

Bárbara Othero Nunes Mugnaini

**MARCADORES MICROSATÉLITES NA INVESTIGAÇÃO DA
VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Litopenaeus vannamei*
(BOONE, 1932)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação em Aquicultura da Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Aquicultura

Orientadora: Maria Risoleta Freire Marques
Coorientador: Guilherme de Toledo e Silva

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mugnaini, Bárbara Othero Nunes

Marcadores microssatélites na investigação da
variabilidade genética de *Litopenaeus vannamei*
(BOONE, 1932) / Bárbara Othero Nunes Mugnaini ;
orientadora, Maria Risoleta Freire Marques,
coorientador, Guilherme de Toledo e Silva, 2017.
92 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. *Litopenaeus vannamei*. 3.
microssatélites. 4. marcadores funcionais. 5.
variabilidade genética. I. Marques, Maria Risoleta
Freire . II. Silva, Guilherme de Toledo e . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Marcadores microssatélites na investigação da variabilidade genética de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1932).

Por

BÁRBARA OTHERO NUNES MUGNAINI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



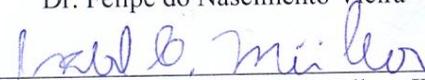
Profa. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura/UFSC
Portaria 1889/GR/2017

Banca Examinadora:



Dra. Maria Risoleta Freire Marques – Orientadora

Dr. Felipe do Nascimento Vieira - UFSC



Dra. Isabel Cristina Müller - IFC



Dra. Juliana Righetto Moser - UDESC

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Mônica e pai Marco, por sempre me apoiarem em todas as escolhas desde o dia que escolhi morar na Ilha. Por fazerem de tudo e mais para que essa experiência fosse positiva e viesse a ser meu novo lar.

A minha irmã Mayra, pela vida inteira ao meu lado, pelos anos de companhia aqui deste lado, por sempre me escutar, por ser tão autêntica e a “profe” mais colorida que os alunos já viram.

A minha irmã Mariana, minha pequena.

Ao meu companheiro Gustavo, por todos os dias que me acompanhou na jornada de laboratório, nunca me deixando sozinha. Por toda a tranquilidade, amor e cuidado na convivência diária. Por decidirmos juntos o caminho que vem. Por juntos trazermos o Caetano para completar nossa família quase tradicional. Amamos você!

À professora e orientadora Dra. Maria Risoleta, pela convite em fazer parte do LABCAI, antes do antes da minha decisão de fazer a Pós. Esses quase 3 anos aqui, foram de muitos aprendizados. Grata pelos ensinamentos sempre!

Ao Dr. Guilherme Toledo, meu coorientador, obrigada por me colocar nessa. Obrigada por me mostrar o mundo da genética. Gui, obrigada por fazer esse trabalho dar certo! Que você faça vôos, que te façam Bem....cada vez mais altos! Obrigada Obrigada!

À Laurinha, por minerar os dados que utilizamos para o desenho dos iniciadores, por ser tão prestativa. Sucesso na sua caminhada!

Ao Professor Dr. Rubens Nodari do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), por ceder o espaço para as corridas de eletroforese.

Ao Alison, do Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais (NPFT), por “quebrar meu medo” com géis. Por me mostrar que uma rotina de laboratório, mesmo intensa pode ser menos estressante. Sem a sua ajuda, eu não teria conseguido finalizar essa etapa. Muito muito muito Obrigada!

Aos Montagna e Miguel do NPFT, por me direcionarem nas primeiras análises de dados.

A Gi, obrigada por sempre querer saber como realmente estou e não “tudo bem”. Obrigada por escutar meus “choros” durante esse processo. Obrigada por sempre estar presente.

Aos colegas de laboratório, pela companhia seja no RU, no café ou na bancada, vocês fizeram parte disso: Luiz, Tómaç, Gabriela, Lucas, Ana, Clei, Ju Tisca, Karla.

Camis, Daína, Flávia, Gabi, Isis, Lila, Rômi, obrigada pelas conversas, ajudas, ensinamentos, bolos, cafés, risadas, festas. Cada uma foi peça chave nessa caminhada. “A vida lá fora é melhor e é pra lá que eu vou!”. Vocês ficam para a vida além lab! Carinho por cada uma!

A Ju Moser, por ter dado o “ponta pé” inicial a esse projeto anos atrás.

