



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR  
CURSO DE OCEANOGRAFIA**

**LUCAS LIMA DE OLIVEIRA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS LINHAGENS COMERCIAIS DE  
CAMARÃO EXPOSTAS EXPERIMENTALMENTE AO VÍRUS DA  
MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV)**

**FORTALEZA 2017**

LUCAS LIMA DE OLIVEIRA

VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS LINHAGENS COMERCIAIS DE  
CAMARÃO EXPOSTAS EXPERIMENTALMENTE AO VÍRUS DA  
MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV)

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Curso de Oceanografia  
do Instituto de Ciências do Mar –  
LABOMAR da Universidade Federal  
do Ceará, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Bacharel em  
Oceanografia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

FORTALEZA 2017

LUCAS LIMA DE OLIVEIRA

VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS LINHAGENS COMERCIAIS DE  
CAMARÃO EXPOSTAS EXPERIMENTALMENTE AO VÍRUS DA  
MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV)

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao Curso de Oceanografia do Instituto de  
Ciências do Mar – LABOMAR da  
Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Bacharel em Oceanografia.

Aprovado: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Me. Jamille Martins Forte  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha família.

Minhas três mães, Vanesca, Marisa e Maísa

A meu irmão Matheus Oliveira

Ao meu professor Matheus Abreu.

## **AGRADECIMENTOS**

As mulheres da minha vida que considero minhas três mães, minha mãe biológica Vanesca, minha vó Marisa e minha tia Maísa, que me criaram, me educaram e sempre me apoiaram nas minhas decisões sem nunca me deixar andar para trás.

Ao meu irmão Matheus, por ser sempre meu companheiro desde o nascimento, sempre me apoiando em todas as decisões que tomei, sendo tanto irmão quanto amigo nas horas que preciso, sempre me ajudando para que pudesse concluir o curso.

A minha namorada Maria Victoria, que dentre tantas pessoas foi uma das peças fundamentais para minha melhor adaptação em Fortaleza, caminhou sempre ao meu lado desde o início do curso e nas horas mais difíceis dessa jornada foi fiel e companheira me ajudando em todos os sentidos da vida.

A todos meus tios e tias que me receberam de braços abertos em Fortaleza, me apoiaram e me fortaleceram com amor e carinho, sempre me dando suporte para que minha jornada fosse completa.

A meu tio Rogério, tia Beth e meus primos Raphael, Gabriel e Miguel, por serem meus familiares mais próximos e sempre serão pessoas que posso contar.

Aos meus colegas que conheci durante essa trajetória, que fizeram com que esses quatro anos fossem inesquecíveis e que levarei em minhas memórias para sempre.

Ao meu orientador Rodrigo Maggioni, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e pelos inúmeros conhecimentos aprendidos durante o período que fui bolsista.

A todos os membros do Laboratório CEDECAM, pelo aprendizado adquirido pela convivência, companhia e auxílio para conclusão do trabalho, em especial à Jamille e ao Fagner por terem me acompanhado diretamente em todas as etapas, sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

À coordenação do curso, por ter dado apoio em todas as situações relacionadas à graduação e aos órgãos financiadores de pesquisa especialmente ao CNPq, por ter ofertado a bolsa para realização do trabalho.

## RESUMO

A produção do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* em 2010, foi responsável por 71,8% da produção mundial de todas as espécies de criação de camarões marinhos. No Brasil, foi estimada a produção de 69.422,4 mil toneladas em 2010. Apenas no Ceará, a produção atingiu 35 mil toneladas. *L. vannamei* é uma espécie exótica originária do Pacífico Nordeste e o acesso a recursos genéticos desta espécie são limitados. O presente trabalho teve como objetivo examinar e comparar a variabilidade genética de duas linhagens comerciais do camarão *L.vannamei*, uma linhagem de crescimento e outra de resistência ao IMNV, por meio de genotipagem de marcadores moleculares do tipo microssatélites em conjuntos multiplex. Foram analisados 45 animais de uma linhagem de crescimento (L.C) e 38 de resistência (L.R). Cada amostra foi submetida a uma reação de cadeia da polimerase (PCR) em multiplex para os seguintes conjuntos de locos de microssatélites: conjunto 1 (TUMXL8.256; TUMXL8.32; PVAN0013) e conjunto 2 (CNM-MG384; CNM-MG421; PVAN1003). Os produtos das reações multiplex foram genotipados por meio de sequenciador automático capilar. Análises estatísticas incluíram o cálculo de estimadores de diversidade genética e de índices de fixação. Foi observado um elevado índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) em ambas as linhagens estudadas (L.C= 0,4482 e L.R= 0,3777). O índice de diferenciação genética entre as linhagens foi elevado ( $F_{ST}$ = 0,1530). A linhagem de crescimento apresentou níveis de heterozigosidade observada mais elevados ( $H_o$ = 0,2147) que a linhagem de resistência ( $H_o$ = 0,0745). A análise de grupos suscetíveis e resistentes ao desafio viral revelou diferenças significativas nas frequências alélicas de três locos, CNM-MG384, CNM-MG421 e TUMXLV8.256. Em conclusão, a análise de locos de microssatélites revelou que as populações estudadas acumularam diferenças genéticas significativas entre si além de apresentarem sinais de endocruzamento e variabilidade genética reduzida. Além disso foram detectadas diferenças genéticas entre os grupos suscetíveis e resistentes.

**Palavras chave:** microssatélites, PCR Multiplex, variabilidade genética, camarão, genotipagem, *Litopenaeus vannamei*.

## ABSTRACT

The production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in 2010 accounted for 71.8% of the world's production of all shrimp farming species. In Brazil, a production of 69,422.4 thousand tonnes was estimated in 2010, among which Ceará contributed with 35 thousand tonnes. *L. vannamei* is an exotic species originating in the northeastern Pacific and access to genetic resources of this species are limited. The objective of the present work was to examine and compare the genetic variability of two commercial populations of shrimp *L. vannamei*, one selected for growth and the other for resistance to IMNV, through genotyping of microsatellite markers in multiplex sets. Analysis of 45 animals from a growth line (L.C) and 38 from a resistance line (L.R) was conducted. Each sample was submitted to a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for the following sets of microsatellite loci: set 1 (TUMXL8.256; TUMXL8.32; PVAN0013) and set 2 (CNM-MG384; CNM-MG421; PVAN1003). The products of multiplex reactions were genotyped on a capillary automated sequencer. Statistical analysis included genetic diversity and fixation indices calculations. A high inbreeding index ( $F_{IS}$ ) was observed in both populations studied (L.C = 0.4482 and L.R = 0.3777). The genetic differentiation index among strains was high ( $F_{ST} = 0.1530$ ). Population L.C showed higher observed heterozygosity levels ( $H_o = 0.2147$ ) than population L.R ( $H_o = 0.0745$ ). The analysis also revealed significant differences in the allele frequencies of three loci, CNM-MG384, CNM-MG421 and TUMXLV8.256, when comparing resistant and susceptible groups of animals, within each population. In conclusion, an analysis of microsatellite loci revealed that as populations studied, they accumulated significant genetics in addition to showing signs of inbreeding and reduced genetic variability. In addition to that genetic differences were detected between susceptible and resistant animals.

