



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

LUIZ FAGNER FERREIRA NOGUEIRA

**ANÁLISE DO SNP C892T DO GENE *HSP70* COMO MARCADOR DE
RESISTÊNCIA DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* AO VÍRUS DA MIONECROSE
INFECCIOSA - IMNV**

FORTALEZA

2016

LUIZ FAGNER FERREIRA NOGUEIRA

**ANÁLISE DO SNP C892T DO GENE *HSP-70* COMO MARCADOR DE
RESISTÊNCIA DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* AO VÍRUS DA MIONECROSE
INFECCIOSA – IMNV**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Rui Simões de Menezes

N712a Nogueira, Luiz Fagner Ferreira.

Análise do SNP C892T do gene HSP70 como marcador de resistência do camarão *Litopenaeus vannamei* ao vírus da mionecrose infecciosa - IMNV / Luiz Fagner Ferreira Nogueira. – 2016.
49f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2016.

Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientação: Prof^o. Dr^o. Rodrigo Maggioni.

1. Aquicultura. 2. Genotipagem. 3. Camarão – Alimentação e rações. I. Título.

CDD 639.68

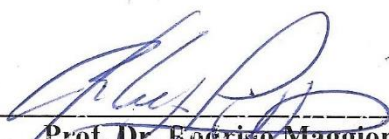
Luiz Fagner Ferreira Nogueira

" Análise do SNP C892T do Gene HSP-70 como marcador de resistência do camarão *Litopenaeus vannamei* ao vírus da mionecrose infecciosa - IMNV "

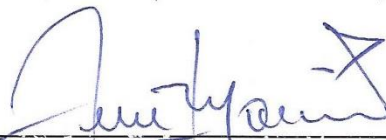
Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de **MESTRE** em Ciências Marinhas Tropicais, área de concentração em Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Aprovada em, 26 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rodrigo Maggioni
UFC (Orientador – Presidente)



Prof. Dr. Luís Fernando Fernandes Marins
FURG (Examinador Externo à Instituição)



Dr. Rubens Galdino Feijó
UFC (Examinador Externo à Instituição)

A Deus.

Aos meus pais e a minha noiva Jamille

AGRADECIMENTO

A Deus, por não me proporcionar uma caminhada tranquila e confortável durante essa etapa da minha vida. Eis pai, e sabe até onde eu pude ir. Obrigado!

A minha mãe Francisca, meu pai Varonil e meu irmão Djavan, que mesmo na minha ausência da vida familiar, puderam entender minha busca constante na caminhada do conhecimento. Obrigado!

Aos meus Segundos Pais, Dona Rosa e Seu Paulo José, que me acolheram de forma muito especial e que espero retribuir todo esse carinho um dia. Obrigado!

A minha noiva, companheira e melhor amiga Jamille, por participar de minha vida acadêmica e pessoal, incentivando com palavras e ajudando nas etapas mais difíceis desse processo. Este trabalho só foi possível graças a sua parceria e contribuições. Te amo!!!

Ao professor Rodrigo Maggioni, por viabilizar, orientar e ajudar em todas as etapas deste trabalho. Por acompanhar, deste a compra dos pequenos animais nas larviculturas até o último genótipo obtido, sempre comprometido com a Ciência. Muito obrigado!

Ao Rubens Feijó, por ter contribuído de forma muito especial na execução deste trabalho, em todos os seus desdobramentos, gargalos e desafios apresentados. Esse trabalho foi concretizado graças a seu conhecimento e ajuda. Obrigado!

A equipe do CEDECAM, João, Max, Janaína, Lucas, Graças, Mayara, Rhayan e Vanessa, por conviver, apoiar, ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

Ao LANOA, por ceder a estrutura necessária para o crescimento das pós-larvas de camarão para este experimento.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP pela concessão da bolsa.

Ao projeto RECARGENA/FINEP pelo apoio financeiro.

“A derradeira medida de um homem não é onde ele se coloca em momentos de conforto e conveniência, mas onde ele se posiciona em momentos de desafio e controvérsia.”

Autor: Martin Luther King J

RESUMO

Este estudo avaliou o polimorfismo C892T do gene *HSP70* em duas linhagens de camarão *Litopenaeus vannamei* em relação à resistência/susceptibilidade ao vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) por meio de ensaio de discriminação alélica por PCR em tempo real. Pós-larvas de duas linhagens de camarões, uma selecionada para o crescimento (L.C) e outra para a resistência ao vírus da mionecrose infecciosa (L.R) foram obtidas de duas empresas especializadas. No final do período de crescimento, observou-se que L.C obteve uma maior taxa de crescimento semanal média em relação a L.R (1,18 g/semana e 0,97g/semana, respectivamente). Sob desafio experimental, a evolução da carga viral foi similar entre os grupos infectados das duas linhagens. Os grupos selecionados como susceptíveis de ambas as linhagens apresentaram uma carga viral entre 10^3 e 10^5 cópias do IMNV/ μ g de RNA, enquanto os grupos resistentes exibiram carga viral entre 10^6 e 10^7 cópias. L.R obteve um melhor desempenho frente a exposição ao vírus, chegando ao 30º dia pós injeção do inóculo viral com 13% de sobrevivência, enquanto L.C atingiu 100% de mortalidade ao 12º dia pós injeção. Ao contrário do que poderia ser esperado, o alelo T do SNP C892T, que foi previamente associado à resistência, não foi mais frequente em L.R. Porém, sua frequência foi mais elevada nos grupos de resistência de cada linhagem. Isso pode estar associado à baixa variabilidade genética encontrada em L.R em relação a L.C. O ensaio de discriminação alélica por qPCR possibilitou a obtenção de genótipos para esta pesquisa mostrando que o SNP C892T está associado aos grupos de resistência/susceptibilidade ao vírus da mionecrose infecciosa. Esta evidência reforça a hipótese de interação deste marcador com doenças virais presentes na aquicultura, e sua potencial aplicação em programas de seleção de linhagens resistentes a patógenos específicos.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, single nucleotide polymorphism, IMNV, QTL, Genotipagem, Discriminação alélica, *HSP70*.

ABSTRACT

This study assessed the C892T polymorphism of the *HSP70* gene in two *Litopenaeus vannamei* strains regarding resistance/susceptibility to infectious myonecrosis, using allelic discrimination through real-time PCR. Post-larvae from two strains of shrimp, one selected for growth (L.C) and one selected for resistance to infectious myonecrosis virus (L.R) were obtained from two commercial hatcheries. At the end of the growth period, it was observed that L.C achieved a higher average weekly growth rate compared to L.R (1.18 g / week and 0.97g / week, respectively). However, under experimental challenge, L.R obtained a better performance against exposure to the virus, reaching the 30th day post infection with 13% survival, while L.C reached 100% mortality at 12 days post injection. The evolution of viral load was similar in both strains. Shrimp categorized as susceptible presented 10^3 to 10^5 IMNV copies/ μ g RNA, while shrimp considered resistant presented 10^6 to 10^7 viral copies/ μ g RNA. In contrast to what could be expected, allele T of the SNP C892T, which was previously associated with viral resistance, was less frequent in L.R than in L.C. However, its frequency was higher in the resistant group of each lineage. This may be associated with lower genetic variability found in L.R when compared to L.C. The allelic discrimination assay through qPCR allowed successful genotyping for this research showing that SNP C892T is associated with resistance groups / susceptibility to infectious myonecrosis virus. This evidence supports the hypothesis of interaction of this marker with viral diseases present in aquaculture and its potential application in selection programs of shrimp strains resistant to specific pathogens.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, single nucleotide polymorphism, IMNV, QTL, genotyping, allelic discrimination, HSP-70.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers e sondas MGB alelo-específico utilizados para a discriminação alélica do gene <i>HSP70</i> para o SNP C982T em camarões <i>L. vannamei</i> resistentes e susceptíveis ao IMNV pertencentes a linhagem de crescimento (L.C) e linhagem de resistência (L.R)	13
Tabela 2 – Locos utilizados para a genotipagem de linhagens de camarões <i>L. vannamei</i> selecionados para o crescimento (L.C) e para a resistência ao IMNV (L.R). Conjuntos definidos por FORTE (2014).....	15
Tabela 3 - Distribuição de alelos e genótipos do SNP C892T do gene <i>HSP70</i> nos grupos resistentes e susceptíveis de L.R L.C. Sus e Res são abreviaturas para Susceptível e Resistente, respectivamente.....	22
Tabela 4 - Variabilidade genética das duas linhagens <i>L. vannamei</i> por cinco loci de microssatélites.....	23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Diagrama esquemático do gene HSP-70 para o *L. vannamei* (Adaptado de Ferreira-Junior, 2014) indicando a posição dos primers (verde) e sondas (vermelho) utilizados para o ensaio de discriminação alélica do SNP C892T (seta) por PCR em tempo real. As duas sondas de genotipagem estão sobrepostas na representação e região exônica mais clara indica a porção codificadora do gene..... 14
- Figura 2 – Percentual de sobrevivência da linhagem de Crescimento (L.C infectado e L.C controle) e da linhagem Resistente (L.R infectado e L.R controle) de camarões *L. vannamei* ao longo de 30 dias após a injeção de $3,02 \times 10^5$ cópias do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e seus respectivos controles injetados com solução salina..... 18
- Figura 3 – Número de cópias do IMNV em hemócitos do *Litopenaeus vannamei* injetados com $9,98 \times 10^5$ cópias do IMNV e seus respectivos controles injetados com solução salina. Os dados são apresentados pelas médias \pm SEM (n=12 camarões amostrados em cada ponto de coleta). Os asteriscos indicam significância estatística entre as diferenças dos dados durante o tempo de desafio..... 19
- Figura 4 – Plot de amplificação dos dois parâmetros de fluorescência das sondas de hidrólise do SNP C892T do gene HSP-70 discriminando os três genótipos mais o controle. Dados de 45 amostras selecionadas randomicamente..... 21
- Figura 5 – Frequência alélica relativa dos cinco loci genotipados por painel multiplex com os microsossatélites: A) CNM-MG421; B) PVAN1003; C) TUMX LV8.256; D) PVAN0013 e E) TUMX LV8.32. L.C e L.R são abreviaturas de linhagem de crescimento e linhagem de resistência, respectivamente..... 24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1	Obtenção de pós-larvas de <i>L. vannamei</i> e desempenho zootécnico.....	8
2.2	Bioensaio de infecção experimental.....	8
2.3	Extração de DNA.....	10
2.4	Extração de RNA e Síntese de cDNA.....	11
2.5	Quantificação Absoluta do IMNV por RT-qPCR.....	12
2.6	Genotipagem de SNPs por RT-qPCR.....	13
2.7	Análise de Variabilidade Genética por Marcadores Microsatélites Multiplex.....	14
2.8	Análise de dados.....	16
3.	RESULTADOS.....	17
3.1	Qualidade de água e desempenho zootécnico das linhagens.....	17
3.2	Taxas de sobrevivência das linhagens infectadas com IMNV.....	17
3.3	Quantificação viral do genoma do IMN por RT-qPCR.....	18
3.4	Associação do polimorfismo do SNP C892T com a susceptibilidade/resistência ao IMNV.....	20
3.5	Análise da variabilidade genética.....	22
4	DISCUSSÃO.....	26
5	CONCLUSÕES	29
	REFERÊNCIAS	30
	ANEXO A - CONFIRMAÇÃO DO GENOTIPO DO SNP C892T POR SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO CAPILAR.....	37

