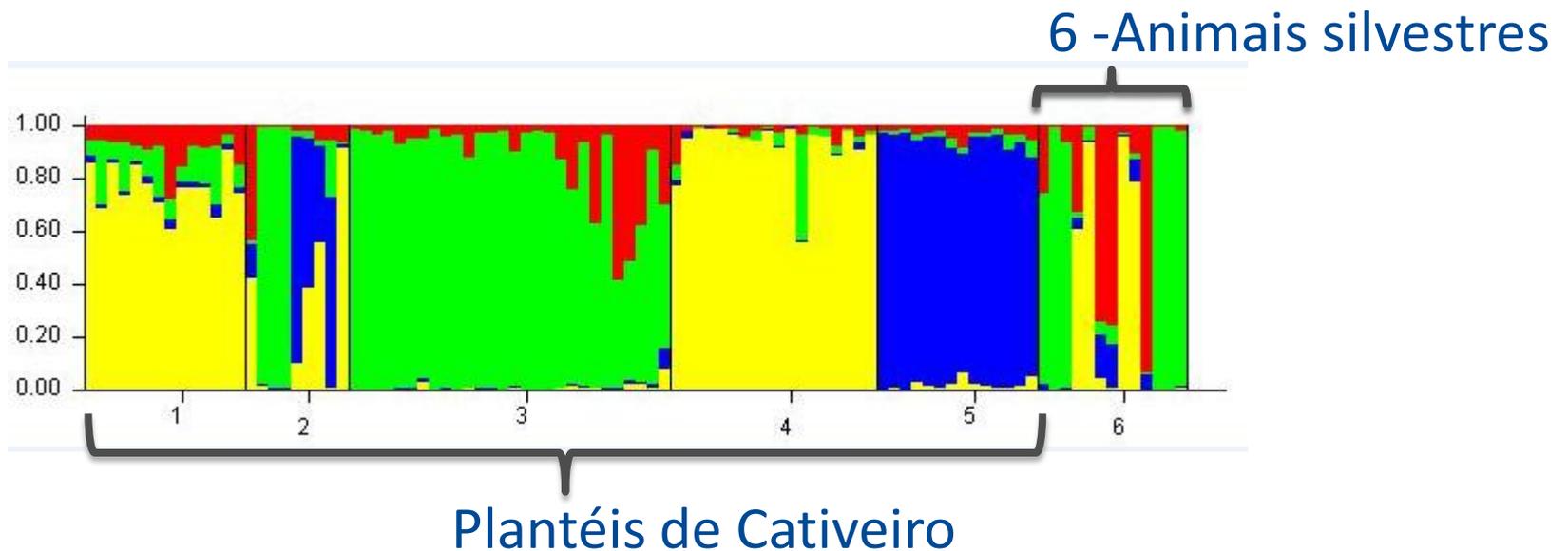
Casais compatíveis

Vantagens do teste de DNA



- Melhorias na gestão do plantel
- Avanços nas estratégias de acasalamento
- Evita acasalamentos de consanguíneos

O processo de Domesticação do pirarucu visto pelo DNA (SNP 1.6K)