Ao Jacó, melhor técnico das galáxias, sem palavras, você fez TODA diferença por aqui. Obrigada mesmo!

Ao Fabrício, obrigada por mostrar com atitudes e ações, que quando se acredita em algo com verdadeiro amor...tudo flui, a vida fica mais leve e inúmeras portas se abrem. Muito surf no seu caminho!

Aos professores Afonso e Razzera, por também contribuírem para que minha rotina de laboratório fosse possível.

Ao Carlito, obrigada por ser sempre prestativo com os alunos da pós.

Ao Laboratório de Camarões Marinhos (LCM/UFSC), pelos animais cedidos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

Se por ventura, me esqueci de alguém...muito obrigada também!

RESUMO

Embora sua importância mundial seja reconhecidamente relevante, marcadores genéticos disponíveis em base de dados pública são ainda limitados para o camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. No primeiro capítulo do presente estudo, foram identificados marcadores moleculares do tipo microssatélites (*Simple Sequence Repeats*, SSRs) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) para *L. vannamei*, a partir da mineração de dados, utilizando ferramentas de bioinformática, em um transcriptoma desta espécie de crustáceo, obtido por montagem *de novo*. Foram encontrados cerca de 37 mil sequências, contendo motivos SSRs, e 510.050 mil SNPs potenciais. A maioria dos motivos microssatélites encontrados nos transcritos foram de trinucleotídeos (66,49%), seguidos de motivos tetranucleotídeos (12,97%), dinucleotídeos (10,01%), hexanucleotídeos (8,21%) e pentanucleotídeos (2,32%). Foram detectados motivos microssatélites em um total de 25.273 transcritos, sendo 38,83% destes anotados. Dos marcadores SNPs identificados, 50,78% correspondem a transições (ts), e 49,22% a transversões (tv), com uma razão de 1,03 (ts/tv). No segundo capítulo, a avaliação da diversidade genética em espécimes de *L.vannamei* de uma população mantida em laboratório, realizada por meio de genotipagem, utilizando marcadores microssatélites previamente descritos, evidenciou, de forma preliminar, que os níveis de diversidade entre os indivíduos são comparáveis àqueles de espécimes de *L.vannamei* estudados em outras localidades, embora não exista estruturação genética aparente e também uma média elevada nos estimadores de parentesco. Consta também neste trabalho, uma avaliação quanto à viabilidade de marcadores microssatélites minerados em transcriptoma, tendo como base iniciadores desenhados para dezenove marcadores potenciais, associados a genes do sistema de defesa celular. Nossos resultados mostram-se promissores em futuros estudos com marcadores genéticos funcionais e podem contribuir na busca por genótipos com melhor desempenho em programas de melhoramento, bem como auxiliar no gerenciamento da diversidade genética dos estoques de *L.vannamei*.

Palavras-chave: Aquicultura, *Litopenaeus vannamei*; microssatélites; marcadores funcionais; variabilidade genética.

ABSTRACT

Despite its worldwide importance, the availability of genetic markers for the Pacific shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in public database is still limited. In the first chapter of the present study, molecular markers, microsatellites, or simple sequence repeats (SSRs), and single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified for *L. vannamei*, through data mining in a *de novo* assembled transcriptome of this species, using bioinformatics tools. About 37,000 sequences containing microsatellite motifs and 510,050,000 putative SNPs were found. Most of the microsatellite motifs found in the transcripts comprised trinucleotides (66.49%), followed by tetranucleotide motifs (12.97%), dinucleotides (10.01%), hexanucleotides (8.21%) and pentanucleotides (2.32%). Microsatellite motifs were detected in a total of 25,273 transcripts, of which 38.83% were annotated. Among the identified SNPs, 50.78% were transitions (ts) and 49.22% transversions (tv), with a ratio of 1.03 (ts / tv). In the second chapter, the genetic diversity of a *L.vannamei* population kept under laboratory conditions, was evaluated by means of genotyping, based on previously published SSR markers. Preliminary results showed that the levels of diversity among the individuals are comparable to those found for other *L.vannamei* specimens studied in other localities, although there is no genetic structure and also a high average in kinship estimators. The present study also includes an evaluation of the feasibility of transcriptome mined microsatellite markers, based on primers designed for nineteen potential markers associated with genes related to the cell defense system. Our results provide new functional genetic markers that may contribute to future studies in the search for genotypes with better performance for breeding programs, as well as to assist in the management of genetic diversity of *L.vannamei* stocks.