1 INTRODUÇÃO

O camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*) é um dos organismos aquáticos de origem marinha de maior relevância para a aquicultura mundial, representando 76% da produção dentro do grupo dos peneídeos (FAO, 2014). Esta espécie possui elevada rusticidade, aceitação de dietas artificiais, elevada taxa de crescimento, dentre outras características que são de interesse para o seu cultivo (FAO, 2014). Dentre os entraves para o setor produtivo, as doenças virais estão entre as mais relevantes. Isso é observado especialmente nos sistemas de produção da carcinicultura, que visam alta produtividade e elevadas taxas de estocagem, favorecendo assim a manifestação de patógenos no meio de cultivo. Algumas estratégias vêm sendo construídas para transpor ou minimizar estas perdas causadas por enfermidades virais. Programas de melhoramento genético destinados a produção de linhagens resistentes a patógenos específicos (*Specific Pathogen Resistant - SPR*) vem apresentando resultados significativos na seleção de famílias com sobrevivência significativa a desafios virais (MOSS; DOYLE; LIGHTNER, 2005), mesmo que este tipo de seleção mostre correlações negativas com o crescimento, visto que são parâmetros de baixa herdabilidade e que em geral se opõem no decorrer do processo de melhoramento (ARGUE et al., 2002).

A exemplo do desenvolvimento das demais atividades agropecuárias, a aquicultura vem dando importantes passos no âmbito da genética e melhoramento. Para o camarão branco do Pacífico *L. vannamei* a compreensão do processo de seleção é crucial, visto que a seleção fenotípica para uma característica específica não é necessariamente a melhor estratégia a ser adotada nos meios de produção, porém a obtenção de linhagens com múltiplos caracteres melhorados (crescimento e resistência, por exemplo) se torna um entrave em questões metodológicas (MOSS; DOYLE; LIGHTNER, 2005). A produtividade é afetada não apenas pelas características individuais inatas, mas também pela perda da variabilidade genética de plantéis cultivados (BEAUMONT; BOUDRY; HOARE, 2010). Com relação a enfermidades, há ainda evidências de que a sobrevivência de *L. vannamei* frente a infecções virais pode ser afetada diretamente pelo aumento no endocruzamento, e que surtos poderiam ser minimizados evitando níveis moderados e altos de endogamia (>10%) (MOSS et al., 2007).

O Vírus da Mionecrose Infecciosa

O vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) foi primeiramente registrado no nordeste brasileiro, com impactos econômicos significativos para a indústria nacional do camarão, e mais recente no sudoeste da Ásia (ANDRADE et al., 2007; SENAPIN et al., 2011). A ocorrência da doença ocorrência parece estar ligada ao estresse ambiental, pouco oxigênio dissolvido na água, salinidades extremas e baixa qualidade do alimento (LIGHTNER et al., 2005), causando, desde simples queda do índice de conversão alimentar (FCA) até mortalidades elevadas, que podem atingir até 70 % (NUNES, et al., 2004). O vírus possui um formato icosaédrico com 40 nm de diâmetro e uma densidade de 1,366 g/ml em CsCl (POULOS et al., 2006). O seu genoma é composto de uma molécula de dsRNA (*double-stranded RNA*) com 7.560 pb e provavelmente possui um capsídeo com quatro polipeptídios representado pelos os pesos moleculares de 24, 42, 106 e 149 kDa. Apresenta dois quadros de leitura aberta (*Open Reading Frame* - ORF) não sobrepostas, uma na porção 5' (ORF1, nt 136-4.953), codificando para a proteína do capsídeo e para a proteína de ligação ao dsRNA, e outro na porção 3' (ORF2, nt 5.241-7.451) codificando para a RNA polimerase RNA-dependente (*RNA-dependent RNA polymerase* – RdRp). Por meio de análises filogenéticas do RdRp, o IMNV mostrou similaridade com outro vírus (*Giardia lamblia vírus*) membro da família Totiviridae (POULOS et al., 2006; NIBERT, 2007). O IMNV seria o único membro da Família Totiviridae que pode infectar invertebrados. O vírus causa necrose da musculatura estriada do abdômen e do cefalotórax. A opacidade da cauda no quinto segmento abdominal com aspecto leitoso é a condição clássica de manifestação da doença, além de haver apodrecimento das áreas afetadas, em estágios mais avançados. A progressão da doença se estende até o telson e aos urópodos (NUNES et al., 2004).

Marcadores moleculares no cultivo do L. vannamei

O desenvolvimento de marcadores genéticos baseados em DNA tem proporcionado grandes avanços para a aquicultura, no monitoramento da variabilidade genética e endocruzamento, na identificação de linhagens e relações de parentesco, e também na construção de mapas de ligação de altas densidades, que eventualmente permitirão a seleção de reprodutores baseados em características genéticas específicas (LIU; CORDES, 2004). Naturalmente, há uma tendência de reforçar os métodos de melhoramento tradicionais com a aplicação de marcadores moleculares para o camarão *L. vannamei*, ou seleção genômica. Esse tipo de aplicação vem aumentando a rentabilidade da indústria do camarão, a qual já registrou um aumento na precisão de seleção para animais resistentes a patógenos específicos até 2,6 vezes maior do que a simples seleção fenotípica de irmãos completos (CASTILLO-JUÁREZ et al., 2015). É necessário caracterizar e monitorar geneticamente as populações cultivadas e é especialmente útil a capacidade de identificar reprodutores com características genéticas favoráveis.

Atualmente os programas de seleção e melhoramento de espécies de interesse para aquicultura vem dando ênfase para aplicação de marcadores moleculares na formação e acompanhamento de linhagens. Os locos de caracteres quantitativos (*Quantitative Trait Locus* – *QTL*'s) são regiões do genoma do animal que estão relacionadas com características mensuráveis (resistência, crescimento, capacidade reprodutiva, entre outros) e podem ser identificados por experimentos que correlacionam desempenho zootécnico e desafios virais com marcadores mapeados geneticamente (GODDARD; HAYES, 2009; VILLANUEVA et al., 2011; CORREA et al., 2015). A metodologia mais aplicada neste contexto são os estudos associativos, que são fundamentais para confirmar a relação entre a característica-alvo e o marcador molecular de que se tem evidência para a seleção (LIU; CORDES, 2004).

Dentre os marcadores moleculares conhecidos, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) são os que têm o maior potencial para aplicação em processos de seleção assistido por marcadores (*Marker Assisted Selection* – *MAS*). Por definição, SNPs são mutações

em bases únicas na molécula de DNA que podem ou não estar ligadas a uma função biológica específica. Possuem uma alta estabilidade em todo o genoma e podem ser genotipados por meio de várias tecnologias (CAETANO, 2009). Os métodos de obtenção de quantidades grandes desse tipo de marcador passa pelas técnicas de sequenciamentos de nova geração. Por meio desta metodologia, pesquisas com o *L. vannamei*, num universo de centenas de milhares de SNPs encontrados, algumas dezenas destes polimorfismos apresentaram associação a características de interesse para o cultivo (CIOBANU et al., 2010; YU et al., 2015).

A busca de estudos associativos genótipo/fenótipo passa pela qualidade e confiança na técnica de genotipagem empregada. Muitas vezes o baixo rendimento de uma técnica de genotipagem exige uma série de repetições e otimizações para validar a metodologia empregada, levando tempo e recursos para chegar num resultado consistente. O polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP*), uma metodologia mais tradicional de genotipagem de SNP, tem como principais gargalos o não atendimento de demandas em grande escala e por possuir taxas de erro significativa, além de manipulação pós-PCR (JOHNSON; YUCESYOY; LUSTER, 2004).

As técnicas de genotipagem de SNPs de alto rendimento estão sendo empregadas desde estudos farmacogenéticos e na detecção de patógenos até programas de seleção para melhoramento animal (MHLANGA; MALMBERG, 2001). Uma destas técnicas são os ensaios de discriminação alélica por PCR em tempo real que tem como objetivo detectar um polimorfismo pontual por meio de sondas TaqMan-MGB alelo-específica. Estas são sondas moléculas marcadas com fluoróforos específicos que permitem reconhecer a diferença de alelos em uma única reação. Possuem alta especificidade e que emitem a cor correspondente a sua marcação quando ligado a sua sequência alvo (HADJINICOLAOU et al., 2009).

Variabilidade do gene HSP70

As proteínas de choque térmico (HSPs) são notavelmente conservadas em todos os organismos vivos. Essas proteínas realizam um papel importante no citosol celular, utilizando energia da quebra do ATP para desenovelar proteínas agregadas erroneamente do seu domínio de ligação e promover a conformação de proteínas recém-sintetizadas e deformadas (MAYER; BUKAU, 2005; MULTHOFF, 2007). Também são conhecidas por estarem envolvidas na resposta imunológica durante a infecção, sendo importantes para compreensão do sistema imune em muitos organismos (SONG et al., 2015). As HSPs são classificadas tomando como base seu peso molecular, como *HSP60*, *HSP70* e *HSP90*, sendo a *HSP70* a de maior interesse em pesquisa, pela sua natureza regulatória da resposta imune inata (HUA et al., 2014). São sintetizadas sob condições de estresse causadas por extremos de temperatura, depleção de energia celular, concentrações extremas de íons, gases, substâncias tóxicas, presença de metais pesados e ação de agentes infecciosos (MORRIS; THATJE; HAUTON, 2013).