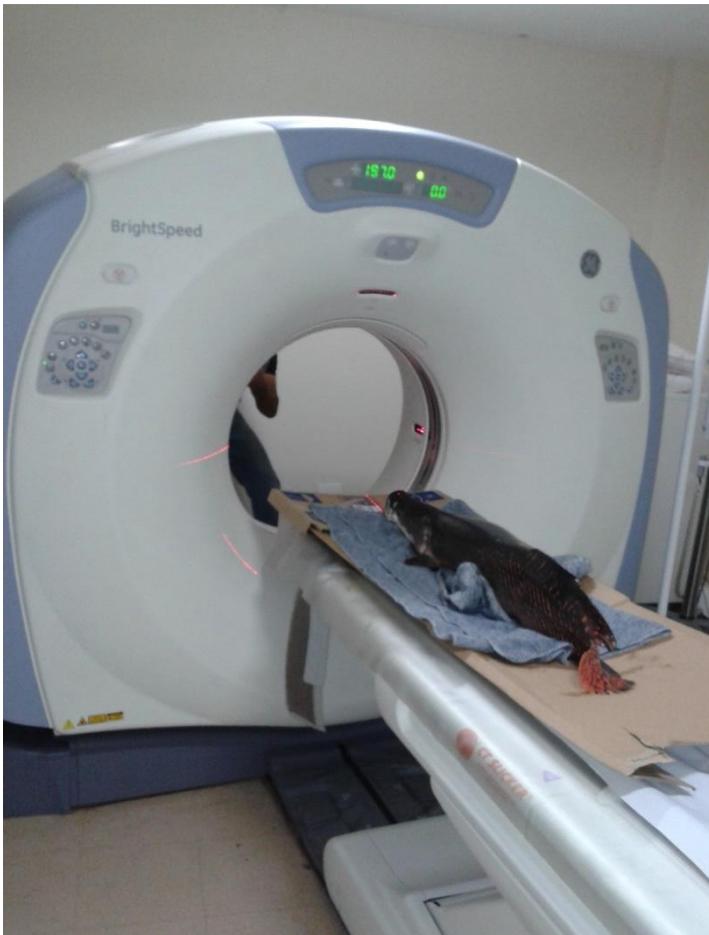


- Domesticação recente com sinais de gargalo genético
- Pisciculturas com similaridades e divergência genética

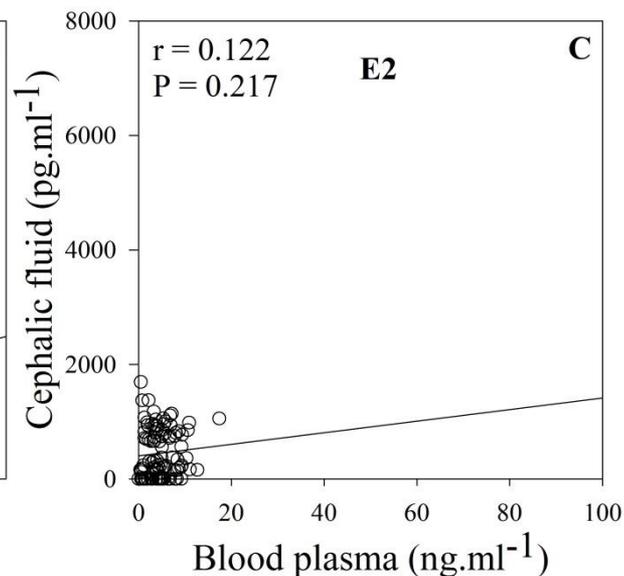
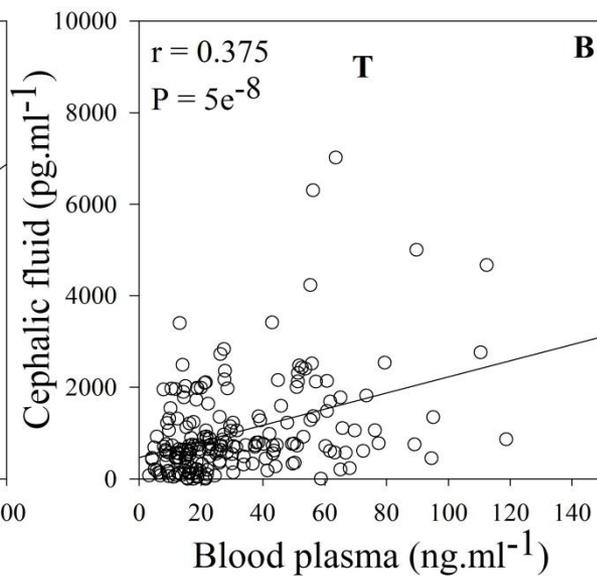
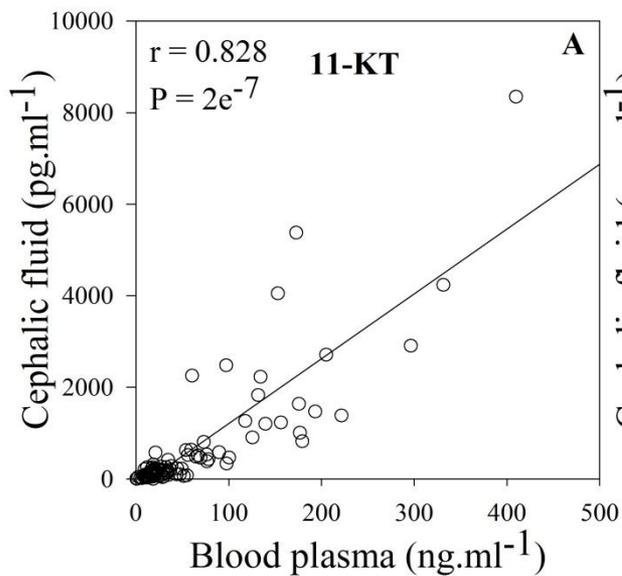
Caracterização das deformidades esqueléticas em pirarucu por Diafanização