Keywords: Aquaculture, *Litopenaeus vannamei*; microsatellites; functional markers; genetic variability.

LISTA DE FIGURAS INTRODUÇÃO

Figura 1 - <i>Litopenaeus vannamei</i> e sua classificação taxonômica. Fonte: (FAO, 2017).....	21
Figura 2 - Produção de camarões (t) no Estado de Santa Catarina entre 2001 e 2015 Fonte: EPAGRI, 2015.....	24

LISTA DE TABELAS INTRODUÇÃO

- Tabela 1 - Quantidade e valor dos principais produtos de aquicultura, em ordem decrescente do valor total da produção – Brasil - 2014..... 20
- Tabela 2 - Resumo das características dos marcadores utilizados em estudos aplicados à aquicultura. Tipo I - marcadores associados a genes; Tipo II - marcadores associados a regiões não codificadoras. ... 27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESTs – *Expressed Sequence Tags*
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICN2 – Conferência Mundial sobre Nutrição
IHHNV – Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética
QTLs – *Locus* de Característica Quantitativa
NGS – Sequenciamento de Nova Geração
NHGRI – Instituto Nacional de Pesquisa Genoma Humano
OIE – Organização Internacional de Epizootias
pb – pares de base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PDA – Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira
SOFIA – *The State of World Fisheries and Aquaculture*
SPF – Livre de Patógenos Específicos
SPR – Resistente a Patógenos Específicos
TSV – Vírus da Síndrome de Taura
WSSV – Vírus da Síndrome da Mancha Branca
YHV – Vírus da Cabeça Amarela
Ho – Heterozigosidade Observada
He – Heterozigosidade Esperada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1	AQUICULTURA.....	19
1.2	CARCINICULTURA	21
1.2.1	Breve histórico do cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i>.....	22
1.2.2	O Desafio do cultivo frente às doenças.....	24
1.3	MARCADORES MOLECULARES	26
1.3.1	Tecnologias de Sequenciamento de DNA.....	27
1.3.2	Marcadores Microssatélites	30
1.3.3	Polimorfismo de Nucleotídeo Único	32
1.3.4	Aplicação de Marcadores na Aquicultura	34
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVO GERAL.....	39
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	CAPÍTULO 1: Busca <i>in silico</i> por marcadores microssatélites (SSRs) e marcadores polimórficos de nucleotídeo único (SNPs) em um transcriptoma de <i>Litopenaeus vannamei</i>, obtido por montagem <i>de novo</i>.....	41
5	Introdução	42
6	Materiais e métodos	43
6.1	Transcriptoma de <i>Litopenaeus vannamei</i>	43
6.2	Identificação de potenciais microssatélites	43
6.3	Identificação dos SNPs	44
7	Resultados e Discussão	44
7.1	Estatísticas dos Microssatélites.....	44
7.2	Estatísticas dos marcadores SNPs.....	49
8	Conclusão.....	50
9	Referências	50
10	CAPÍTULO 2: Avaliação da diversidade genética de uma população comercial de <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1932).	55

11	Introdução	55
12	Materiais e métodos.....	57
12.1	População de estudo e escolha dos <i>loci</i> microssatélites	57
12.2	Extração de material genômico	57
12.3	Otimização das reações de amplificação dos <i>loci</i> microssatélites	58
12.4	Análise dos dados	59
13	Resultados e discussão.....	59
13.1	Padronização e otimização das reações de PCR.....	59
13.2	Diversidade genética.....	64
14	CONCLUSÃO.....	77
15	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	79

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 AQUICULTURA

Segundo o último relatório da FAO (2016), organizações internacionais, assim como representantes da indústria e da sociedade civil, destacam a importância do uso da água para a nutrição e segurança alimentar da população global, que até 2050 deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas. A Conferência Mundial sobre Nutrição (ICN2) reafirma a importância da oferta de peixes e frutos do mar para a nutrição de comunidades costeiras, visto que estas populações dependem desta fonte de alimentos para obter proteínas e micronutrientes essenciais. A prática da aquicultura é uma das atividades responsáveis para suprir tal demanda (FAO, 2014).