A expressão de *HSP70* é frequentemente utilizada como biomarcador para estresses ambientais ou patológicos em *L. vannamei* (QIAN et al., 2012). A transcrição deste gene pode ser induzida por meio de injeção de diferentes bactérias na hemolinfa e no hepatopâncreas (ZHOU et al., 2010). Para enfermidades virais, há indícios que a *HSP70* pode estar envolvido como mediador de respostas imune do camarão *L. vannamei* contra o vírus da síndrome da macha branca (*White Spot Syndrome Virus – WSSV*) (LIN et al., 2011) e ao vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (*infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus – IHNV*) e o vírus da mionecrose infecciosa (*Infectious Mionecrosis Virus – IMNV*) (VIEIRA-GIRÃO et al., 2012).

Em muitos casos, genes relacionados ao sistema imune do camarão *L. vannamei* são tomados para prospecção de SNPs. Os loci T1361C, T1370C e A1419T do gene *nLvALF1* (Isoforma do gene do fator antilipopossacárido) apresentaram associação com a resistência ao vírus da síndrome da macha branca (WSSV) (LIU et al., 2014), mutações não-sinônimas de três SNPs na porção C-terminal da hemocianina alterou o fator aglutinante em sete bactérias

testadas (ZHAO et al., 2012) e o SNP C892T do gene HSP70 apresentou correlação positiva com os animais resistentes ao WSSV (FERREIRA-JUNIOR, 2014) e ao vírus da síndrome de Taura (TSV) (ZENG et al., 2008a). Considerando base nestes antecedentes, o presente estudo visou desenvolver um protocolo de genotipagem de SNPs por meio de qPCR para o gene *HSP70* em *Litopenaeus vannamei* e testar a associação do SNP C892T à resistência ao IMNV em duas linhagens comerciais melhoradas geneticamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Verificar a associação do polimorfismo C892T do gene *HSP70* em duas linhagens de camarão *L. vannamei* com a resistência/susceptibilidade ao vírus da mionecrose infecciosa por meio de ensaio de discriminação alélica por PCR em tempo real.

2.2 Específicos

- Avaliar o desempenho zootécnico de duas linhagens comerciais do camarão marinho *L. vannamei*, uma selecionada para o crescimento e outra selecionada para a resistência, frente ao desafio experimental com IMNV.
- Acompanhar o desenvolvimento da mionecrose infecciosa nas duas linhagens por quantificação das cópias virais ao longo do período de desafio, por meio de PCR em tempo real.
- Desenvolver metodologia de genotipagem de SNPs do gene *HSP70* por PCR em tempo real com sondas de hidrólise específicas.
- Avaliar a variabilidade genética das linhagens testadas por meio de conjuntos multiplex de microssatélites.
- Avaliar a frequência diferencial do SNP C892T do gene *HSP70*, nas categorias susceptível e resistente ao IMNV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de pós-larvas de *L. vannamei* e desempenho zootécnico

Pós-larvas de *L. vannamei* com idade de 10 dias foram adquiridas simultaneamente de duas empresas comerciais especializadas na produção de linhagens de crescimento (L.C) e linhagens de resistência ao vírus da mionecrose infecciosa (L.R). Foram transportadas e aclimatadas em tanques berçários no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA/CEAC/LABOMAR) até o peso de 2 g. Em seguida, 960 camarões de cada linhagem foram estocados em 24 tanques circulares independentes de polipropileno com um volume útil de 1m³, com densidade de 80 camarões/m³ distribuídos randomicamente. Cada tanque possuía uma entrada e saída de água e aeração contínua e mantidos ao ar livre, renovando de seu volume total aproximadamente 15% diariamente.

Os camarões foram alimentados com ração comercial (35% de PB) quatro vezes ao dia. Biometrias quinzenais foram realizadas para acompanhar as taxas de crescimento e ajuste dos tratamentos ofertados com as devidas correções, tomando como base um crescimento de 100 mg/dia/camarão e uma mortalidade estimada de 0,05% semanal para todos os tanques. Salinidade, temperatura e pH foram mensurados diariamente durante o experimento que teve período de duração de 65 dias. Dados de peso final e inicial foram coletados para a determinação do parâmetro de crescimento semanal.

2.2 Bioensaio de infecção experimental

Para o experimento de desafio foi utilizado um inóculo viral elaborado de acordo com Feijó *et al.* (2015), preparado a partir do músculo abdominal de camarões diagnosticados como positivo apenas para a Mionecrose Infecciosa. As amostras foram homogeneizadas em

tampão salino gelado (NaCl 330 mM, Tris 10 mM, pH 7,4) (1:10 p/v) e posteriormente centrifugadas a 4.000 g/30 min/4°C. O sobrenadante foi recuperado e novamente centrifugado a 8.000 g/30 min/4°C. O extrato viral obtido foi filtrado em membranas de 0,45 µm e 0,22 µm, respectivamente, e depois armazenados a -80°C (adaptado de Prior et al., 2003). Para confirmar a viabilidade do inóculo, foi realizado um experimento piloto com 100 juvenis com 8 g (±1) adquiridos no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA/CEAC/LABOMAR) distribuídos da seguinte forma; 50 camarões infectados com injeção intramuscular de 150 µl de inóculo viral contendo aproximadamente $9,98 \times 10^5$ cópias do IMNV; e 50 animais controle com injeção intramuscular de 150 µl de solução salina (NaCl 330 mM, Tris 10 mM, pH 7,4). Dados de mortalidade e sinais clínicos do IMNV confirmaram a viabilidade do inóculo utilizado (dados não demonstrados).

Após o período de crescimento, 500 camarões (±9g) de cada linhagem foram transferidos ao Laboratório de Bioensaios do Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM/CEAC/LABOMAR), onde foram aclimatados durante 7 dias em 6 tanques de 500 L com renovação contínua de água (100% ao dia). Os parâmetros físico-químicos da água foram mantidos em salinidade 30 g/L, 28°C, pH 7,2, OD 5,5 mg/L e condições naturais de fotoperíodo para a região nordeste do Brasil (12h de luz e 12h de escuro). Os animais foram pesados e distribuídos individualmente em 360 tanques plásticos (180 tanques/linhagem) de 5,5 L contendo aeração constante e renovação da água de 50% ao dia. Durante este período, foram coletados o pleópodo direito do quinto segmento abdominal, como *backup* de amostra biológica, com cauterização local.

Para o experimento de desafio, os 180 camarões de cada linhagem foram divididos em dois grupos (108 camarões/grupo de infecção e 72 camarões/ grupo controle) e diagnosticados por RT-qPCR para a determinação da carga viral inicial do IMNV de cada camarão. Os grupos foram tratados de acordo com a seguinte descrição: I) Tratamento L.R: injeção intramuscular de 150 µl de inóculo viral contendo aproximadamente $9,98 \times 10^5$ cópias do IMNV; II) Controle L.R: injeção intramuscular de 150 µl de solução salina (NaCl 330 mM, Tris 10 mM, pH 7,4). III) Tratamento L.C: injeção intramuscular de 150 µl de inóculo viral

contendo aproximadamente $9,98 \times 10^5$ cópias do IMNV; IV) Controle L.C: injeção intramuscular de 150 μ l de solução salina (NaCl 330 mM, Tris 10 mM, pH 7,4).

Ao longo do experimento, amostras de hemolinfa (~150 μ l) foram coletadas individualmente de 12 camarões/grupo randomicamente selecionados nos dias 0, 1, 3, 5, 10, 16, 23 e 30 após a injeção do inóculo viral. Após a coleta da hemolinfa, os camarões foram devolvidos aos seus respectivos tanques e não foram selecionados para a coleta subsequente. Os camarões foram observados sete vezes ao dia para o registro da mortalidade e coleta de tecido muscular para análises de genéticas. Durante os 30 dias de experimento, os camarões foram alimentados 2 vezes ao dia com uma ração comercial contendo 35% de PB em uma quantidade equivalente a 3,5% do peso corporal. Após o desafio viral, os dados de sobrevivência foram utilizados para a categorização diferencial das classes susceptíveis e resistentes de cada linhagem de camarão testada. Para cada grupo de infecção experimental os camarões situados nos quartis (25%) inicial e final da curva de mortalidade foram categorizados respectivamente como susceptíveis e resistentes.

2.3 Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído de amostras de tecido muscular de acordo com o protocolo PCI-Proteinase K descrito por Sambrook et al. (1989). Aproximadamente 100 mg músculo foi macerado e lavado com uma solução de Tris-HCl (10 mM, pH 7) e colocado em microtubos de 1,5 ml contendo 500 μ l de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, SDS 1%). Em seguida, adicionou-se 30 μ l de proteinase K (10 mg/ml) e misturou-se bem por inversão. As amostras foram incubadas a 55°C *overnight* até o tecido estar completamente digerido. Após a digestão do tecido, foi adicionado 500 μ l de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Invitrogen®) misturando-se por inversão durante 5 min. Para a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm/5 min. Uma alíquota de 450 μ l da fase aquosa superior foi transferida para outro microtubo tomando-se o cuidado para não perturbar a interface. Numa segunda etapa de purificação, 500 μ l de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1)

foram adicionados à amostra e misturou-se por inversão durante 5 min. As amostras foram novamente centrifugadas a 13.000 rpm/5 min e 450 µl da fase aquosa superior foi transferido para outro microtubo de 1,5 ml. Para precipitação do DNA, foram adicionados 1,0 ml de etanol absoluto (Merck®) e 50 µl de acetato de sódio às amostras, incubando-as a -20°C/30 min. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm/15 min a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão. As amostras foram então lavadas com 500 µl de etanol 70%, invertendo-se algumas vezes para posteriormente serem centrifugadas a 13.000 rpm/5 min. O etanol foi descartado cuidadosamente e os microtubos invertidos sobre um papel toalha afim de maximizar o processo de secagem a temperatura ambiente (15 a 25°C) por 10 minutos. O DNA foi ressuspensionado em 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e tratado com 2 µl de RNase (10 mg/ml). A integridade do DNA total extraído foi avaliada por corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, preparado em 150 ml de TAE (1×) (0,04 M Tris Base, 0,04 M Ac acético e 0,001 M EDTA) contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). O DNA total foi quantificado por fluorimetria usando o kit Qubit™ quantification assay (Invitrogen®) para dsDNA e padronizados para os procedimentos de genotipagem.