**Key words:** microsatellite, multiplex PCR, genetic variability, shrimp, genotyping, *Litopenaeus vannamei*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Frequências de *heterozigosidade* observada ( $H_o$ ) e índice de endogamia ( $F_{is}$ ) de ambas as linhagens estudadas.....22
- Figura 2.** Frequência alélica dos 6 locos microssatélites analisados.....23
- Figura 3.** Frequência alélica dos 6 locos microssatélites analisados nos grupos de resistentes e suscetíveis de cada linhagem.....25

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Conjuntos de marcadores moleculares microsatélites, cada conjunto representa uma reação de PCR-multiplex.....20
- Tabela 2.** Variabilidade genética das duas linhagens de *L.vannamei* para os 6 locos de microsatélites.....21

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>Situação da carcinicultura no Brasil e no mundo.....</b>	<b>12</b>
<b>Impacto do IMNV sobre o cultivo do camarão.....</b>	<b>13</b>
<b>Definição de PCR e sua utilização no diagnóstico molecular.....</b>	<b>14</b>
<b>Definição de microssatélites e sua utilização em aquicultura.....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivos Gerais .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Obtenção das amostras .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Extração de DNA.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Variabilidade genética por marcadores moleculares microssatélites .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Análises de dados.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Relação de resistência com marcadores microssatélites .....</b>	<b>20</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Análise de variabilidade genética.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Análise de relação de resistência com marcadores microssatélites.....</b>	<b>24</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>28</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A produção do camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* foi responsável por 71,8% da produção total de camarões marinhos do mundo em 2010 (FAO, 2012). No Brasil sua produção foi estimada em cerca de 69.422,4 mil toneladas em 2010, no qual, apenas no estado do Ceará a produção atingiu 35 mil toneladas (MAPA, 2012). A carcinicultura cada vez mais vem ganhando espaço na economia mundial, no entanto os carcinicultores ainda se deparam com inúmeras dificuldades, sejam elas de cunho burocrático ou biológico. Em ambientes de cultivo, as doenças virais são as principais fontes de prejuízos aos carcinicultores, onde a alta produtividade dos organismos, aliados à altas taxas de estocagem, propiciam a manifestação de patógenos.

Medidas regulatórias em relação à limitação na importação de novos reprodutores de *L. vannamei*, espécie exótica para o Brasil, contribuiriam para reduzir o aporte de germoplasma, o que resulta potencialmente no aumento de endocruzamentos e na diminuição nos níveis de diversidade genética dos estoques (FREITAS e GALETTI-JUNIOR, 2002). Apesar disso, programas de melhoramento genético da espécie foram conduzidos com sucesso e já são disponíveis no mercado nacional pós-larvas melhoradas para crescimento e resistência a patógenos específicos, em especial ao vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). Dentre as principais doenças de origem viral, o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) tem sido alvo de estudos para detecção molecular devido às elevadas perdas nos cultivos de *L. vannamei* nas Américas (LIGHTNER, 2011).

De maneira geral, os programas de melhoramento genético consistem em alterar a média fenotípica de uma característica específica, demonstrado pela elevação dos índices zootécnicos (FALCONER, 1987). Contudo, a amplitude destas alterações fenotípicas está invariavelmente atrelada aos níveis de diversidade genética. Hoje em dia o acompanhamento da variabilidade genética em sistemas de aquicultura pode ser realizado diretamente através do uso de marcadores moleculares, os quais se mostram úteis no monitoramento da variabilidade genética das populações, na identificação de locos ligados a traços de interesse e no estabelecimento de programas de melhoramento, baseados na Seleção Assistida por Marcadores (MAS) (BENZIE 2000; BRAVINGTON e WARD, 2004; CHISTIakov et al., 2006). A MAS procura usar ferramentas de análises de populações e dentro deste grupo os marcadores microssatélites se destacam pela sua abundância e polimorfia no genoma (CHISTIakov et al., 2006; LIU;

CORDES,2004). Para tornar o processo de genotipagem eficiente, reações de PCR em multiplex permitem um aumento da robustez e definição de alelos mediante a análise de variabilidade genética em populações, promovendo a amplificação de dois ou mais locos microssatélites em uma única reação (HENEGARIU et al.,1997)

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### ➤ Situação da carcinicultura no Brasil e no mundo

O cenário da aquicultura atualmente é promissor. Nos últimos anos houve um aumento significativo da produção de pescado em ambientes de cultivo continental, de cerca de 34,3 milhões de toneladas em 2009, para 47,1 em 2014 (FAO, 2016), enquanto que a produção por capturas do ambiente natural permaneceu quase constante desde 2009. Do total de pescado produzido, capturas e aquicultura, observou-se um crescente aumento de seu uso para consumo humano, de 18,1 kg de consumo per capita em 2009 para 20,1 kg em 2014, indicando a demanda por proteína animal marinha (FAO, 2016). A produção do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* ou camarão branco do pacífico, representa cerca de 76% da produção de camarões peneídeos do mundo, cerca de 3,5 milhões de toneladas (FAO 2014; 2016).

O Brasil, tem um enorme potencial de produção aquícola devido ao fato de possuímos cerca de 1.000.000 de hectares de áreas que podem ser utilizadas para a carcinicultura, bem como um posicionamento geográfico estratégico para tal, no qual temos os estados do Nordeste como os principais produtores do país (ABCC, 2016; MAPA, 2012). O histórico de produção de camarão marinho no Brasil mostra que o setor ainda está em expansão desde a introdução da espécie *Litopenaeus vannamei*. Entre 1997 e 2007 *L. vannamei* tornou-se a principal espécie a ser cultivada no mundo, com 70,11% de representatividade na produção, desbancando a espécie *Penaeus monodon*, a principal até então (ROCHA; ROCHA, 2009). Em paralelo, a carcinicultura marinha brasileira cresceu numa média de 72,3% durante o mesmo período, 1997 (3.600 t) e 2003 (90.190 t), ocupando a liderança mundial de produtividade nesse ano (6.083 kg/ha/ano) (ABCC, 2016).

Entretanto, o Brasil tem enfrentado desafios importantes na tentativa de manter a produtividade do camarão marinho, como o surgimento de doenças como o IMNV e o WSSV, associados às enchentes dos anos de 2004, 2008 e 2009. No ano de 2004 a produção brasileira sofreu uma queda considerável na produção, de 90.180 t em 2003, para 76.000 t em 2004 (ROCHA, 2007). Além disso, com empecilhos fiscais na obtenção de licenças ambientais para instalações de fazendas, associado à falta de investimento no setor, a produção de camarão no Brasil não conseguiu manter-se no topo da produção mundial (ABCC, 2016).