A atividade aquícola tem importante papel no aumento da oferta de pescados, na proteção dos estoques naturais e na melhoria da condição econômica das comunidades que se utilizam da aquicultura. A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, a qual traça objetivos e metas para os próximos 15 anos (2016 - 2030), tem como um dos objetivos aumentar os benefícios econômicos para que pequenos países insulares e em desenvolvimento possam desenvolver a aquicultura, através de uma gestão sustentável (ONU, 2015).

A aquicultura produziu 73,8 milhões de toneladas equivalentes a 160,2 bilhões de dólares em vendas – do produtor para o primeiro comprador – em 2014 (FAO, 2016). Em 2016, o setor aquícola forneceu metade de toda a demanda de pescado consumida no mundo. A União Europeia foi o maior mercado consumidor, seguido dos Estados Unidos e Japão (FAO, 2016). A China, responsável por 60% da produção mundial, é seguida por Índia, Vietnã, Bangladesh e Egito. No ranking global, o Brasil, caiu da 12ª posição, com uma produção total de 707,461 milhões de toneladas em 2012, para a 14ª posição, com 562,5 milhões de toneladas produzidas no ano de 2014 (FAO, 2014; 2016). No entanto, dados do SOFIA (2016), estimam que o país deva registrar um crescimento de 104% na produção da aquicultura e pescados até 2025, devido aos investimentos feitos no setor nos últimos anos.

O Governo Brasileiro, diante do cenário de aumento do poder de consumo das classes médias, especialmente em relação ao consumo de pescado, lançou o Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira (PDA – 2015 – 2020), considerando que não existem mais

estoques pesqueiros disponíveis em grandes quantidades, e que o aumento da oferta de pescado se dará via aquicultura (MPA, 2015).

O PDA tem como objetivo aumentar a produção aquícola nacional e como metas, atingir até 2020 uma produção de dois milhões de toneladas de pescado por meio da atividade. Nas cadeias produtivas, se tem como expectativa uma produção de: 1.750.000 toneladas de peixes; 200.000 toneladas de camarão; 40.000 toneladas de mexilhões; 10.000 toneladas de ostras. Para o alcance destes níveis de produção, além dos Programas lançados dentro do PDA, R\$ 500 milhões devem ser aplicados no período 2015-2020, com uma previsão de retorno em torno oito bilhões de reais.

Dados do último levantamento disponível pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE,2015), mostraram que a produção brasileira cresceu (Tabela 1), comparada ao ano anterior, e atingiu um valor de produção de R\$ 4,39 bilhões, sendo a maior parte (69,9%) oriunda da criação de peixes. Na piscicultura, a tilápia é a espécie mais cultivada, com 219,33 mil toneladas despescadas em 2015, representando 45,4% do total da despesca nacional (IBGE, 2015). Esta produção é seguida pela criação de camarões (20,6%), concentrada na região nordeste do país.

Tabela 1 - Quantidade e valor dos principais produtos da aquicultura, em ordem decrescente do valor total da produção – Brasil - 2014.

Principais Produtos	Quantidade (t)	Valor	
		Total (1000 R\$)	Percentual (%)
Peixes (kg)	483.241.273	R\$ 3.064,693	69,9
Camarões (kg)	69.859.745	R\$ 901.895,00	20,6
Alevinos (milheiros)	955.614	R\$ 181.990,00	4,2
Larvas e pós-larvas de camarões (milheiros)	17.044.028	R\$ 145.690,00	3,3
Ostras, vieiras e mexilhões (kg)	21.063.395	R\$ 86.766,00	2,0
Outros animais (1)	..	R\$ 2.256,00	0,1
Sementes de ostras, vieiras e mexilhões (milheiros)	66.504	R\$ 1.822,00	0,0
Total		R\$ 4.385.112,00	100,0

(1)Foi pesquisado apenas o valor da produção por incluir diferentes espécies de animais, não sendo aplicável a unidade de medida de produção.