2.4 Extração de RNA e Síntese de cDNA

Os hemócitos de cada camarão coletado foram isolados do plasma por centrifugação a 1.200 g/10 min/4°C e o RNA total extraído com o reagente Trizol (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com DNase I por incubação a 37°C por 30 min e sua concentração foi determinada por quantificação fluorimétrica usando o kit Qubit™ Quantification Assay (Invitrogen®) para RNA. Antes da síntese do cDNA, o RNA foi aquecido a 100°C por 5 minutos para desnaturar o dsRNA e, posteriormente, resfriado em gelo. O cDNA foi sintetizado com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies®) em um volume de 20 µl de reação final contendo 2 µl de RT Buffer (10×), 0,8 µl de dNTPs mix (25×), 2 µl de RT random primers (10×), 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U) e 1 µg de RNA total. As amostras

foram incubadas em termociclador a 25°C/10 min, seguidos de 37°C/120 min e 85°C/5 min. O cDNA foi armazenado a -20°C até a sua utilização para as análises de quantificação viral por PCR em Tempo Real.

2.5 Quantificação Absoluta do IMNV por RT-qPCR

Para quantificação do número de cópias do IMNV ao longo do ensaio de desafio experimental foram utilizados os primers e sonda de Taqman descritos por Andrade et al. (2007). As reações de RT-qPCR foram realizadas em 10 µl de volume final contendo 5 µl de Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen®), 0,3 µl (10 µM) de cada primer IMNV412F (5'-GGACCTATCATACATAGCGTTTGCA-3') e IMNV545R (5'-AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT-3'), 0,15 µl (10µM) da sonda de hidrólise (IMNVp1) (5'-6FAM CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG TAMRA-3'), 0,2 µl (50×), 1 µl (10-25 ng) de cDNA e 3,05 µl de água ultrapura (Invitrogen®). Um controle negativo contendo todos os reagentes, exceto o cDNA alvo e uma série de diluições do controle positivo pTOPO-IMNV.1 equivalente a 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ e 10² cópias do IMNV foram adicionados a cada placa de RT-qPCR. O controle positivo pTOPO-IMNV.1 consistiu de uma construção genética resultante da ligação de um amplicon de 593 pb do IMNV (N° de acesso no GenBank: AY570982, nt 197-789) ao pCR® 2.1-TOPO vector (Invitrogen®).

Para a quantificação do número de cópias do IMNV foi empregada a plataforma 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems®). As condições de ciclagem foram as seguintes: incubação a 50°C por 2 min, seguido da ativação da Platinum®Taq DNA polymerase a 95°C por 2 min, e 40 ciclos de 15 s a 95°C e 30 s a 60°C. Os dados foram coletados durante a etapa de extensão final (60°C). O número de cópias virais de cada amostra foi determinado de acordo com o *software* SDS 1.3.1 (Applied Biosystems®). Todas as amostras foram testadas em duplicata e somente consideradas positivas quando da amplificação válida de ambas as réplicas.

2.6 Genotipagem de SNPs por RT-qPCR

Para a análise de discriminação alélica do SNP do gene *HSP70* (nº de acesso: AY645906) foi utilizada a plataforma ABI 7500 Real Time Systems (Applied Biosystems®) e o kit comercial TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems®). As classes susceptíveis e resistentes de cada linhagem de camarão (L.C e L.R) desafiada com o IMNV foram investigadas a partir da utilização de sondas MGB alelo-específica contendo os fluoróforos VIC e FAM para a identificação do polimorfismo alélico. Cada reação foi constituída de 12,5 µL de tampão universal PCR master mix (2X), 0,5 µL (10mM) da solução contendo primers (Forward e Reverse) e sondas MGB alelo-específico (VIC e FAM), 9,0 µL de água ultrapura e 3 µL de amostra de DNA. A amplificação efetivada foi realizada utilizando a seguinte ciclagem: 50°C/2 min, 95°C/10 min e 40 ciclos de 95°C/15 s e 60°C/1 min. Os primers e sondas MGB para genotipagem foram desenhadas a partir do software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems®) (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 - Primers e sondas MGB alelo-específica utilizados para a discriminação alélica do gene *HSP70* para o SNP C982T em camarões *L. vannamei* resistentes e susceptíveis ao IMNV pertencentes a linhagem de crescimento (L.C) e linhagem de resistência (L.R) experimentalmente.

Primers (5'-3')	Sondas MGB (5'-3')
ACACAGGCCAGCGTGGA	FAM-TCGATTTCTACACCTCT <u>T</u> AT-MGB
TCGAAGCGAGCACGGG	VIC-CGATTTCTACACCTCC <u>C</u> AT-MGB

Negrito e sublinhado: polimorfismo simples (SNP)

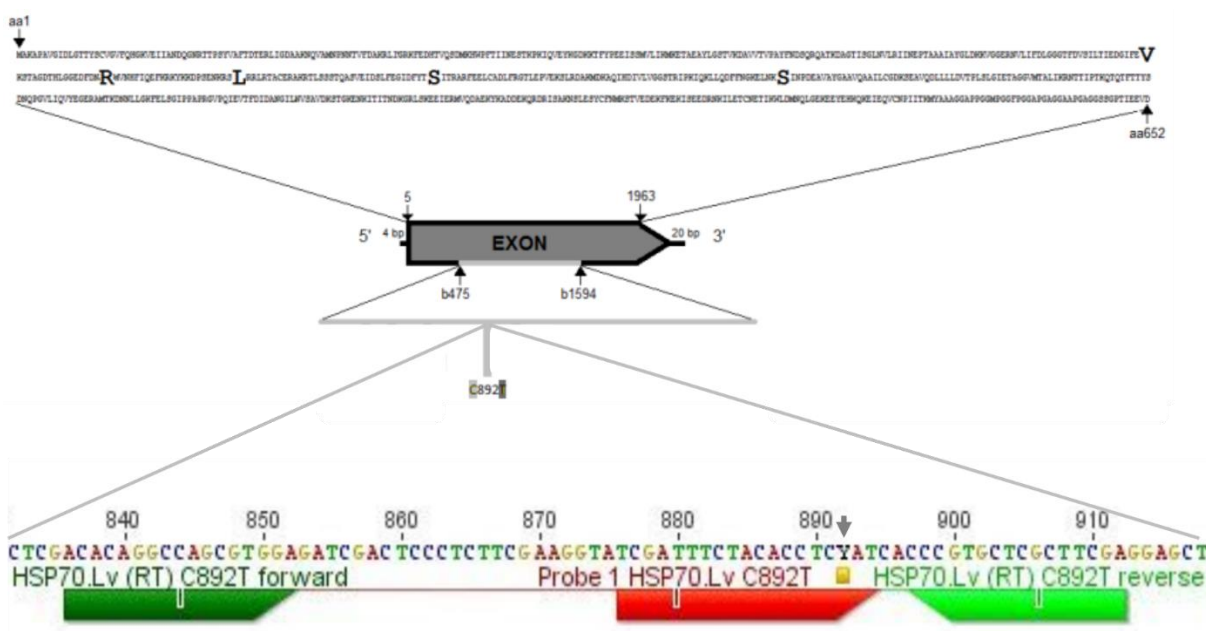


Figura 1 – Diagrama esquemático do gene HSP-70 para o *L. vannamei* (Adaptado de FERREIRA-JUNIOR, 2014) indicando a posição dos primers (verde) e sondas (vermelho) utilizados para o ensaio de discriminação alélica do SNP C892T (seta) por PCR em tempo real. As duas sondas de genotipagem estão sobrepostas na representação e região exônica mais clara indica o fragmento do gene.

2.7 Análise de Variabilidade Genética por Marcadores Microsatélites Multiplex

O conjunto multiplex desenvolvido por Forte (2014) foi utilizado para avaliar a variabilidade genética das duas linhagens. O conjunto consiste de nove locos agrupados em três conjuntos. Dentre estes, cinco locos (Tabela 2) puderam ser utilizados para a análise da variabilidade genética das linhagens selecionadas para o crescimento (L.C) e para a resistência ao IMNV (L.R). Os marcadores microsatélites, dentro de cada conjunto de PCR, foram marcados com os fluoróforos HEX (verde) e 6-FAM (amarelo) (SCHUELKE, 2000).

Tabela 2 - Locos utilizados para a genotipagem de linhagens de camarões *L. vannamei* selecionados para o crescimento (L.C) e para a resistência ao IMNV (L.R). Conjuntos definidos por (FORTE, 2014).

Microssatélites (ID)		Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
Conjunto PCR 1	TUMXL8.256	Forward: *GGA CTCACACTTCTGGTTC Reverse: GGCTGCACCTTGTAAGTC	184
	TUMXL8.32	Forward: *TTACCGCCTAAGAGCGAATG Reverse: TGTCCTTTCGTACCAGTCAAG	238
	PVAN0013	Forward: *TGCTCTGGTAACGACAAACG Reverse: AGACCTGTGGCGAAGTGC	302
Conjunto PCR 2	CNM-MG421	Forward: *TTTCTGCCACGGAGTT Reverse: CTGTTGCCCAAATAGC	162
	PVAN1003	Forward: *ATATTTTCATGCGTTCCGAGG Reverse: GACTATCTCACGCGCCTCTC	167

*Cauda M13 (TGTA AAAACGACGGCCAGT)

As reações de PCR triplex foram realizadas em um volume final de 10 µL, contendo Qiagen Multiplex PCR Master Mix (2X), 0,3 µM do primer mix (2,94 µM de forward, 3 µM de reverse e 0,06 µM da cauda fluorescente) e 200 ng de DNA genômico. O protocolo de ciclagem foi nas seguintes condições: desnaturação a 94°C/4 minutos, seguidos 35 ciclos de 94°C/30 s, 56°C/45 s e 72°C/60 s, 8 ciclos de 53°C/45 s e 72°C/45 s, e uma extensão final a 72°C/30 s. Os produtos obtidos foram genotipados no sequenciador automático capilar ABI3500 (Applied Biosystems, CA, USA) com o marcador de peso molecular GS-600 LIZ®.