Segundo (FAO 2016), o Brasil ocupou a 14<sup>o</sup> posição na produção total em aquicultura em 2014 (562,5 mil toneladas), no qual 65,1 mil toneladas representam a produção de crustáceos, liderados pela produção do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* produzido principalmente na região nordeste, responsável por mais da metade da produção total, e onde só o estado do Ceará produziu cerca de 35 mil toneladas (MAPA, 2012).

#### ➤ **Impacto do IMNV sobre o cultivo de camarão**

Dentre a inúmeras dificuldades que o setor luta para enfrentar, as doenças virais têm se mostrado como uma das principais problemáticas a serem enfrentadas e as que mais causam prejuízos aos produtores (LIGHTNER, 2011). O Brasil possui quatro das cinco doenças virais de notificação obrigatória pelo Escritório Internacional de Epizootias - OIE (WSSV, IMNV, NHP-B e IHHNV-1) (ABCC, 2016). Estas, são apontadas como as mais preocupantes, por apresentarem alto grau de mortalidade, afetando a produtividade (ABCC, 2016).

No Brasil, o Vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), foi uma das doenças que mais causaram impactos na produção, em especial na região Nordeste, onde foi primeiramente identificada no estado do Piauí, em setembro de 2002. Após seu primeiro relato, os sintomas da doença foram observados nos municípios do litoral oeste do Ceará, e posteriormente foi disseminando ao litoral leste. Pouco tempo depois, migrando sentido leste, os sintomas foram relatados em fazendas nos Estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. A sintomatologia consiste na perda de transparência do músculo abdominal paralela a uma mortalidade diária de indivíduos a partir de 7g. Os indivíduos

infectados apresentam necrose nos músculos do abdômen e do cefalotórax, macroscopicamente é possível observar a evolução da doença pelas mudanças de cor nas regiões afetadas, os primeiros estágios apresentam coloração opaca e aspecto leitoso, conforme a doença alcança estágios mais avançados as regiões afetadas atingem tons alaranjados (NUNES; MARTINS; GESTEIRA 2004) . Essas características, seguidos de inúmeros estudos sobre o vírus, concluíram que este teve origem no Brasil, e os danos causados nos primeiros anos de surto, o colocaram na lista de doenças de notificação obrigatória Escritório Internacional de Epizootias - OIE no ano de 2008.

### ➤ **Definição de PCR e sua utilização no diagnóstico molecular**

O termo PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*, é uma técnica em biologia molecular amplamente utilizada nos estudos e análises de ácidos nucleicos (MOLINA et al, 2004). Esta técnica foi desenvolvida e patenteada por Kary Banks Mullis em 1983, que lhe rendeu o prêmio Nobel da química em 1993, a técnica baseia-se na replicação de fragmentos de DNA por síntese pela enzima DNA polymerase (COSTA, 2009).

A técnica de PCR consiste na amplificação exponencial de cópias de DNA a partir de uma fita molde, in vitro. Para tal, etapas de termociclagem (variações de temperatura) são necessárias para que ocorra a reação, que depende de reagentes específicos, quatro nucleotídeos (dNTP's) do DNA, sequências iniciadoras (primers) e uma DNA polimerase termoestável. A reação envolve três passos que se repetem de 30 a 35 vezes (ciclos): 1) Desnaturação da fita molde de DNA por meio da quebra das pontes de hidrogênio - etapa com duração entre 30 s a 1 min a temperatura entre 92 °C a 96 °C; 2) Anelamento do par de oligonucleotídeos (primers), que agem como os iniciadores da reação de polimerização, estes ligam-se numa região complementar do DNA na fita molde que será replicada. Etapa com duração de 30 s a 1 min a temperatura entre 58 °C e 65 °C; 3) Amplificação ou extensão por meio da enzima Taq DNA polimerase, das novas fitas de DNA formadas pelos iniciadores, adicionando os quatro dNTP's nas bases complementares na reação de polimerização. Etapa com duração entre 45 s e 1 min a 72 °C (COSTA, 2009).

Com o advento da técnica de PCR, foi possível de forma rápida e precisa ter conhecimento do conteúdo genético dos seres vivos, avançando nos conhecimentos

em genética molecular, obter sequenciamento de genomas, identificando patologias e auxiliando nas análises clínicas. Estudos de genética molecular tem ganhado espaços na área de anatomia patológica, sendo uma ferramenta auxiliar às análises morfológicas (MOLINA; TOBO, 2004).

A partir do desenvolvimento da técnica de PCR, outras técnicas oriundas de modificações da técnica original puderem surgir, dentre as principais podemos citar o RT-PCR, nested PCR, multiplex PCR, PCR a partir de primers randômicos e PCR em tempo real (MOLINA; TOBO, 2004).

A utilização do diagnóstico molecular via PCR e PCR em tempo real tem se mostrado eficaz na obtenção de dados mais precisos nos estudos epidemiológicos em relação à métodos como microscopia, garantindo maior precisão e minimizando chances de contaminação das amostras (COSTA et al, 2008). O uso de PCR seguido de RT-PCR também se mostrou como uma ferramenta eficiente na detecção de doenças virais como a infecção pelo vírus da cinomose canina (CDV), corroborando com quadros clínicos e histológicos, bem como foi capaz de identificar a presença do vírus sem a manifestação histológica, demonstrando ser um método eficiente e de diagnóstico rápido da doença (GEBARA, 2004)

A análise de evolução da carga viral em linhagens de camarão de cultivo gera informações importantes para seleção de linhagens resistentes e suscetíveis a determinados patógenos (MOSS et al., 2005), métodos como PCR em tempo real demonstraram eficácia no acompanhamento da evolução da carga viral bem como na distinção de linhagens resistentes e suscetíveis, do camarão *Litopenaeus vannamei*, ao vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) (NOGUEIRA, 2016). Neste mesmo trabalho também foi realizado análise de variabilidade genética utilizando a técnica de PCR multiplex – uma reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas sequências-alvo numa mesma reação (MOLINA; TOBO, 2004) – com marcadores moleculares microssatélites.

## Definição de microssatélites e sua utilização em aquicultura

Marcadores moleculares microssatélites, ou *short tandem repeats* (STRs), são sequências genômicas que se repetem em tandem e estão presentes em todos genomas de eucariotos. Como características, podem alcançar uma variação de 1 a 6 pares de bases, possuem caráter hereditário codominante e apresentam alto grau de polimorfismo (CHISTIAKOV et al, 2006). Apresentam um tamanho relativamente pequeno e são de fácil amplificação por meio de PCR. Essas características o tornam uma excelente ferramenta molecular em inúmeras áreas, tanto em estudos nos setores da biologia, como análises forenses e epidemiológicas, quanto em setores comerciais, como em ciências agrárias e aquicultura. No setor da aquicultura, esses marcadores vêm sendo amplamente utilizados pelo fato de serem úteis no mapeamento de características quantitativas (QTL), na construção de mapas de ligação, seleção assistida e, principalmente, na caracterização do material genético e seleção de reprodutores (CHISTIAKOV et al., 2006; O'CONNELL et al, 1997).