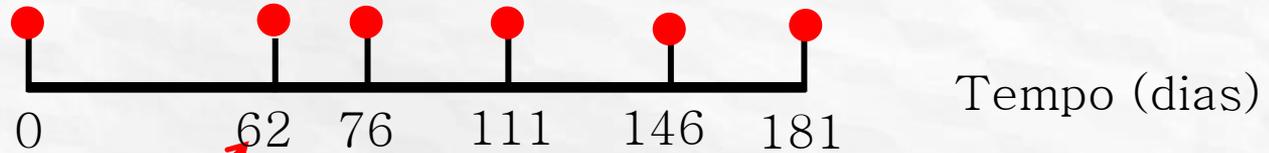
No adulto apenas por tomografia computadorizada



Secreção Cefálica



Manipulação hormonal- Implantes



Perfil Hormonal de:

♂ { -11-KT
-
testosteron } ♀
e
-estradiol

-13 casais com implante

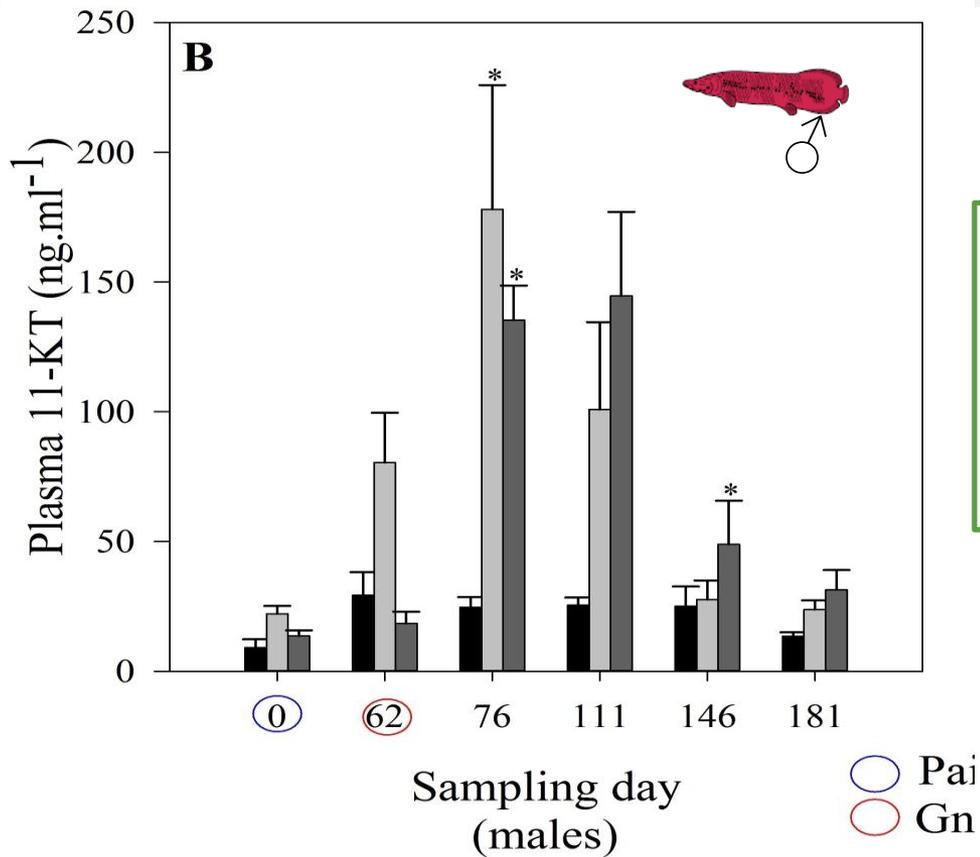
-5 casais controle

-Não fizemos biopsia do ovário



sGnRHa - pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DArg-Trp-Leu-Pro-Net