2.8 Análise de dados

Os dados de desempenho zootécnico foram avaliados pela análise de variância de duas vias (*Two-way Analysis of Variance*, ANOVA), para os dados de crescimento, e ANOVA de uma via, para os dados de qualidade de água ($P < 0,05$). Para os dados de mortalidade foi aplicado o teste de Log-Rank estimado pela metodologia Kaplan-Meier para curva de sobrevivência, na verificação de diferenças nos níveis de sobrevivência entre os grupos infectados e controle de cada linhagem testada. Para a análise das diferenças do número de cópias do IMNV foi empregada ANOVA unifatorial com comparações pareadas com o Tempo 0 de cada grupo. Os testes estatísticos foram realizados com o software *GraphPad Prism 3.00 for Windows* (GraphPad Software, USA).

Os dados de genotipagem do SNP C892T, categorizado dentro dos grupos susceptíveis e resistentes de cada linhagem, foram analisados usando o *software SNPStats* (SOLE et al., 2006). Os dados de genotipagem multiplex dos microssatélites com as frequências alélicas, genotípicas, equilíbrio de Hardy-Weinberg, F_{IS} e F_{ST} foram obtidos com o auxílio do programa GENEPOP 4.2 (ROUSSET, 2008).

3. RESULTADOS

3.1 Qualidade de água e desempenho zootécnico das linhagens

Durante o período de crescimento dos camarões, não foram observadas diferenças estatísticas nos parâmetros de qualidade de água. Salinidade, pH e temperatura se mantiveram em torno de $35,0 \pm 1,97$ g/L, $8,0 \pm 0,22$ pH e $30,0 \pm 0,94$ °C, respectivamente ($P > 0,05$; ANOVA).

As linhagens estocadas obtiveram taxas de crescimento semanal diferentes. Em L.C foi observado uma maior taxa de crescimento $1,18 \pm 0,12$ g por semana. Já L.R teve uma taxa de $0,97 \pm 0,05$ g por semana, observando diferença estatisticamente significativa entre as linhagens ($P < 0,05$; ANOVA). Os valores de sobrevivência das duas linhagens nesta fase crescimento foram acima de 92%, e não foi observada diferença significativa entre eles ($P > 0,05$; ANOVA).

3.2 Taxas de sobrevivência das linhagens infectadas com IMNV

Os dados de sobrevivência das linhagens testadas sob desafio viral com IMNV estão apresentados na Figura 2. Os grupos infectados de cada linhagem obtiveram curvas distintas de sobrevivência, sendo observado que o grupo L.C infectado apresentou elevadas taxas de mortalidade a partir do 5º dia pós infecção até chegar ao 12º dia com 0% de sobrevivência. O grupo L.R infectado ao final do Bioensaio apresentou uma taxa de sobrevivência de 13%. As curvas de sobrevivência dos grupos controle injetados com solução salina apresentaram também curvas distintas, contabilizado uma sobrevivência de 70% L.C e de 90% para L.R. Todas as curvas de sobrevivência apresentaram diferença estatística entre si ($P < 0,05$).

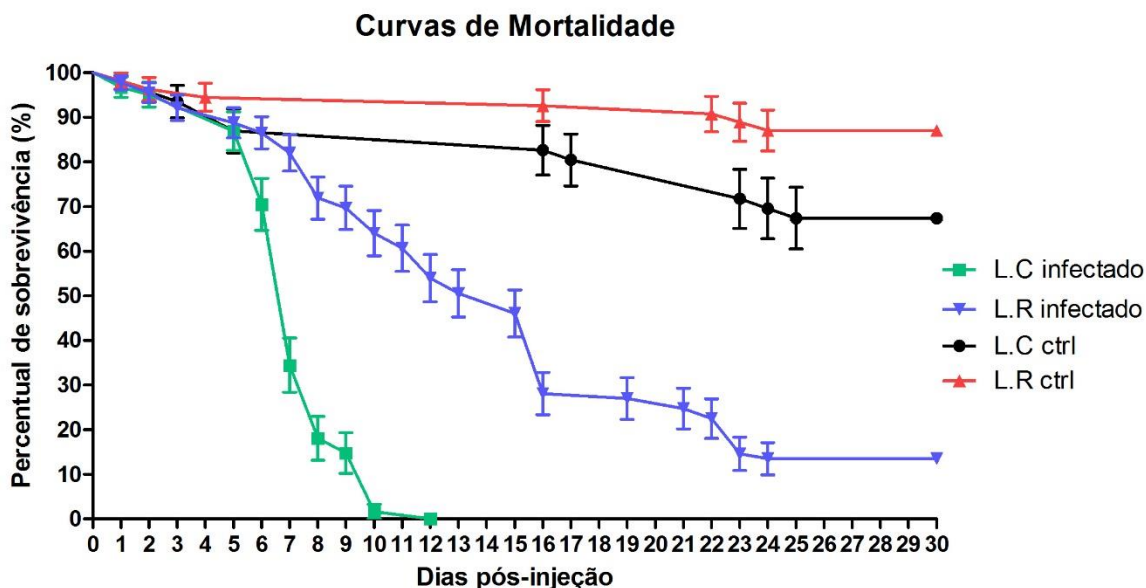


Figura 2. Percentual de sobrevivência da linhagem de Crescimento (L.C infectado e L.C controle) e da linhagem Resistente (L.R infectado e L.R controle) de camarões *L. vannamei* ao longo de 30 dias após a injeção de $9,98 \times 10^5$ cópias do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e seus respectivos controles injetados com solução salina.

3.3 Quantificação viral do IMNV por RT-qPCR

Foi observado que as pós-larvas de 10 dias obtidas de cada larvicultura já se mostravam positivas no diagnóstico do vírus, com médias de $1,69 \times 10^2$ e $5,96 \times 10^2$ cópias do IMNV/ μg de RNA para L.C e L.R, respectivamente. Esta carga basal permaneceu constante durante o período pré-desafio (berçário, aclimatação e povoamento em tanques individuais).

Não houve diferença estatística entre as cargas virais de L.C e L.R dois dias antes da injeção do inóculo do vírus e da solução salina ($P > 0,05$). Após a injeção do inóculo viral e solução salina, houve um claro aumento no número de cópias virais nos grupos L.C e L.R infectados. Para o grupo L.C infectado foi observada significância estatística no 5º e 10º dia pós-injeção ($P < 0,0001$), com médias de $6,65 \times 10^6$ cópias do IMNV/ μg de RNA e $9,97 \times 10^6$

cópias do IMNV/ μg de RNA, respectivamente. Em L.R observou-se o mesmo padrão de aumento de carga viral até o 10^o dia, se estabilizando até o 30^o dia com quantidades médias de $2,06 \times 10^6$ cópias virais do IMNV/ μg de RNA (Figura 3)

Os grupos L.C e L.R controles não apresentaram evolução da replicação viral em todo período do experimento, chegando no 30^o dpi com quantidades médias de $4,9 \times 10^2$ e $6,5 \times 10^2$ cópias virais do IMNV/ μg de RNA, respectivamente.

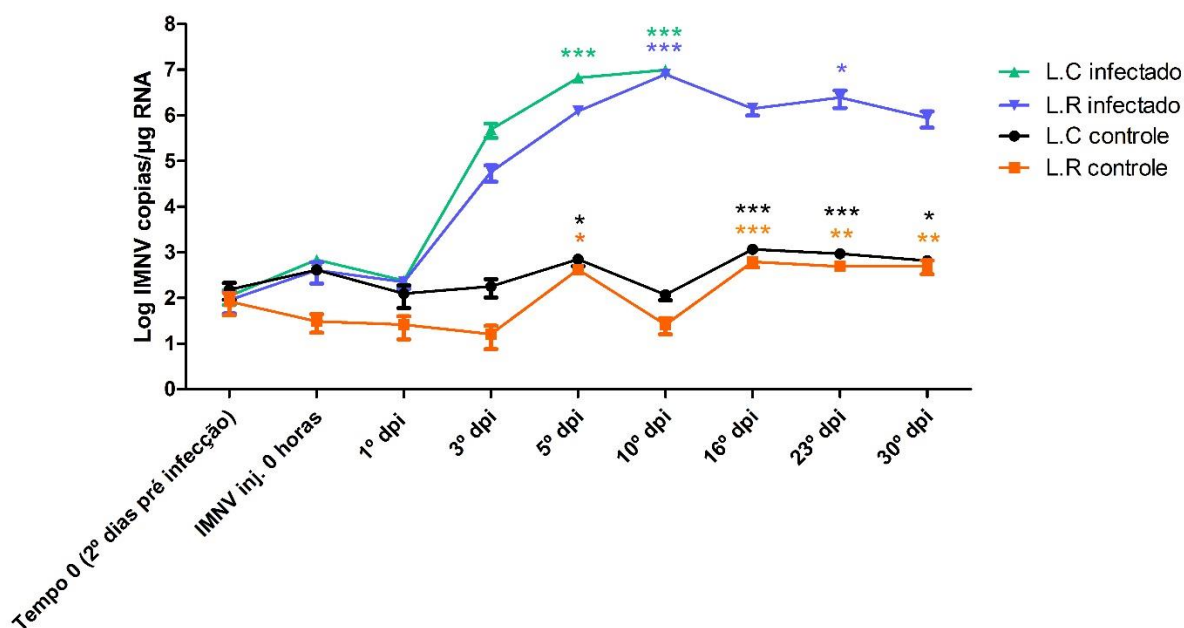


Figura 3 – Número de cópias do IMNV em hemócitos do *Litopenaeus vannamei* injetados com $9,98 \times 10^5$ cópias do IMNV e seus respectivos controles injetados com solução salina. Os dados são apresentados pelas médias \pm SEM (n=12 camarões amostrados em cada ponto de coleta). Os asteriscos indicam significância estatística entre as diferenças dos dados durante o tempo de desafio (*P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.0001).