Para a espécie de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, muitos estudos obtiveram sucesso na utilização de marcadores moleculares microssatélites no âmbito de monitorar a variabilidade genética de estoques selvagens e cultivados (MEEHAN et al., 2003; PÉREZ et al., 2005; VALLES-JIMENEZ et al., 2005; MAGGIONI et al., 2013; MONTALDO et al., 2013). Para a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), espécie de peixe importante na aquicultura nacional, um estudo recente de caracterização genética foi desenvolvido utilizando marcadores microssatélites, a qual mostrou-se eficiente para determinar índices de variabilidade genética em linhagens de cultivo (FORTE, 2015).

Estes trabalhos têm evidenciado o papel fundamental do uso de marcadores moleculares microssatélites no desenvolvimento do setor da aquicultura, sendo uma importante ferramenta para selecionar ou identificar linhagens com características de interesse, tanto para resistência à patógenos, quanto para seleção de reprodutores (CHISTIAKOV et al., 2006; GJEDREM & BARANSKI, 2009; NOGUEIRA, 2016).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Realizar a genotipagem de representantes de duas linhagens comerciais de *L. vannamei*, resultantes do melhoramento genético para o crescimento e para a resistência ao IMNV, expostas experimentalmente ao vírus da mionecrose infecciosa (IMNV).

### **2.2 Objetivos Específicos**

O presente estudo teve como objetivos específicos:

- Utilizar os conjuntos de genotipagem desenvolvidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do CEDECAM/LABOMAR para genotipar as linhagens em estudo.
- Obter genótipos de boa qualidade para pelo menos 6 (seis) locos de microssatélites para ambas as linhagens.
- Obter estimativas de variabilidade genética a partir dos genótipos produzidos para ambas as linhagens.
- Avaliar a relação entre variabilidade genética, crescimento e resistência ao IMNV.
- Analisar relação entre frequência alélica e resistência ao IMNV.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Obtenção das amostras**

As amostras foram obtidas a partir de um trabalho de mestrado desenvolvido por Nogueira, (2016) no Centro de Estudos de Organismos Aquáticos CEDECAM, sua aquisição foi feita a partir de duas empresas comerciais especializadas /na produção de pós-larvas selecionadas para o crescimento (L.C) e outra empresa especializada na produção de pós-larvas selecionadas para a resistência (L.R).

Os camarões passaram por um experimento de desafio, no qual foram submetidos a cargas elevadas do inóculo com IMNV. Para tal, 180 camarões de cada linhagem foram divididos em dois grupos (108 camarões/grupo de infecção e 72 camarões/ grupo controle), a carga viral inicial IMNV de cada camarão foi obtida por meio de RT-qPCR. Ambos os grupos de infectados (L.R e L.C) foram tratados nas

seguintes condições: injeção intramuscular de 150 µl de inóculo viral contendo aproximadamente  $9,98 \times 10^5$  cópias do IMNV. Os grupos controle foram tratados nas seguintes condições: injeção intramuscular de 150 µl de solução salina (NaCl 330 mM, Tris 10 mM, pH 7,4). Após os 30 dias de experimento, foi possível categorizar grupos de camarões suscetíveis e resistentes de cada linhagem trabalhada a partir dos dados de sobrevivência dos mesmos.

### 3.2 Extração de DNA

O DNA do tecido muscular foi extraído utilizando o protocolo de extração PCI-Proteinase-K, descrito por (SAMBROOK et al. 1989). Foi macerado cerca de 100 mg de músculo e posteriormente lavado com solução de Tris-HCL (10 mM, pH 7) e colocado em microtubos de 1,5 ml adicionado de 500 µl de tampão de extração (Tris-HCL 100 mM, SDS 1%). Posteriormente foi adicionado 30 µl de proteinase-K (10mg/ml), a qual foi misturada por de inversão. Em seguida as amostras foram incubadas a 55°C *overnight* até a completa digestão do tecido. Foi então adicionado 500 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Invitrogen®), que foi misturado por inversão durante 5 min. A separação das fases foi feita após a centrifugação das amostras a 10.000 G por 5 min. A seguir, 450 µl da fase aquosa superior formada (sobrenadante) foram aliquotadas e transferidas para outro microtubo, com atenção para não perturbar a interfase. A segunda purificação foi feita adicionando 500 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e novamente misturado por inversão durante 5 min. Outra centrifugação foi feita nas mesmas condições, 10.000 G por 5 min após a qual, 450 µl da fase aquosa superior foram transferidos 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, e em seguida foram incubadas a -20°C/30 min. Feito isso, as amostras foram centrifugadas a 10.000 G por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão. As amostras passaram por uma lavagem com 500 µl de etanol 70%, invertendo-se algumas vezes para posteriormente serem centrifugadas a 10.000 G por 5 min. O etanol foi cuidadosamente descartado e os microtubos invertidos para maximizar a secagem em temperatura ambiente (15 a 25°C) por 10 minutos. O DNA foi ressuscitado 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 com 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®).

### 3.3 Variabilidade genética por marcadores moleculares microssatélites

A avaliação de variabilidade genética foi feita a partir dos conjuntos multiplex desenvolvidos por Forte (2014). O conjunto é composto por três conjuntos com três locos cada. Foram utilizados seis locos (tabela 1) para as análises de variabilidade genética entre as linhagens de crescimento (L.C) e a linhagem de resistência ao IMNV (L.R). Os marcadores microssatélites de cada conjunto foram marcados individualmente com um fluoróforo cada, VIC (verde), FAM (azul) e NED (amarelo).

As reações de PCR multiplex 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 *primer forward*, 3 µM de *primer reverse* e 0,06 µM da cauda fluorescente) e 200 ng de DNA genômico. O protocolo de termociclagem foi o seguinte: desnaturação a 94°C/4 minutos, seguidos de 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 primeiramente foram avaliados por meio de gel de eletroforese, onde a integridade dos produtos foram verificados, em seguida foram lidos em sequenciador automático capilar ABI3500 (Applied Biosystems, CA, USA) com o marcador de peso molecular GS-600 LIZ®, onde foram obtidos genótipos para ambas as linhagens utilizando o software GeneMapper Versão 4.0.

Tabela 1. Conjuntos de marcadores moleculares microssatélites, cada conjunto representa uma reação de PCR-multiplex, onde cada loco foi marcado com um fluoróforo adicionado na cauda M13.

