

Microinjeção em ovos de tambaqui *Colossoma macropomum* como pré-requisito à edição genômica da espécie

Autor(es):

Fernanda L. A. O'Sullivan (Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM), Eduardo S. Varela (Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO), Lucas S. Torati (Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO), Luciana N. Ganeco-Kirschnik (Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO), Fabricio P. Rezende (Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO), Luciana C. V. Vilella (Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO), Cherlle K. L. Almeida (Dep. Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA), Marcela Pereira de Sene (Instituto Federal do Tocantins)

Resumo do Tema:

Nos últimos anos, a edição genômica, impulsionada pelo descobrimento da CRISPR/Cas9, tem sido amplamente utilizada para compreensão de vias moleculares, função dos genes e obtenção de novos fenótipos. Conseqüentemente, despertou o interesse da indústria agropecuária, uma vez que fenótipos favoráveis à produtividade e resiliência podem ser obtidos rapidamente em comparação às técnicas tradicionais de obtenção de genótipos promissores nas espécies de interesse. A mutação dirigida em genes alvo se torna uma ferramenta muito prática em espécies aquícolas, devido principalmente à fertilização externa e alta fecundidade da maioria dos organismos aquáticos, o que facilita a aplicação da técnica. Para aplicação da CRISPR/Cas9, o RNAGuia e a enzima Cas9 devem ser injetados em ovos antes da primeira clivagem, para evitar o mosaicismo. Como primeira etapa no desenvolvimento de um protocolo de CRISPR/Cas9 para tambaqui, fizemos um estudo para identificar o melhor tempo (pós desova; PD) para microinjeção na espécie. Logo após a desova, os ovos foram mantidos a 13°C, conforme Vieira et al. (2022) e então dois tempos para fertilização com imediata microinjeção foram testados em triplicatas: T1 (24 a 37 min PD) e T2 (42 a 49 min PD), e controles com ovos fertilizados não injetados: inicial (18 min PD) e final (72 min PD). Foi injetado 0.1 µL de 0.02% de fenol red para visualização da injeção intracitoplasmática. As réplicas foram incubadas separadamente. Devido ao número baixo de ovos (n = 31 a 50/réplica) e para preservar os ovos viáveis, a taxa de fertilização não foi estimada. A taxa de eclosão foi de 24.0% (±10.4) e 5.3% (±4.2) nos controles inicial e final, e 14.3% (±4.3) e 3.2% (±1.4) nos tratamentos 1 e 2, respectivamente. A taxa de recuperação de larvas às 24h pós eclosão (no larvas vivas/no de ovos incubados) foi de 14.0% (±9.0) e 3.3% (±5.8) nos controles inicial e final e 13.3% (±6.1) e 0.4% (±0.8) nos T1 e T2, respectivamente. Consideramos que a injúria causada pela microperfuração do ovo de tambaqui na fase pré-clivagem não inviabiliza o desenvolvimento e eclosão das larvas. Ademais, os ovos não-fertilizados de tambaqui podem ficar até 37 minutos sob refrigeração, ampliando a margem de tempo para realização das injeções, que são individuais. Estes resultados indicam que a aplicação CRISPR/Cas9 é aparentemente viável em tambaqui, e abrem caminho imediato para o uso desta tecnologia na mais importante espécie da piscicultura nativa brasileira.