3.4 Associação do polimorfismo do SNP C892T com a susceptibilidade/resistência ao IMNV

A técnica de genotipagem utilizando a plataforma de PCR em tempo real discriminou os genótipos em clusters, como mostra a representação gráfica (Figura 4) e confirmadas por sequenciamento automático (ANEXO A). Independente da linhagem analisada, houve associação do marcador molecular empregado com os grupos susceptível e resistente ao IMNV (tabela 3). Em L.R houve um maior número de homozigotos CC e não houve indivíduos com o genótipo TT, porém a frequência do alelo T (11%) foram todos observados dentro da categoria de animais resistentes ao vírus, tendo significância estatística tanto para as frequências genotípicas e alélicas ($P < 0,05$). Em L.C também se observou uma maior frequência do alelo T no grupo resistente desta linhagem (22%), e a presença do genótipo TT (2%), não verificado em L.R. Tanto as frequências alélicas como genotípicas mostraram significância estatística para a segregação de T no grupo de resistência da linhagem ($P < 0,05$).

Analisando conjuntamente os grupos susceptível e resistente das duas linhagens, observou-se uma maior significância do teste χ^2 ($P < 0,001$), em relação à os resultados individuais de cada linhagem para o grupo de resistência (15%).

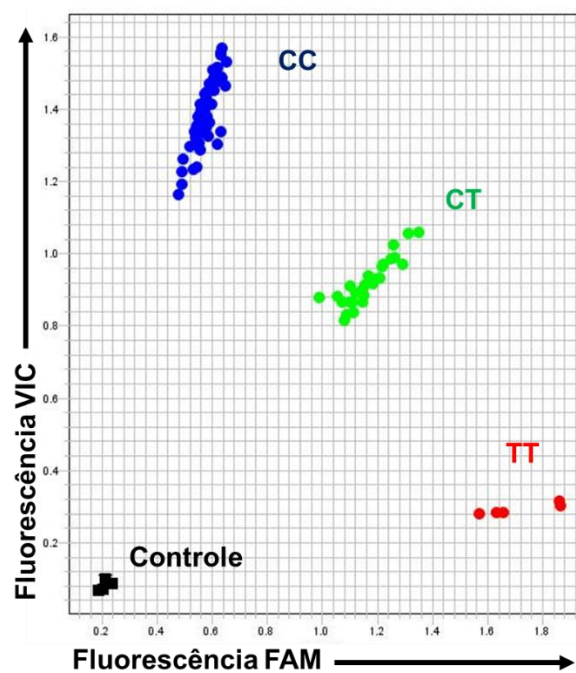


Figura 4: Plot de amplificação dos dois parâmetros de fluorescência das sondas de hidrólise do SNP C892T do gene *HSP70* discriminando os três genótipos mais o controle. Dados de 45 amostras selecionadas randomicamente.

Tabela 3 – Distribuição de alelos e genótipos do SNP C892T do gene *HSP70* nos grupos resistentes e susceptíveis de L.R L.C. Sus e Res são abreviaturas para Susceptível e Resistente, respectivamente.

Linhagens Grupos		Genótipos (n)			x ²	Alelos (n)		x ²
		CC	CT	TT	p-valor	C	T	p-valor
L.R	Sus	24 (1)	0 (0)	0 (0)	0,014*	48 (1)	0 (0)	0,017*
	Res	22 (0,85)	6 (0,15)	0 (0)		50 (0,89)	6 (0,11)	
L.C	Sus	18 (0,95)	1 (0,05)	0 (0)	0,030*	37 (0,97)	1 (0,03)	0,010*
	Res	11 (0,61)	6 (0,33)	1 (0,06)		28 (0,78)	8 (0,22)	
L.R+ L.C	Sus	42 (0,98)	1 (0,02)	0 (0)	0,003*	85 (0,99)	1 (0,01)	0,0007**
	Res	33 (0,72)	12 (0,26)	1 (0,02)		78 (0,85)	14 (0,15)	

***P<0,05 **P<0,001**

3.5 Análise da variabilidade genética

Os dados de heterozigosidade (H_e e H_o) e o índice de endogamia (F_{is}) estão apresentados na tabela 4. Todos os locos apresentaram significativos índices de endogamia e uma baixa índice de heterozigotos, exceto para o marcador TUMXLV8.256. As frequências

alélicas de cada loco diferiram significativamente entre as duas linhagens, exceto para CMN-MG421 (figura 5).

Os marcadores PVAN0013 e TUMXLV8.32 apresentaram a ocorrência de um único genótipo homozigoto (100%) dentro de L.R, não sendo possível obter dados de heterozigosidade para esta análise.

Tabela 4. Variabilidade genética das duas linhagens *L. vannamei* por cinco loci de microssatélites.

População	Locus					Média
	CNM-MG421	PVAN1003	PVAN0013	TUMXLV8.256	TUMXLV8.32	
L.C (n=45)						
H_o	0,2889	0,1556	0,2222	0,2000	0,1111	0,196
H_e	0,3714	0,1848	0,5327	0,4426	0,4174	0,3898
F_{is}	0,2245	0,1600	0,5863	0,5516	0,7366	0,4518
<i>P-valor</i>	0,0001	0,0304	0,0000	0,0000	0,0000	
L.R (n=37)						
H_o	0,1081	0,2432	0,0270	0,0541	0,0000	0,0865
H_e	0,3243	0,2936	0,0270	0,0533	0,0000	0,1397
F_{is}	0,6702	0,1735	0,0000	-0,0141	-	0,2074
<i>P-valor</i>	0,0001	0,2883	-	1	-	-
F_{st}	-0,0100	0,0406	0,4514	0,1885	0,3036	0,1948

N indica o número de indivíduos; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; F_{is} : índice de endogamia; F_{st} : índice de diferenciação genética; *P-valor*: probabilidade de ajuste do EHW (método de Fisher; valores significativos estão em negrito, após a correção de Bonferroni $P < 0,05$ (RICE, 1989)).

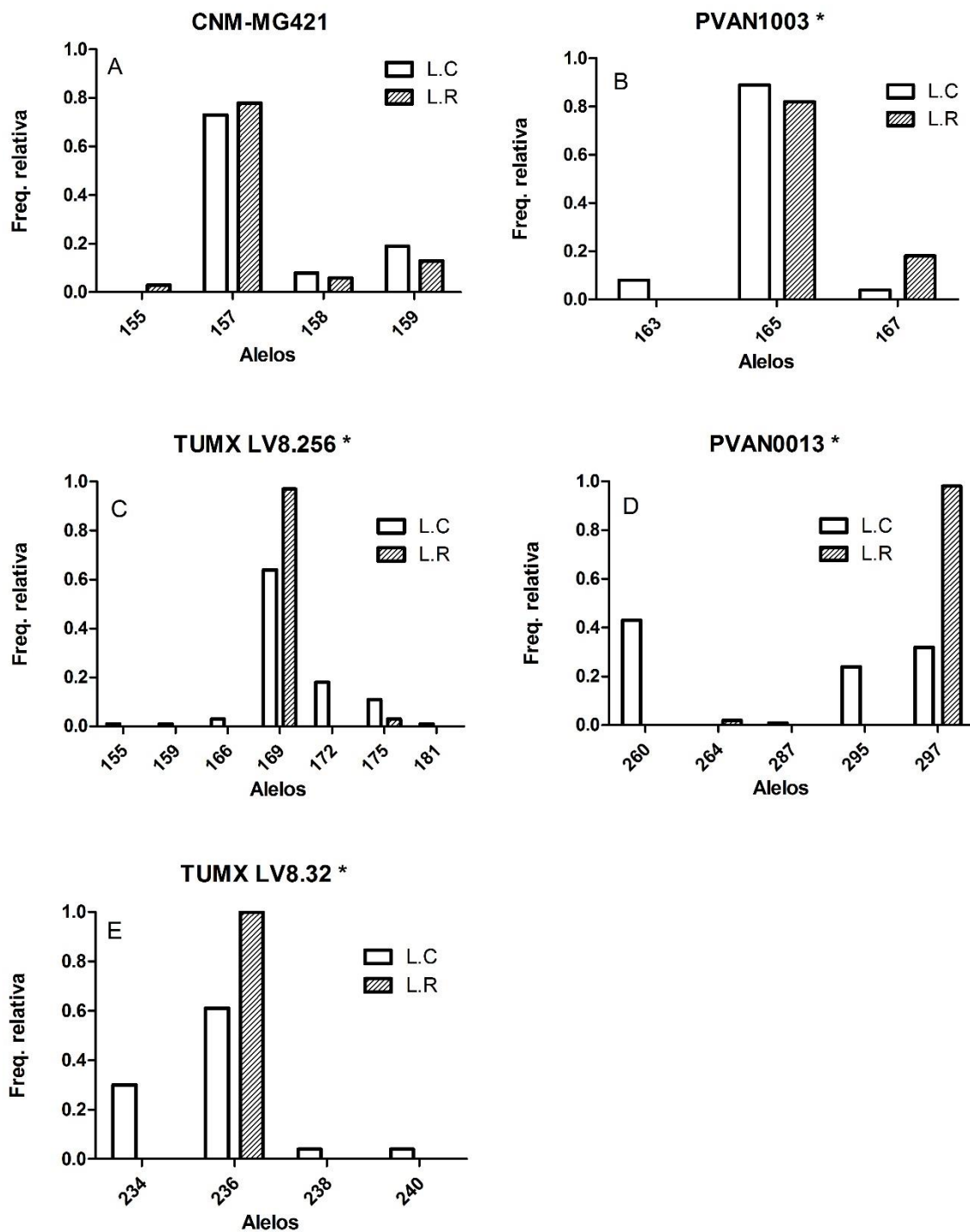


Figura 5 – Frequência alélica relativa dos cinco loci genotipados por painel multiplex composto dos microssatélites: A) CNM-MG421; B) PVAN1003; C) TUMX LV8.256; D)

PVAN0013 e E) TUMX LV8.32. L.C e L.R são abreviaturas de linhagem de crescimento e linhagem de resistência, respectivamente. * $P < 0,05$ pelo Teste G independente por loco.

4 DISCUSSÃO

A técnica de PCR em tempo real possibilitou o desenvolvimento deste trabalho em duas vertentes, a quantificação absoluta do IMNV e o ensaio de discriminação alélica por sondas de hidrólise. Esta tecnologia permitiu a obtenção de genótipos para a associação com a resistência de camarões pertencentes a linhagens comerciais selecionadas para o crescimento (LC) e para resistência (LR). Na genotipagem de SNPs por PCR em Tempo Real, a amplificação gênica a partir da utilização de sondas alelo-específicas possui uma baixa taxa de erro da discriminação do alelo em relação a outras ferramentas moleculares, como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e o sequenciamento do DNA (JOHNSON; YUCESYOY; LUSTER, 2004).