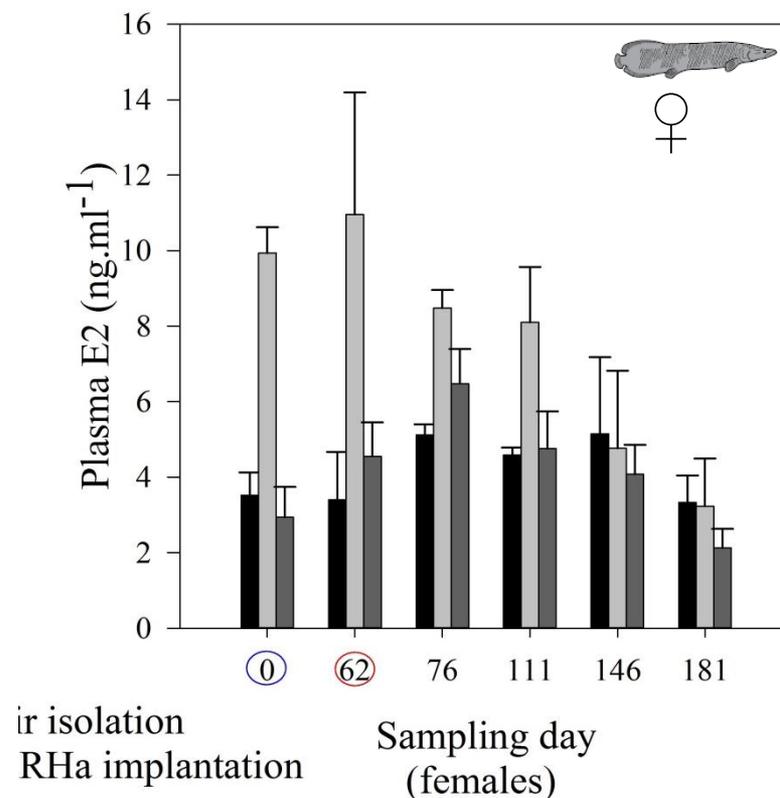
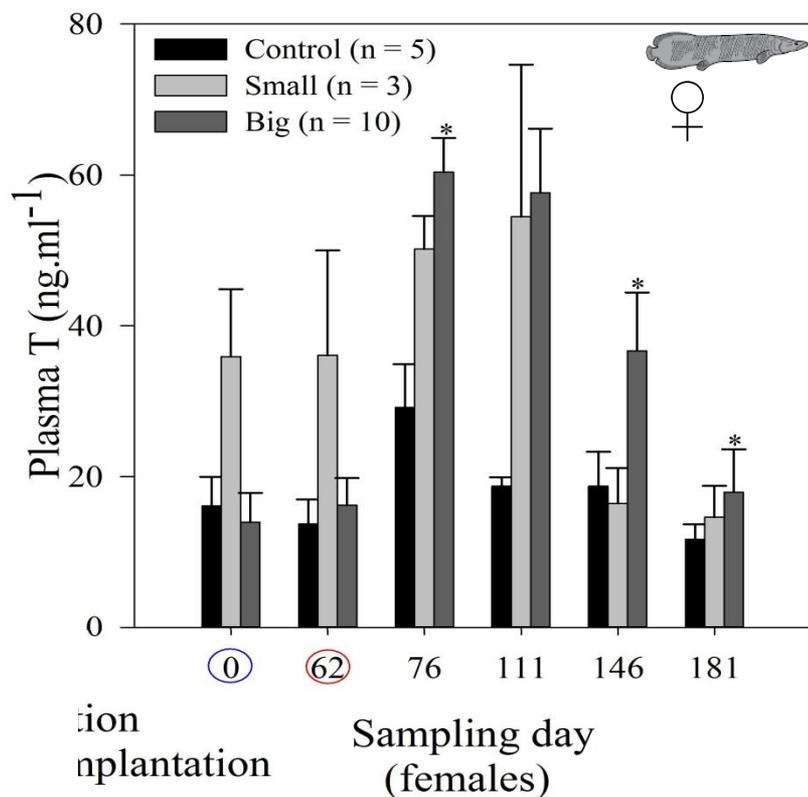
Perfil hormonal após implante



Efeito do GnRH na elevação de 11-KT em machos (hormônio atuante na espermiacção)

Perfil hormonal após implante

Efeito sobre testosterona, mas não estradiol



Perdemos uma desova, mas
ganhamos informação!