Fonte: IBGE, 2015

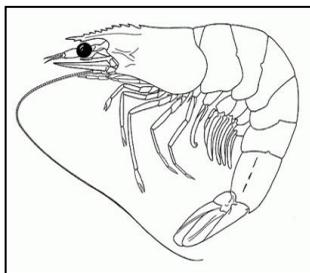
1.2 CARCINICULTURA

O cultivo de camarão marinho teve seu início no Sudeste Asiático, onde por séculos os fazendeiros colhiam suas safras provenientes de viveiros abastecidos por marés (ROSENBERRY, 2017). Na década de 1930, após a obtenção de desovas e pós-larvas de *Penaeus japonicus* (Bate, 1888) em laboratório, por pesquisadores japoneses, liderados por Motosaku Fujinaga, as áreas de cultivo começaram a ser ampliadas (SAMPAIO, 2017). Mas, foram nas décadas de 70 e 80, quando pescadores e larvicultores começaram a abastecer os criadores com grandes quantidades de juvenis, que a produção de camarões cultivados cresceu consideravelmente (ROSENBERRY, 2017).

Na economia mundial, a carcinicultura ganhou grande destaque com o cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Figura 1), responsável por 76% de toda produção de peneídeos (FAO, 2011). A espécie nativa do Pacífico da América Central e do Sul, é cultivada em sistemas tradicionais e modernos. Nas últimas três décadas, o cultivo desta espécie de peneídeo contribuiu para que a carcinicultura passasse de uma atividade de subsistência para uma indústria de produção de alimentos, com papel direto no sustento de milhares de famílias (ROBLES-SIKISAKA, 2012).

Nas Américas, se produz cerca de 20% do camarão de cultivo do mundo, sendo os principais produtores Equador, Brasil, Honduras e México (LIGHTNER, 2011). No Brasil, *L.vannamei* é a terceira espécie mais cultivada pela aquicultura, tendo sua produção concentrada na região Nordeste – responsável por 99,3% do total nacional, sendo os estados do Ceará e Rio Grande do Norte os maiores produtores (KUBITZA, 2015; IBGE, 2015).

Figura 1 - *Litopenaeus vannamei* e sua classificação taxonômica. Fonte: FAO,(2017)



Reino: Animalia
 Filo: Arthropoda
 Classe: Malacostraca (Latreille, 1806)
 Ordem: Decapoda (Latreille, 1803)
 Família: Penaeidae (Rafinesque, 1815)
 Gênero: *Litopenaeus* (Pérez farfante e Kensley, 1997)
 Espécie: *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

1.2.1 Breve histórico do cultivo de *Litopenaeus vannamei*

A primeira desova originada de cultivo de *L. vannamei* ocorreu na Flórida no ano de 1973, a partir de uma fêmea selvagem trazida do Panamá (FAO, 2017). Em 1976, neste mesmo país, com a descoberta da ablação unilateral do pedúnculo ocular – técnica cuja finalidade é induzir a maturação gonadal de fêmeas em cativeiro – e da nutrição adequada, o cultivo comercial foi introduzido na América do Sul e América Central. O conseqüente crescimento da cultura desta espécie se deu por sua alta adaptabilidade a condições de cultivo e a variações de salinidade, aliada à capacidade de tolerar altas densidades e ótimo desempenho zootécnico (LIU et al., 2012).

O cultivo no Brasil teve seu início nos primeiros anos da década de 90, depois de produtores e pesquisadores decidirem descontinuar a domesticação de espécies nativas. A espécie *L. vannamei* foi escolhida devido ao êxito de seu cultivo em países como Equador e Panamá e por sua boa adaptação às diferentes condições existentes nos ecossistemas brasileiros (ABCC, 2011). Não existem muitos registros formais deste período, mas sabe-se que esta introdução se deu por meio de espécimes selvagens oriundos do Equador, Panamá, Venezuela e, posteriormente, em 2006, seis linhagens livre de patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*), vinda dos Estados Unidos (SEIFERT, comunicação pessoal). Estas últimas, importadas pela Genearch Aquicultura, empresa associada à Aquatec, foram submetidas a um programa (Programa Genético SPF, da própria empresa), visando sua adaptação às condições locais, e tendo sido lançada comercialmente a *Speed Line-SPF* em 2009. A introdução de espécimes de diferentes regiões geográficas utilizada para compor os reprodutores brasileiros, possivelmente produziu alguma variação genética, como resultado do Efeito Fundador (PRIMACK, 2001).