No presente estudo, foi observada uma relação fenotípica inversa entre L.C e L.R com relação aos parâmetros de crescimento e resistência, sendo verificada maior taxa de crescimento/baixa resistência na L.C e baixa taxa de crescimento/alta resistência na L.R. Este tipo de correlação negativa é relatado em vários trabalhos que vêm na seleção de resistência a um patógeno específico perdas de outras características de interesse zootécnico, como crescimento, capacidade reprodutiva, dentre outras (ARGUE et al., 2002; MOSS et al., 2007; COCK et al., 2009; CUÉLLAR-ANJEL et al., 2012; CABALLERO-ZAMORA et al., 2015). Os grupos controle de L.C e L.R apresentaram curvas de sobrevivência distintas, registrando 70% e 90% de sobrevivência, respectivamente. Além de mais susceptível ao desafio experimental com o IMNV, L.C aparentemente pode ser mais frágil a cargas virais baixas, em torno de 10^3 , ou ao manejo empregado no Bioensaio.

Ao longo do desafio com o IMNV, a evolução da carga viral foi similar entre os grupos infectados das duas linhagens. Consequentemente, os grupos selecionados como susceptíveis de ambas as linhagens apresentaram uma carga viral entre 10^3 à 10^5 cópias de IMNV/ μ g de RNA, enquanto os grupos resistentes exibiram carga viral entre 10^6 à 10^7 cópias. MOSS et al., (2005) afirma que conhecimento da carga viral nos diferentes estágios de infecção pode levantar informações valiosas acerca da resistência/susceptibilidade de camarões em processo de seleção. Resultados similares da evolução da carga viral do IMNV em camarões L.

vannamei infectados experimentalmente foram verificados por Feijó et al., (2015) que evoluiu de $3,81 \times 10^3$ cópias no 1º dia pós infecção para $3,01 \times 10^7$ cópias no 15º dia, registrando mortalidade de 100% no 20º dia.

Embora apenas a curva de mortalidade tenha sido o critério de atribuição dos grupos susceptíveis e resistentes, a carga viral corrobora com este critério de seleção. A imputação da carga viral para seleção de animais resistentes por meio de desafios experimentais é uma ferramenta auxiliar para estabelecer critérios na formação de linhagens, aliados aos dados de mortalidade. Apenas o aumento de sobrevivência ao longo de gerações, não pode ser considerado o único critério seletivo para associação de marcadores moleculares, visto que esta variável concede apenas duas respostas possíveis, limitando-se sua aplicação para estudos em genética e genômica. Observar as variáveis contínuas, como a evolução do patógeno e o tempo de resistência ao desafio, devem ser considerados para atribuir características genéticas a linhagem em estudo (MOSS; DOYLE; LIGHTNER, 2005; COCK et al., 2009).

O SNP C892T observado no gene *HSP70* tem sido associado com resistência a certas enfermidades virais de camarão. Em um experimento com vírus da síndrome de Taura (*Taura Syndrome Virus, TSV*) 21% dos animais resistentes apresentaram o alelo T; em camarões desafiados com o vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus, WSSV*) 23% dos animais resistentes apresentaram o genótipo TT (ZENG et al., 2008b, JUNIOR, 2014). O SNP C892T apresentou associação alélica e genotípica significativa entre os grupos susceptíveis e resistentes ao IMNV em ambas as linhagens de *L. vannamei* testadas. L.C e L.R mostraram que 33% e 15% dos animais resistentes possuíam o genótipo CT, respectivamente. Em relação às frequências alélicas, a presença do alelo T em L.C e L.R foi de 22% e 11%, respectivamente. Os resultados aqui apresentados sustentam a hipótese de uma associação entre esse marcador com a resistência a doenças virais em camarões marinhos. Contudo, nenhum estudo relacionou os polimorfismos do gene *HSP70* com a imunologia desde camarão, apesar da existência de associação da proteína *HSP70* com a ativação de mecanismos de defesas antivirais do *L. vannamei* (HUA et al., 2014).

Ao contrário do que poderia ser esperado, o alelo T do SNP C982T foi menos frequente na L.R quando comparado com a L.C. Porém a frequência do alelo T foi

significativamente mais elevada nos grupos resistentes de ambas linhagens. A análise da variabilidade genética revelou diferenças entre as duas linhagens. L.R apresentou uma menor variabilidade genética em relação a L.C. De acordo HUANG et al. (2012), a obtenção de linhagens resistentes a patógenos específicos passa, necessariamente, por uma seleção de indivíduos aparentados e que possa transmitir essa característica dentro dos programas de melhoramento. Desta forma o polimorfismo de determinadas regiões do genoma fica comprometido em populações já estabelecidas (BEAUMONT; BOUDRY; HOARE, 2010).

5 CONCLUSÕES

- ✓ Foi observada uma relação inversa entre os fenótipos de crescimento e resistência para as linhagens testadas, sendo L.C em geral significativamente mais susceptível à infecção experimental;
- ✓ A evolução do vírus foi similar em ambas as linhagens com um pico de cópias virais observados 10 dias após infecção experimental;
- ✓ A técnica de genotipagem do gene *HSP70* por PCR em tempo real, desenvolvida para o *L. vannamei*, foi efetiva para a associação do marcador com a resistência ao IMNV;
- ✓ A análise de locos de microssatélites revelou baixa variabilidade genética de L.R em relação a L.C;
- ✓ O SNP C892T do gene *HSP70* mostrou-se significativamente associado à resistência/susceptibilidade ao IMNV em ambas as linhagens de camarões testadas sob desafio experimental controlado;

REFERÊNCIAS

ANDRADE, T. P. D.; SRISUVAN, T.; TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 9–15, abr. 2007. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848606008878>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

ARGUE, B. J.; ARCE, S. M.; LOTZ, J. M.; MOSS, S. M. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus.

Aquaculture, v. 204, n. 3-4, p. 447–460, fev. 2002. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848601008304>>. Acesso em: 16 jan. 2016.

BEAUMONT, A.; BOUDRY, P.; HOARE, K. Genetic Variation of Traits. In: **Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2010. p. 99–128.

CABALLERO-ZAMORA, A.; H.MONTALDO, H.; CAMPOS-MONTES, G. R.; CIENFUEGOS-RIVAS, E. G.; MARTÍNEZ-ORTEGA, A.; CASTILLO-JUÁREZ, H. Genetic parameters for body weight and survival in the Pacific White Shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* affected by a White Spot Syndrome Virus (WSSV) natural outbreak.

Aquaculture, v. 447, p. 102–107, out. 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848614004207>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 64–71, 2009.

CASTILLO-JUÁREZ, H.; CAMPOS-MONTES, G. R.; CABALLERO-ZAMORA, A.; MONTALDO, H. H. Genetic improvement of Pacific white shrimp [*Penaeus* (*Litopenaeus*)

vannamei]: perspectives for genomic selection. **Frontiers in genetics**, v. 6, n. March, p. 93, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25852740>>.

CIOBANU, D. C.; BASTIAANSEN, J. W. M.; MAFRIN, J.; ROCHA, J. L.; JIANG, D. H.; YU, H.; GEIGER, B.; DEEB, N.; ROCHA, D.; GONG, H.; KINGHORN, B. P.; PLASTOW, G. S.; VAN-DER-STEEN, H. A. M.; MILEHAM, A. J. A major SNP resource for dissection of phenotypic and genetic variation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Animal Genetics**, v. 41, n. 1, p. 39–47, 2010.

COCK, J.; GITTERLE, T.; SALAZAR, M.; RYE, M. Breeding for disease resistance of Penaeid shrimps. **Aquaculture**, v. 286, n. 1-2, p. 1–11, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.011>>.

CORREA, K.; LHORENTE, J. P.; LÓPEZ, M. E.; BASSINI, L.; NASWA, S.; DEEB, N.; GENOVA, A. Di; MAASS, A.; DAVIDSON, W. S.; YÁÑEZ, J. M. Genome-wide association analysis reveals loci associated with resistance against *Piscirickettsia salmonis* in two Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) chromosomes. **BMC Genomics**2, p. Unpublished, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2038-7>>.

CUÉLLAR-ANJEL, J.; WHITE-NOBLE, B.; SCHOFIELD, P.; CHAMORRO, R.; LIGHTNER, D. V. Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. **Aquaculture**, v. 368-369, p. 36–39, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848612005297>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. [s.l: s.n.]v. 2014

FEIJÓ, R. G.; MAGGIONI, R.; MARTINS, P. C. C.; ABREU, K. L. de; OLIVEIRA-NETO, J. M.; GUERTLER, C.; JUSTINO, E. B.; PERAZZOLO, L. M.; MARINS, L. F. RNAi-based inhibition of infectious myonecrosis virus replication in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 114, n. 2, p. 89–98, 2015. Disponível em: <<http://www.int-res.com/abstracts/dao/v114/n2/p89-98/>>.

FERREIRA-JUNIOR, A. L. **Análise de polimorfismos de nucleotídeos únicos (snps) do gene hsp70 em populações de litopenaeus vannamei comercializadas no brasil dissertação.** 2014. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/128925>>.

FORTE, J. M. **Aplicações de marcadores moleculares nas principais espécies da aquicultura do nordeste brasileiro.** 2014. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ INSTITUTO, 2014. Disponível em: <<http://www.repositoriobib.ufc.br/00001a/00001ab5.pdf>>.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 6, p. 381–391, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg2575>>.

HADJINICOLAOU, A. V.; DEMETRIOU, V. L.; HEZKA, J.; BEYER, W.; HADFIELD, T. L.; KOSTRIKIS, L. G. Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* isolates. **Journal of microbiological methods**, v. 78, n. 1, p. 45–53, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701209001158>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

HUA, B.; PHUOC, L. H.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Bacterial HSP70 (DnaK) is an efficient immune stimulator in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 418-419, p. 87–93, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848613005176>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

JOHNSON, V. J.; YUCESYOY, B.; LUSTER, M. I. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. **Cytokine**, v. 27, n. 6, p. 135–141, 2004.

LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; READMAN, R. M.; ANDRADE, T. P.; BONAMI, J. R. Infectious Myonecrosis- New Disease in Pacific White Shrimp. **Global Aquaculture Advocate**, n. October 2004, p. 85, 2005.

LIN, Y.-R.; HUNG, H.-C.; LEU, J.-H.; WANG, H.-C.; KOU, G.-H.; LO, C.-F. The role of aldehyde dehydrogenase and hsp70 in suppression of white spot syndrome virus replication at high temperature. **Journal of virology**, v. 85, n. 7, p. 3517–3525, 2011.

LIU, J.; YUA, Y.; LI, F.; ZHANG, X.; XIANG, J. A new anti-lipopolysaccharide factor (ALF) gene with its SNP polymorphisms related to WSSV-resistance of *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 39, n. 1, p. 24–33, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769128>>.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, n. 1-4, p. 1–37, 2004.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 62, n. 6, p. 670–84, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2773841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

MHLANGA, M. M.; MALMBERG, L. Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 463–471, 2001.

MORRIS, J. P.; THATJE, S.; HAUTON, C. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 6, p. 1494–1502, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/mec.12216>>.

MOSS, D. R.; ARCE, S. M.; OTOSHI, C. A.; DOYLE, R. W.; MOSS, S. M. Effects of inbreeding on survival and growth of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**, v. 272, p. 30–37, 2007.

MOSS, S. M.; DOYLE, R. W.; LIGHTNER, D. V. Breeding shrimp for disease resistance: challenges and opportunities for improvement. **Diseases in Asian aquaculture 5: proceedings of the fifth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 24-28 November 2002, Queensland, Australia.**, p. 379–393, 2005. Disponível em:

<<http://search.proquest.com/docview/19380080?accountid=14643>\nhttp://mlbsfx.sibi.usp.br:3410/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-

2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:book&genre=conference&sid=ProQ:Aquatic+Science+&+Fisheries+Abstracts+(ASFA)+Aquaculture+Abstracts&ati>.

MULTHOFF, G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 43, n. 3, p. 229–37, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202307001314>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

NIBERT, M. L. “2A-like” and “shifty heptamer” motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 4, p. 1315–1318, 2007.

POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D. V. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 4, p. 987–996, 2006. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.81127-0>>.

PRIOR, S; BROWDY, C. L; SHEPARD, E. F; LARAMORE, R; PARNELL, P. G. Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, n. 2, p. 89–96, 2003.

QIAN, Z.; LIU, X.; WANG, L.; WANG, X.; LI, Y.; XIANG, J.; WANG, P. Gene expression profiles of four heat shock proteins in response to different acute stresses in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 156, n. 3-4, p. 211–20, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045612000671>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

RICE, W. R. Analyzing Tables of Statistical Tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223–225, 1989. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2409177>>.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 103–106, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>>.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. February, p. 233–234, 2000.

SENAPIN, S.; PHIWSAIYA, K.; GANGNONNGIW, W.; FLEGEL, T. W. False rumours of disease outbreaks caused by infectious myonecrosis virus (IMNV) in the whiteleg shrimp in Asia. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 10, n. 1, p. 10, 2011. Disponível em: <<http://www.jnrbm.com/content/10/1/10>>.

SOLE, X.; GUINO, E.; VALLS, J.; INIESTA, R.; MORENO, V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics**, v. 22, n. 15, p. 1928–1929, 2006. Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/bioinformatics/btl268>>.

SONG, L.; LI, C.; XIE, Y.; LIU, S.; ZHANG, J.; YAO, J.; JIANG, C.; LI, Y.; LIU, Z. Genome-wide identification of Hsp70 genes in channel catfish and their regulated expression after bacterial infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 49, p. 154–162, 13 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464815302679>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

VIEIRA-GIRÃO, P. R. N.; ROCHA, Í. R. C. B.; COSTA, F. H. F.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Differential induction of HSP-70 expression in response to IHHNV in white shrimp *Litopenaeus vannamei* naturally co-infected with IHHNV and IMNV. **International Aquatic Research**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012. Disponível em: <<http://www.intaquares.com/content/4/1/17>>.

VILLANUEVA, B.; FERNÁNDEZ, J.; GARCÍA-CORTÉS, L. a; VARONA, L.; DAETWYLER, H. D.; TORO, M. a. Accuracy of genome-wide evaluation for disease resistance in aquaculture breeding programs. **Journal of animal science**, v. 89, n. 11, p. 3433–42, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742941>>.

YAN, H.; ZHANG, S.; LI, X.-Y.; YUAN, F.-H.; QIU, W.; CHEN, Y.-G.; WENG, S.-P.; HE,

J.-G.; CHEN, Y.-H. Identification and functional characterization of heat shock transcription factor1 in *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 37, n. 1, p. 184–92, mar. 2014. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464814000291>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

YU, Y.; ZHANG, X.; YUAN, J.; LI, F.; CHEN, X.; ZHAO, Y.; HUANG, L.; ZHENG, H.; XIANG, J. Genome survey and high-density genetic map construction provide genomic and genetic resources for the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Scientific Reports**, v. 5, n. October, p. 15612, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep15612>>.

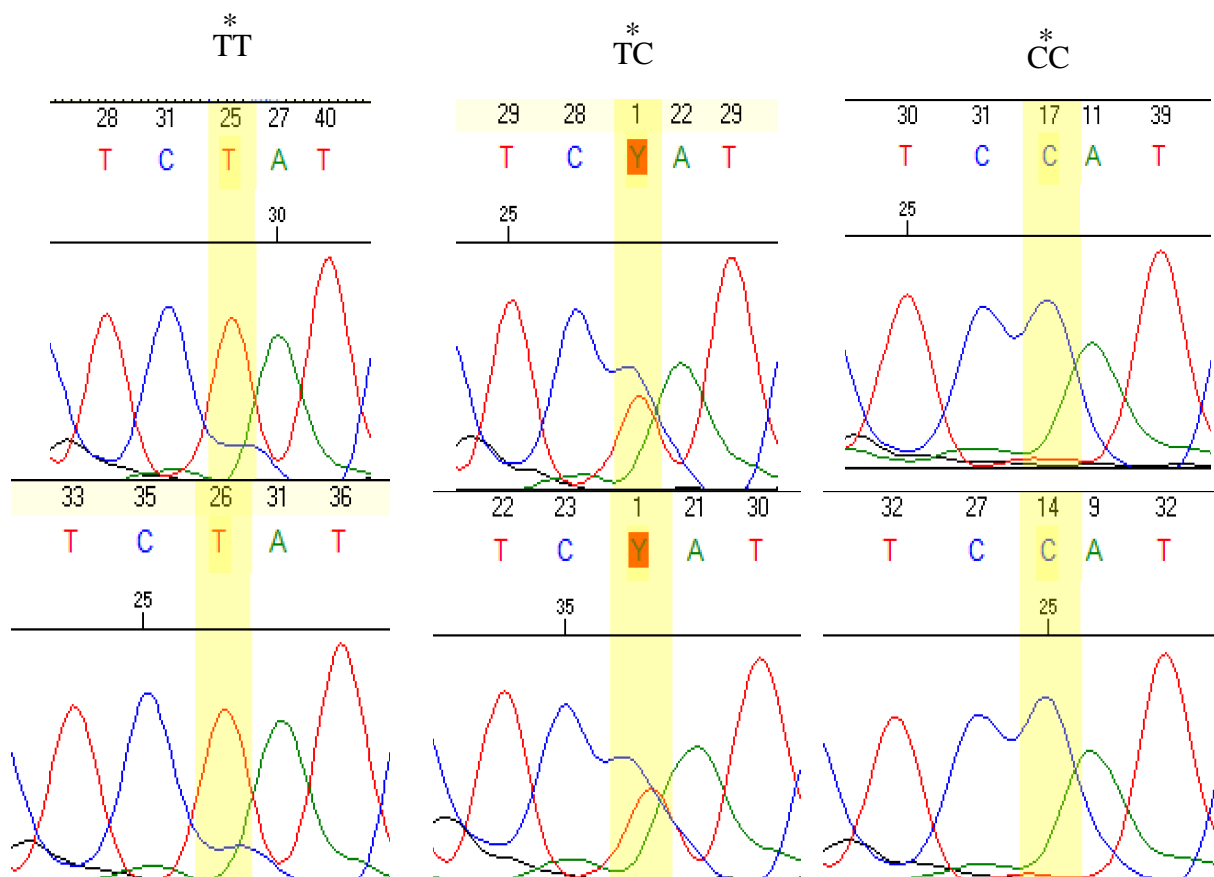
ZENG, D.; CHEN, X.; LI, Y.; PENG, M.; MA, N.; JIANG, W.; YANG, C.; LI, M. ANALYSIS OF HSP70 IN LITOPENAEUS VANNAMEI AND DETECTION OF SNPS *Litopenaeus vannamei* (Boone , 1931) has become the leading farm species in the western hemisphere (Valles- Jimenez et al ., 2004). Recently , viral diseases have seriously threatened the . v. 28, n. 4, p. 727–730, 2008a.

ZENG, D.; CHEN, X.; LI, Y.; PENG, M.; MA, N.; JIANG, W.; YANG, C.; LI, M. ANALYSIS OF HSP70 IN LITOPENAEUS VANNAMEI AND DETECTION OF SNPS *Litopenaeus vannamei* (Boone , 1931) has become the leading farm species in the western hemisphere (Valles- Jimenez et al ., 2004). Recently , viral diseases have seriously threatened the. v. 28, n. 4, p. 727–730, 2008b. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1651/08-3019.1>>.

ZHAO, X.; GUO, L.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X.; LUN, J.; CHEN, J.; LI, Y. SNPs of hemocyanin C-terminal fragment in shrimp *Litopenaeus vannamei*. **FEBS letters**, v. 586, n. 4, p. 403–10, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22245153>>.

ZHOU, J.; WANG, W.-N.; HE, W.-Y.; ZHENG, Y.; WANG, L.; XIN, Y.; LIU, Y.; WANG, A.-L. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 3, p. 170–178, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002220110900278X>>.

ANEXO A – CONFIRMAÇÃO DO GENÓTIPO DO SNP C892T POR SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO CAPILAR.



*Genótipos obtidos previamente pela técnica de genotipagem por qPCR. Os valores sobrescritos ao eletroferograma corresponde a um valor qualidade da base apresentada.