	Microssatélites (ID)	Sequência (5' – 3')	Amplicon (pb)	Tipo de repetição
Conjunto PCR 1	TUMXL V8.256	*GGACTCACACTTCTGGTTC GGCTGCACCTTGTAAGTC	184	(AAT) <sub>4</sub> ...
	TUMXL V8.32	*TTACCGCCTAAGAGCGAATG TGTCTTTCGTACCAGTCAAG	238	(CA) <sub>3</sub> ... (TA) <sub>4</sub>
	PVAN00 13	*TGCTCTGGTAACGACAAACG AGACCTGTGGCGAAGTGC	302	(TA) <sub>5</sub> ... (AT) <sub>4</sub>
Conjunto PCR 2	CNM-MG421	*TTTCTGCCACGGAGTT CTGTTGCCCAAATAGC	162	(AAT) <sub>5</sub>
	PVAN10 03	*ATATTTTCATGCGTTCCGAGG GACTATCTCACGCGCCTCTC	167	(GT) <sub>9</sub> ... (AT) <sub>2</sub> (GT) <sub>6</sub>
	CNM-MG384	*ATCGGGAATACAATCG AACCCTAACAAACAATAAG	245	(AAACA) <sub>5</sub>

\*Cauda M13 (TGTAACGACGGCCAGT)

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.4 Análises de dados

Os valores estimados para heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), índices de F de Wright (COCKERHAM & WEIR, 1993) e as análises de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram obtidos através da plataforma online GENEPOP, versão 4.2 (RAYMOND E ROUSSET, 1995) O índice de diversidade alélica ( $F_{st}$ ) foi obtido pelo programa FSTAT (GOUDET, 2002). A determinação de alelos nulos foi obtida pelo software Micro-Checker 2.2.3.

### 3.5 Relação de resistência com marcadores microssatélites

Cada linhagem foi dividida em grupos de resistentes e suscetíveis de acordo com a taxa de mortalidade dos indivíduos durante o experimento, nestes foram feitas análises de frequência alélica e submetidos ao teste ANOVA e ao teste Tukey.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise de Variabilidade genética

Os produtos de PCR multiplex de ambos os conjuntos, conjunto 1 (TUMXL8.256; TUMXL8.32; PVAN0013) e conjunto 2 (CNM-MG384; CNM-MG421; PVAN1003), foram verificados previamente em gel de agarose e apresentaram boa qualidade de bandas.

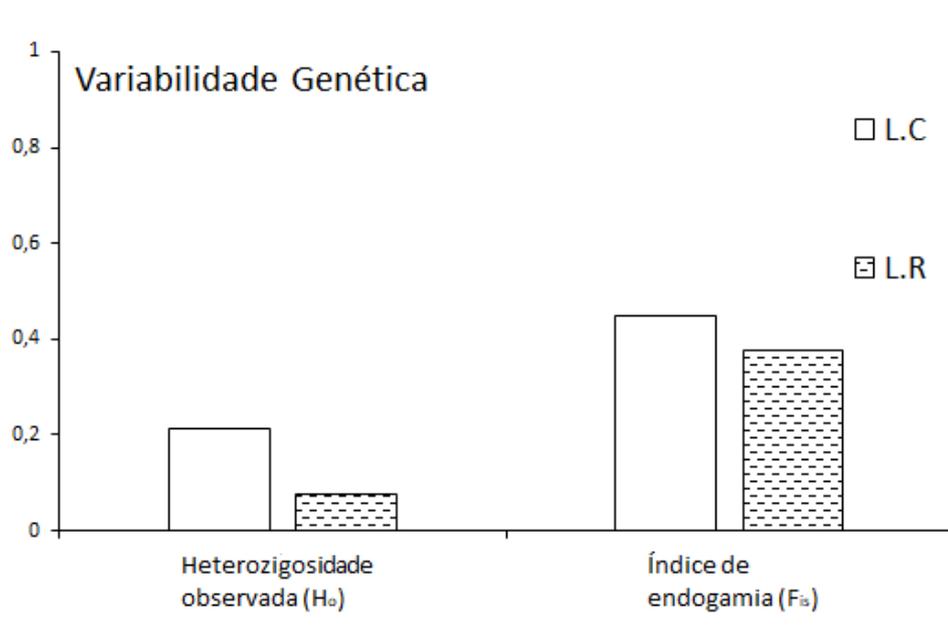
Os resultados foram consistentes, visto que os alelos de cada marcador foram claramente identificados pelo software e revisado por análises visuais para cada amostra. Os resultados de todas as análises feitas a partir do programa GENEPOP 4.2 podem ser observados na Tabela 2 e os valores de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e o índice de endogamia ( $F_{is}$ ) estão destacados na Figura 1. As frequências alélicas de cada loco em suas populações são apresentadas nos gráficos de frequência alélica da Figura 2.

Tabela 2 – Variabilidade genética das duas populações de *L. vannamei* para os seis locos de microssatélites estudados.

População	Locos						Média
	PVAN001 3	CNM- MG38 4	CNM- MG42 1	TUMXLV 8.256	TUMXLV 8.32	PVAN 1003	
L.C (n=45)							
Na	4	12	4	5	6	3	5,6666
$H_o$	0,2444	0,2666	0,3111	0,1555	0,1555	0,1555	0,2147
$H_e$	0,5154	0,5220	0,3740	0,4560	0,4735	0,1848	0,4209
$F_{is}$	0,5293	0,4934	0,1700	0,6621	0,6746	0,1600	0,4482
$P_{valor}$	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0300</b>	
L.R (n=38)							
Na	1	5	5	2	1	2	2,6666
$H_o$	0	0,0263	0,1315	0,0526	0	0,2368	0,0745
$H_e$	0	0,3309	0,5037	0,0519	0	0,2858	0,1953
$F_{is}$	-	0,6098	0,7415	-0,0137	-	0,1735	0,3777
$P_{valor}$	-	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	1,0000	-	0,2927	
$F_{st}$	0,4190	- 0,0090	0,0050	0,1960	0,2860	0,0410	0,1530