Endoscopia gonadal

Journal of
Applied Ichthyology



DWK



J. Appl. Ichthyol. 32 (2016), 353–355
© 2016 Blackwell Verlag GmbH
ISSN 0175–8659

Received: May 5, 2015
Accepted: August 28, 2015
doi: 10.1111/jai.12988

Short communication

Endoscopy application in broodstock management of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)

By L. S. Torati^{1,2}, A. P. S. Varges³, J. A. S. Galvão⁴, P. E. C. Mesquita⁴ and H. Migaud²

¹EMBRAPA Fisheries and Aquaculture, Palmas, Brazil; ²Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland, UK;
³H. Strattner & Cia Ltda, São Paulo, Brazil; ⁴DNOCS, Pentecoste, Brazil



Stage I

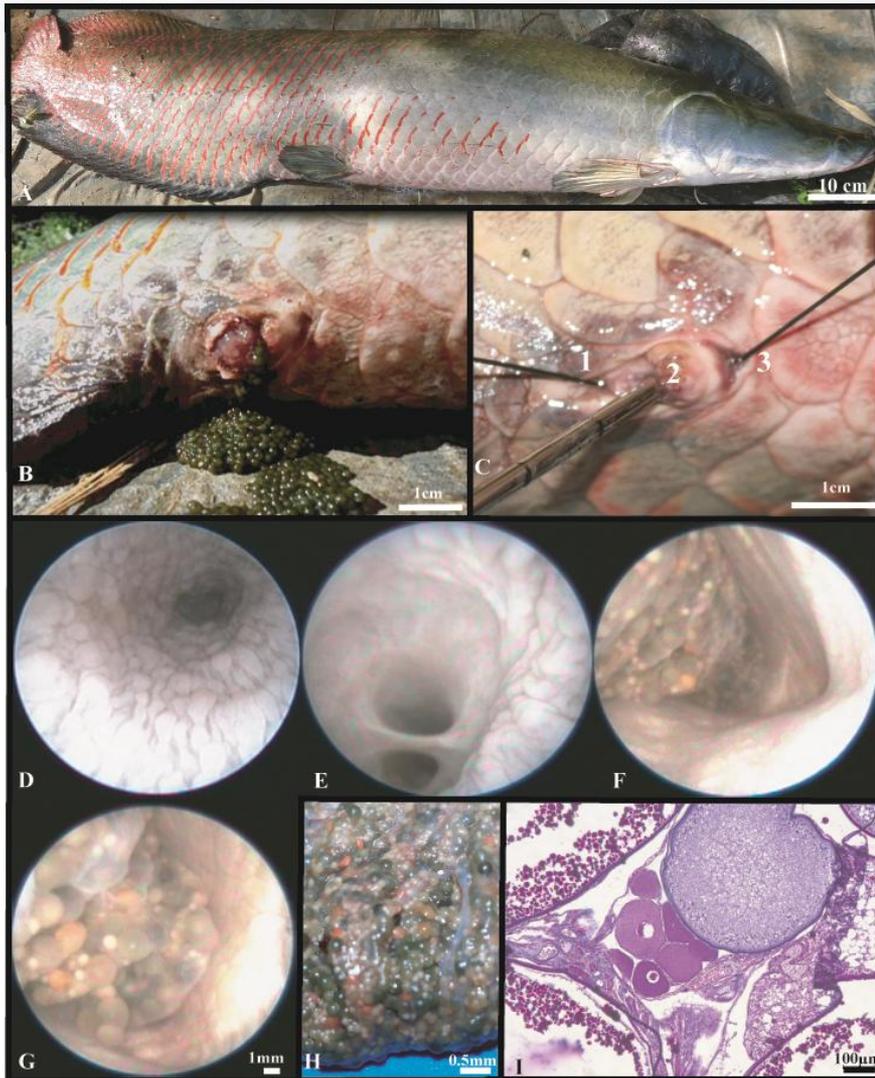


Stage II



Stage III





Vantagens

- ✓ Confirmação da maturidade;
- ✓ Confirmação do sexo
- ✓ Não invasivo;
- ✓ Rápido procedimento.



Obrigado

eduardo.varela@embrapa.br



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