No Brasil, com o objetivo de evitar a introdução de novos patógenos, o IBAMA publicou a Portaria nº 145/98, de 29 de outubro de 1998, proibindo a importação de espécies exóticas para aquicultura, exceto para fins de aquarofilia. Anos depois, apesar da possibilidade de liberação de importação de reprodutores, o Ministério da Agricultura e Abastecimento (MMA), juntamente com o IBAMA e a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), ainda recomendam que os produtores não importem novos animais, com a finalidade de evitar a introdução de novos patógenos. Desde então, os plantéis são mantidos com os animais das próprias fazendas, sendo novas linhagens obtidas a

partir de reprodutores nascidos em cativeiro (FREITAS; CALGARO; GALETTI JUNIOR, 2007), ou, ainda, de pós-larvas adquiridas comercialmente, como aquelas originadas da linhagem *Speed Line-SPF* da Aquatec, por exemplo. A manutenção da variabilidade genética do estoque nacional, causa preocupação para a indústria camaroneira. Ações que busquem garantir a manutenção e/ou aumento da diversidade genética podem ser parte da solução deste problema (MAGGIONE et al., 2013).

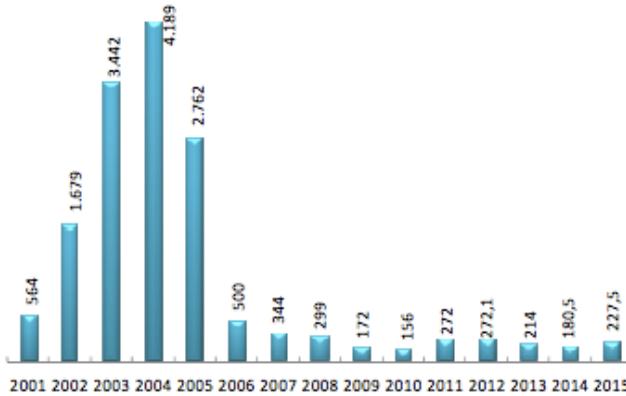
Mesmo com a proibição de importação de novos reprodutores, no final de 2004, Santa Catarina foi o primeiro estado brasileiro a detectar indícios da presença do WSSV. No início de 2005, foi emitida uma notificação oficial à Organização Internacional de Epizootias (OIE), após confirmação da doença por diagnóstico, realizado pela Universidade do Arizona (UAZ) e pela Universidade de Santa Catarina (UFSC) (FRAGA, 2016; SEIFFERT, 2017).

A origem da enfermidade ainda é um fato sem explicação, havendo hipóteses de ter sido trazida por animais importados de maneira clandestina, ou de que o vírus chegou ao estado de Santa Catarina anos antes, por meio de animais trazidos do Uruguai — país que recebe camarões do Equador, onde há registros anteriores da enfermidade causada pelo WSSV (SEIFFERT, 2017).

O estado de Santa Catarina, que chegou a produzir 4.189 toneladas em 2004, apresenta hoje valores de produção que não chegam a 300 toneladas/ano (Figura 2) (EPAGRI, 2015). Esta redução significativa de produção é resultado da insegurança por parte dos produtores em investir na produção, e da ausência de medidas que garantam o sucesso do cultivo, sem o risco da ocorrência do WSSV.

Hoje poucos produtores atuam no estado, nos municípios de Garopaba, Barra do Sul, Imbituba e São Francisco do Sul, somando 81,11% da produção catarinense de *L. vannamei* (EPAGRI, 2015).

Figura 2 - Produção de camarões (t) no Estado de Santa Catarina entre 2001 e 2015 Fonte: EPAGRI (2015).



1.2.2 O Desafio do cultivo frente às doenças

O principal desafio para uma carcinicultura cada dia mais intensificada é barrar a ocorrência de doenças, principalmente aquelas causadas por vírus (ROBLES-SIKISAKA, 2012). Desde a emergência de doenças de etiologia viral, como a causada pelo vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV, do inglês *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus*), vírus da cabeça amarela (YHV, do inglês *Yellow Head Virus*) e vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, do inglês *White Spot Syndrome Virus*), ocorreram perdas mundiais na casa dos bilhões de dólares (MOSS; DOYLE; LIGHTNER, 2005; LIGHTNER, 2011). A enfermidade causada pelo vírus WSSV é considerada a principal e mais devastadora doença que aflige a espécie *L. vannamei*, podendo chegar a 100% de mortalidade, a partir de três a sete dias da observação dos primeiros sinais clínicos (LIGHTNER, 2011; SITHIGORNGUL et al., 2011).