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

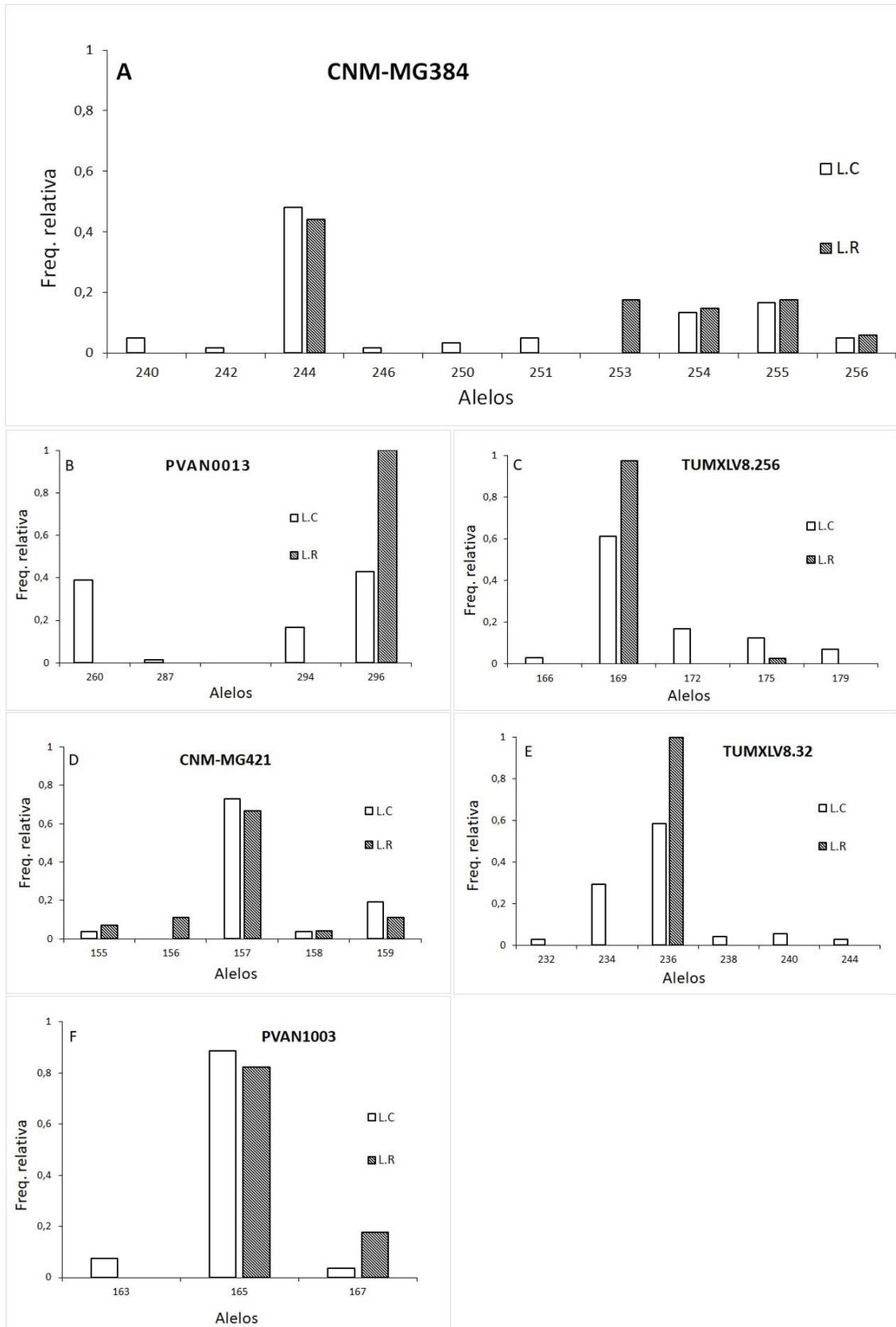
Figura 1 - Frequências de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e índice de endogamia ( $F_{is}$ ) de ambas as linhagens estudadas.



**Fonte:** dados da pesquisa.

As frequências de alelos nulos foram obtidas a partir do Software Micro-Checker 2.2.3. Quatro dos seis locos estudados apresentaram alelos nulos, PVAN0013, CNM-MG384, TUMXLV8.256 e TUMXLV8.32 com frequência de alelos nulos 0,2361; 0,2418; 0,2797; 0,3045 respectivamente.

Figura 2 - Frequência alélica dos 6 locos microssatélites analisados: A) CNM-MG384; B) PVAN0013; C) CNM-MG421; D) TUMXLV8.256; E) TUMX LV8.32 e F) PVAN1003. L.R e L.C representam a linhagem de resistência e linhagem de crescimento respectivamente.



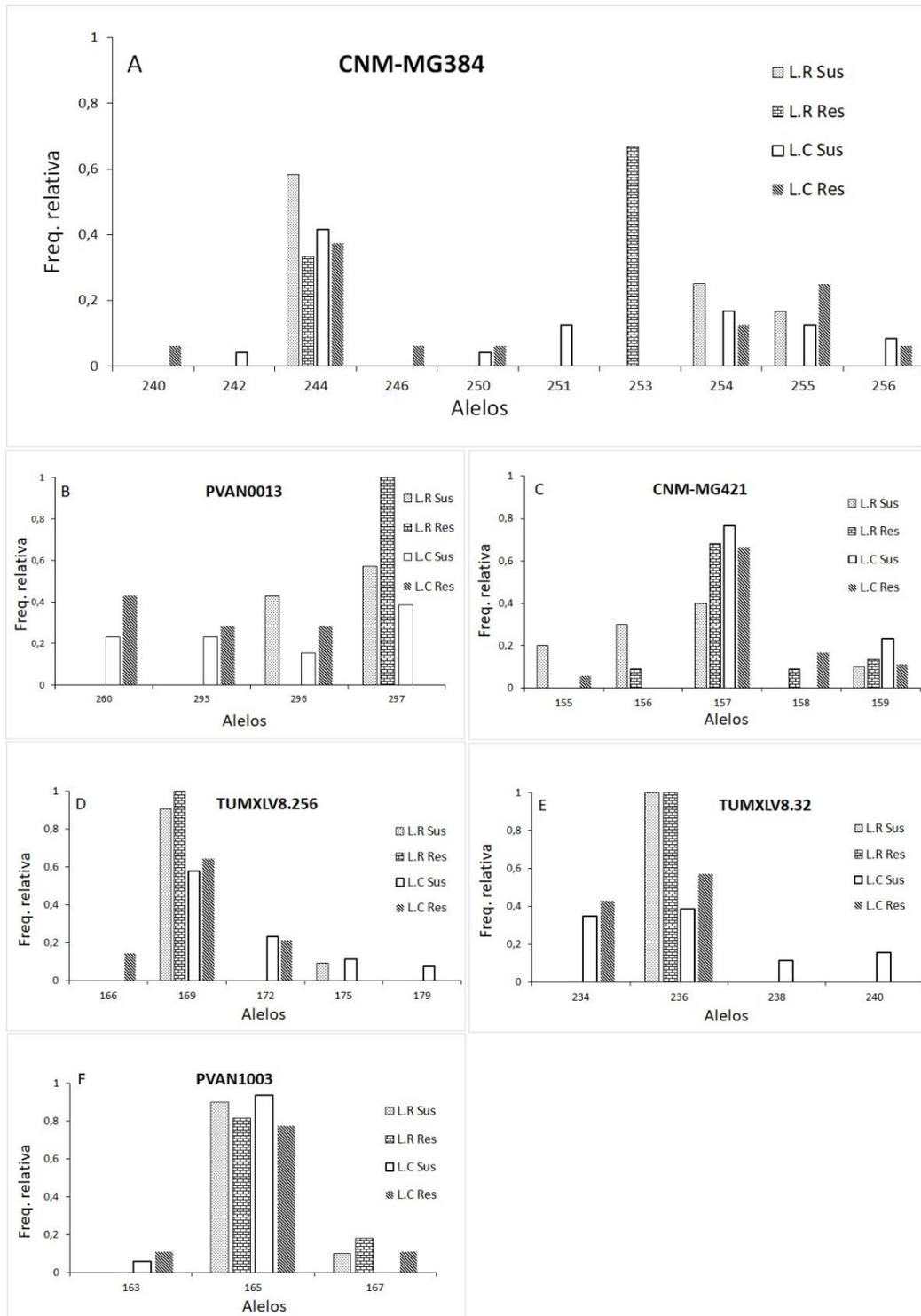
Com base nos valores de ( $F_{is}$ ), pôde-se observar um elevado índice de endogamia tanto para a linhagem de crescimento (L.C= 0,4482) quanto para a linhagem de resistência (L.R=0,3777), os resultados foram suportados pelas análises do índice de endogamia de todos os locos, onde todos com exceção do loco TUMXLV8.256 apresentaram índice elevado. O índice de diferenciação ou diversidade genética entre as duas linhagens de estudo foi significativo ( $F_{st}= 0,1530$ ), apenas o loco CNM-MG384 apresentou baixo índice de diferenciação genética.

Durante as análises de variabilidade genética os locos TUMXLV8.32 e PVAN0013 mostraram-se monomórficos (apenas um alelo) para a linhagem de resistência, impossibilitando as análises de heterozigosidade e equilíbrio de Hardy-Weinberg para esses marcadores. Seguindo esta tendência a heterozigosidade na linhagem de resistência ( $H_o=0,0745$ ) foi muito menor que aquela observada na linhagem de crescimento ( $H_o= 0,2147$ ).

#### **4.2 Análise de relação entre os locos microsatélites e a resistência**

Com auxílio do Software PAST 2.17c foram feitos os testes estatísticos ANOVA e Tukey, a frequência do alelo 253 para o loco CNM-MG384 apresentou relação com a resistência ao IMNV. Outros valores estatisticamente significativos foram observados para o alelo 157, grupo dos resistentes para o loco CNM-MG421, e para o alelo 169, grupo dos suscetíveis, para o loco TUMXLV8.256 (Figura 3.)

Figura 3 - Frequência alélica dos seis locos de microssatélites nos grupos de resistentes e suscetíveis de cada linhagem: A) CNM-MG384; B) PVAN0013; C) CNM-MG421; D) TUMXLV8.256; E) TUMX LV8.32 e F) PVAN1003. L.R Sus, L.R res, L.C Sus e L.C res representam a linha linhagem de resistência suscetível, linhagem de resistência resistente, linhagem de crescimento suscetível e linhagem de crescimento resistente, respectivamente.



## 5. DISCUSSÃO

Os painéis multiplex de microssatélites desenvolvidos por Forte (2014) foram eficientes para o processo de genotipagem de ambas linhagens. No entanto, alguns marcadores apresentaram alguns problemas na definição de alelos, necessitando de um maior número de marcadores a serem analisados. Por exemplo, para o loco CNM-MG384, um penta nucleotídeo, foi observado uma característica divergente da anteriormente observada na descrição do loco (PEREZ et.al., 2005), onde foi encontrado em algumas amostras do marcador CNM-MG384 uma variação de tetranucleotídeo. Neste trabalho as repetições do loco mostraram-se muito mais variáveis do que previamente registrado.

As linhagens de bom desempenho para o crescimento tendem a apresentar alto nível de homozigose, pois visam à homogeneidade de tamanho e a alta taxa de crescimento (BENZIE, 2009). Por este motivo linhagens deste tipo seriam mais susceptíveis a doenças infecciosas. Por outro lado, linhagens de camarão marinho selecionadas para a resistência a enfermidades, em geral, apresentam taxas menores de crescimento e distribuição de tamanhos mais ampla por classe de idade. No presente estudo foi observado que a linhagem selecionada para crescimento (L.C) mostra heterozigosidade maior e, ao mesmo tempo maior índice de endogamia que a população selecionada para resistência (L.R) o que se afasta o esperado, em relação à variabilidade.

A intensa pressão de seleção para resistência ao IMNV, e seu histórico de manejo, parecem estar ao mesmo tempo reduzindo a variabilidade de L.R e reduzindo seu índice de endogamia. Esta situação pode ser obtida com um forte efeito gargalo na fundação destas populações, seguido de um manejo voltado para a manutenção da variabilidade genética da linhagem (MAGGIONI et al.,2013). Este cenário parece estar de acordo com as limitadas informações de histórico levantadas para esta linhagem comercial. A estratégia de melhoramento utilizada pelo empreendimento de onde se originaram os camarões utilizados no experimento envolve a exposição de numerosas famílias a doses altas de IMNV. Os sobreviventes de cada geração em cada família são utilizados para gerar as famílias seguintes assim como os reprodutores para produção de pós-larvas. No entanto todas as famílias mantidas hoje em dia são descendentes de uma única linhagem resistente estabelecida há mais de 10 anos, segundo informações do empreendimento.

Por outro lado, a linhagem selecionada para o crescimento (L.C) apresenta variabilidade genética maior em relação a L.R, conforme estimada pela heterozigosidade observada, mas um índice de endogamia muito superior. Novamente esta situação é coerente com a estratégia de manejo utilizada pelo laboratório comercial em questão. Neste caso as informações levantadas indicam que as pós-larvas são geradas a partir do cruzamento de linhagens homozigóticas independentemente selecionadas para crescimento. Esta estratégia permite explicar a grande disparidade entre a heterozigosidade observada e esperada, e também o alto índice de endocruzamento observado.

Finalmente as diferenças entre as frequências alélicas de L.C e L.R são claras e certamente representam o acúmulo de diferenças entre duas populações comerciais gerenciadas independentemente. Estas diferenças se refletem no alto índice de diferenciação genética observado. A redução da variabilidade genética e diferenciação genética em linhagens de cultivo brasileiras já foram observados anteriormente (FREITAS & GALETTI JUNIOR, 2002; FRANCISCO & GALETTI JUNIOR, 2005; MAGGIONI, 2013).

A partir das análises de heterozigosidade e endogamia foi possível avaliar a relação entre o maior índice de variabilidade genética ao crescimento, mas não foi possível correlacionar essa observação com a resistência ao IMNV para todos os marcadores. No entanto, o alelo 253 do marcador CNM-MG384 apresentou forte relação com resistência, visto que este loco foi observado apenas no grupo de resistente da população resistente. Além deste loco, outros dois apresentaram frequências significativamente diferentes entres os grupos resistentes e suscetíveis. No entanto a relação entre estes marcadores e a resistência ao IMNV não pôde ser estabelecida inequivocamente neste experimento e requer um desenho experimental específico, envolvendo a seleção de genótipos e desafios virais específicos.

## 6. CONCLUSÕES

- Os conjuntos de genotipagem utilizados permitiram a efetiva genotipagem das populações de *L. vannamei* estudadas
- Foi obtida uma tabela de genótipos consistentes para seis marcadores
- As estimativas de variabilidade genética, indicaram que ambas populações apresentam variabilidade reduzida e sinais de endocruzamento.
- Ao contrário do esperado, mostraram que a população selecionada para resistência (L.R) apresentou menor variabilidade genética estimada, mas um menor índice de endocruzamento em relação àquela selecionada para crescimento (L.C). No entanto, estes resultados parecem estar de acordo com o histórico de cada população.
- Ao todo, três marcadores polimórficos mostraram diferenças de frequências /alélicas entre os grupos resistente e suscetível ao desafio viral, dentro das populações estudadas.