Antes que pesquisadores pudessem compreender a etiologia e patogênese dos vírus e desenvolver protocolos de diagnóstico específicos, o WSSV já havia sido disseminado, tanto regional como globalmente, por meio do movimento de populações de camarão vivo (LIGHTNER, 2011; ROBLES-SIKISAKA, 2012). Ao se deparar com enormes perdas, a indústria de camarão viu-se obrigada a desenvolver programas de biossegurança com o intuito de proteger os cultivos e prevenir novos surtos. Embora muitas das melhores práticas de manejo e métodos de detecção de doenças tenham sido desenvolvidos nos últimos

anos, a produção de camarão ainda é continuamente afetada por infecções virais (MARALIT et al., 2014).

Em decorrência dos inúmeros prejuízos na cadeia produtiva do cultivo de *L. vannamei*, a elaboração de linhagens com características específicas se fez necessária. Na década de 90, o conceito SPF já havia sido introduzido na carcinicultura – animais livres de doenças específicas notificadas pela OIE e USMSFP (*United States Marine Shrimp Farming Program*). Os camarões SPF representam uma linhagem ou estoque de animais submetidos a um programa de monitoramento rotineiro, realizado ou supervisionado por um laboratório de referência de diagnóstico, e que demonstram ser livres das doenças listadas pelos órgãos voltados para a sanidade animal, por três vezes seguidas, em um intervalo mínimo de quinze dias, entre a geração parental e seus descendentes, de acordo com a OIE, ou, pelo menos durante dois anos de acordo com a USMSFP (GUERRELHAS, 2006). Os animais SPF não são considerados resistentes aos patógenos específicos, e sim livres de patologias específicas (BARMAN et al., 2012).

No Brasil, o maior e principal laboratório responsável pela comercialização de pós larvas está localizado na Barra do Cunhau – RN. Neste laboratório é desenvolvido desde 1998 um programa de melhoramento genético com base em populações de reprodutores selvagens de *L. vannamei*, importados no período de 1992-1998. No ano de 2006 – com a produção afetada pela ocorrência do WSSV – e depois de atender as exigências de importação pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o grupo adquiriu seis linhagens SPF de *L. vannamei* dos Estados Unidos, com o objetivo de possibilitar um novo programa de melhoramento genético. Hoje, uma linhagem decorrente deste programa é aquela comercializada em nível nacional, apresentando alta performance para crescimento, uniformidade de tamanho, e certificada como livre dos vírus IHHNV, IMNV, TSV e WSSV, sendo responsável por atender a maior parte dos produtores no país (AQUATEC, 2017).

1.3 MARCADORES MOLECULARES

Nos últimos anos, algumas abordagens genômicas foram aplicadas no desenvolvimento de marcadores genéticos em camarões peneídeos (CIOBANU et al., 2010; MARALIT et al., 2014; ANDRIANTAHINA; LIU; HUANG, 2013; YU et al., 2014). Os marcadores de DNA são ferramentas utilizadas para revelar variações genéticas (polimorfismos) em organismos, em nível de indivíduos, espécies e grupos taxonômicos (ZHANG et al., 2012). As variações nos genótipos têm origem em erros ocasionados durante o processo de duplicação celular ou em interações com o meio ambiente, conferindo às espécies um potencial mecanismo adaptativo (LIU; CORDES, 2004).

Marcadores de DNA permitem o acesso a regiões genômicas determinadas; a identificação de clones, linhagens e híbridos; a análise de parentesco; e a realização de estudos envolvendo mapeamento genético-molecular (ZHANG et al., 2012). Também contribuem nos programas de melhoramento genético; nos estudos sobre diversidade genética e evolução; na caracterização de populações naturais e na gestão e conservação dos recursos (VALLES-JIMENEZ; CRUZ; PEREZ-ENRIQUEZ, 2004; LABORDA, 2011; VASEEHARAN et al. 2012; MADESIS; GANOPOULOS; TSAFTARIS, 2013; MORI, 2013).

Em estudos aplicados à aquicultura, diferentes tipos de marcadores foram utilizados ao longo dos anos. No passado os tipos mais comumente usados estão representados pelas aloenzimas; pelos marcadores de DNA mitocondrial (mtDNA); e pelas técnicas envolvendo DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD, do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*) (RAPD); e de polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (LIU, 2006). Hoje os marcadores mais utilizados para estudos genômicos em espécies aquícolas, segundo um levantamento feito por Zhang e colaboradores (2012), são os microssatélites (SSR, do inglês *Simple Sequence Repeats*) e os de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*). Algumas das características básicas dos marcadores citados, estão mostradas na Tabela 2, adaptada de Liu; Cordes (2004).