## REFERÊNCIAS

ABCC. Revista Associação Brasileira de Produtores de Camarão, edição Junho de 2016. Rua Valdir Targino 3625 Candelária, Natal, RN: [s.n.], 2016. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/revista-abcc-edicao-junho-de-2016/>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

ABCC. Revista Associação Brasileira de Produtores de Camarão, edição Junho de 2017. Rua Valdir Targino 3625 Candelária, Natal, RN: [s.n.], 2017. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2017/06/REVISTA-ABCC-EDI%C3%87%C3%83O-JUNHO-2017.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

APOLINÁRIO, Diego Felismino. Avaliação do estado sanitário de camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados em quatro fazendas no Estado do Ceará. 2009. 88 p. Dissertação (Mestre em Ciências Marinhas Tropicais)- Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009. Disponível em: <[http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/1703/1/2009\\_dis\\_dfapolinario.pdf](http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/1703/1/2009_dis_dfapolinario.pdf)>. Acesso em: 01 dez. 2017

BENZIE, J. A H. Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research*, v. 31, n. 1, p. 95–119, 2000.

BENZIE, J.A.H. (2009). Use and exchange of genetic resources of penaeid shrimps for food and aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, vol. 1, no. 3-4, p. 232-250.

BRAVINGTON, M. V. e WARD, R. D. Microsatellite DNA markers: evaluating their potential for estimating the proportion of hatchery-reared offspring in a stock enhancement programme. *Molecular Ecology*, v. 13, p. 1287–1297, 2004.

BRUFORD, M.W., CHEESMAN, D.J., COOTE, T., GREEN, H.A.A., HAINES, S.A., ORYAN, C., 1996. Microsatellites and their application to conservation genetics. In: Smith, T.B., Wayne, R.K. (Eds.), *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, Oxford, pp. 278

CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, v. 255, n. 1-4, p. 1–29, 2006.

COSTA, M.R.F; VIEIRA, P.P.R; FERREIRA, C.O; LACERDA, M.V.G; ALECRIM, W.D; ALECRIM, M.G.C. Diagnóstico molecular da malária em uma unidade de atenção terciária na Amazônia Brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(4):381-385, jul-ago, 2008.

COSTA, A. M.; BUGLIONE C. C.; BEZERRA, F. L.; MARTINS, P. C. C.; BARRACCO, M. A. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. *Aquaculture*. v. 291, p. 141–146, 2009.

FALCONER, D.S. Introdução à genética quantitativa, Trad. SILVA, M.A. & SILVA, J.C. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 1987. 279p

FEIJÓ, R.G. Prospecção de genes relacionados à ocorrência de enfermidades no camarão *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931) sob condições de cultivo. Dissertação apresentada ao Curso de Ciências Marinha Tropicais. Universidade Federal do Ceará LABOMAR-UFC. Fortaleza, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma: FAO, p.230, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma: FAO, p.40, 2014

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200

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

FRANCISCO, A.K. de; GALETTI JUNIOR, P.M. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. *Genetics and Molecular Biology*, v.28, p.258-261, 2005. DOI: 10.1590/S1415-47572005000200014.

FREITAS, P.D. de; GALETTI JUNIOR, P.M. PCR-based VNTR core sequence analysis for inferring genetic diversity in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Genetics and Molecular Biology*, v.25, p.431-434, 2002. DOI: 10.1590/S1415-47572002000400012.

GEBARA, C.M.S; WOSIACKI, S.R; NEGRÃO, F.J; ALFIERI, A.A; ALFIERI, A.F. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.56, n.2, p.168-174, 2004

GJEDREM, T; BARANSKI, M. Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction, pp. 221. Springer, New York, 2009.

GOUDET, J. FSTAT (vers.1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, v.86, n., p.485-186, 1995.

HENEGARIU, O., HEEREMA, N.A., DLOUHY, S.R., VANCE, G.H., VOGT, P.H. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, v.23, p.504-511, 1997.

LIGHTNER, D.V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*.v. 15, p.579-601. 1996b

- LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 106, n. 1, p. 110–130, jan. 2011
- 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
- LOH, P.C. et al. Recent developments in immunologically-based and cell culture protocol for the specific detection of shrimp viral pathogens. In: FLEGEL, T.W. (ed.) *Advances in shrimp biotechnology* Bangkok, National Center for Generic Engineering and Biotechnology. p 255-259, 1998.
- MAGGIONI, R. et al. Genetic variability of marine shrimp in the Brazilian industry. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 8, p. 968–974, 2013.
- MEEHAN, D. et al. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea:Decapoda]. *Marine biotechnology*, v. 5, n. 4, p. 311–30, 2003.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura*, 2010. Brasília, 2012.
- MOLINA, Adriana Lopes; TOBO, Patricia Renovato. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Série – Biologia molecular, einstein*. 2004;2(2):139-142;
- MONTALDO, H. H. et al. Evaluation of genetic variability loss in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 16, n. 4, 2013.
- 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.
- NOGUEIRA, L,F,F. Análise do Snp C892t do Gene Hsp70 como marcador de resistência do camarão *Litopenaeus vannamei* ao vírus da mionecrose infecciosa - IMNV. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR, 2016. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/17883>>.
- NUNES,A.J.P.; MARTINS, P.C.; GESTEIRA, T.C. Carcinicultura Ameaçada. *Panorama da Aquicultura*. Rio de Janeiro.v. 14.p.37-57. maio/jun. 2004.
- O'CONNELL, M., WRIGHT, J.M., 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7, 331 – 363.
- OIE. *International Aquatic Animal Health Code and Diagnostic Manual of Aquatic Animal Diseases*, 5th Edn. Office International de Epizooties, Paris. ([http://www.oie.int/eng/normes/en\\_acode.htm](http://www.oie.int/eng/normes/en_acode.htm)). 2002.
- PÉREZ, F. et al. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*.

Marine biotechnology (New York, N.Y.), v.7, n.5, p. 554–69, 2005.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, v.86, p.248-249, 1995.

RICE, W. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, v.43, n.1, p. 223-225, 1989.

ROCHA, I.P. Panorama da carcinicultura brasileira em 2007. *Panorama da Aqüicultura*, 104: 26-31. 2007.

ROCHA, I.P; ROCHA, D.M. Produção Mundial de Camarão: principais produtores, mercados e oportunidades para o Brasil. *Revista da ABCC*. Ano XI nº1: p. 50-59, 2009

SAMBROOK, J. et al. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, 1989.

SENAPIN S.; PHEWSAIYA K.; BRIGGS M.; FLEGEL T.W. 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture* 266:32-38

SILVA, Ana Cecília Gomes . Susceptibilidade do Camarão *Rosa Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967) ao Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).. 2009. 53 p. Dissertação (Mestre em Ciências Marinhas Tropicais)- Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais , Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

Disponível em:

<[http://repositorio.ufc.br/ri/bitstream/riufc/31/1/2009\\_dis\\_acgsilva.pdf](http://repositorio.ufc.br/ri/bitstream/riufc/31/1/2009_dis_acgsilva.pdf)>. Acesso em: 01 dez. 2017.

VALLES-JIMENEZ, R.; CRUZ, P.; PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology*, v.6, n.5, p. 475–84, 2005.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P.F. *Micro-Checker User Guide*. University of Hull, 2005.