Marcadores codominantes, permitem a diferenciação entre os *loci* em homozigose daqueles em heterozigose – característica que contribuiu para a consolidação do uso de SNPs e SSRs em estudos genéticos, além de mostrarem melhor reprodutibilidade, quando comparados aos outros marcadores citados. Já marcadores do tipo dominante, não permitem identificar indivíduos heterozigotos.

Tabela 2 - Resumo das características dos marcadores utilizados em estudos aplicados à aquicultura. Tipo I - marcadores associados a genes; Tipo II - marcadores associados a regiões não codificadoras.

Tipo de marcador	Necessita de informação molecular prévia?	Nível de polimorfismo encontrado	Tipo de Herança	Tipo
Aloenzima	Sim	Baixo	Mendeliana, Codominante	I
mtDNA	Não	-	Herança Materna	-
RAPD	Não	Moderado	Mendeliana, Dominante	II
RFLP	Sim	Baixo	Mendeliana, Codominante	I ou II
SSR	Sim	Alto	Mendeliana, Codominante	Maioria tipo II
SNP	Sim	Alto	Mendeliana, Codominante	I ou II

Associados a genes, os marcadores do tipo I, são mais conservados, têm menor polimorfismo, apresentam importância nos estudos de ligação genética; mapeamento de caracteres de interesse econômico; estudo de genômica comparativa; identificação de genes; seleção de genitores para cruzamentos (LIU; CORDES, 2004). São considerados funcionais quando derivados de sítios polimórficos em genes que são diretamente associados com variações fenotípicas (BAGGE et al., 2007).

1.3.1 Tecnologias de Sequenciamento de DNA

Na década de 70, Sanger, Nicklen e Coulson (1977) desenvolveram um método de sequenciamento de DNA – conhecido como Método Sanger – onde as sequências resultantes possuem aproximadamente 500 - 800 pb de comprimento. Anos mais tarde, com a técnica já mais avançada, em um trabalho de colaboração internacional, a primeira sequência do genoma humano foi publicada (CONSORTIUM, 2004). Com o Projeto Genoma Humano, ficou evidente que seria necessário o desenvolvimento de tecnologias mais rápidas e baratas e com uma alta taxa de produção de dados. Em 2004, o Instituto Nacional de Pesquisa Genoma Humano (NHGRI, do inglês *National Human Genome Research Institute*), financiou um projeto com o objetivo de reduzir o custo do sequenciamento do genoma humano – o que estimulou o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de

nova geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*) (VAN DIJK et al., 2014). Em 2005, foi lançada a primeira tecnologia NGS, a plataforma 454 (Roche). No ano seguinte a plataforma Illumina (Illumina) foi comercializada, e em 2007 a Life Technologies lançou o instrumento SOLiD (VAN DIJK et al., 2014).

Apesar de as leituras produzidas por Illumina ou SOLiD serem mais curtas (30 – 100 pb), em comparação com as produzidas pela tecnologia 454 (200 – 500 pb), estas se tornaram o paradigma dominante no mercado pela quantidade de sequências geradas no final do processo. Devido ao avanço dessas tecnologias e a redução do custo por base sequenciada, atualmente são necessárias cada vez mais ferramentas de bioinformática para a análise dos dados produzidos, que foram ampliados de menos de um Gb/corrída em 2007 para 1500 Gb/corrída em 2016 (YUE; WANG, 2017).

As tecnologias de sequenciamento NGS permitiram o aumento das aplicações genômicas, envolvendo estudos de expressão gênica; descoberta de SNPs e outras variações alélicas, o que tem impacto direto no melhoramento genético vegetal e animal (VOELKERDING; DAMES; DURTSCHI, 2009; SALEM, 2012). Aplicadas ao setor aquícola, têm ajudado a identificar marcadores genéticos associados a traços de interesse comercial (YUE, 2013), bem como a desvendar as bases moleculares de diferentes processos fisiológicos (YASUIKE et al., 2016), a identificar peptídeos antimicrobianos e bactérias benéficas com potencial probiótico (GHANBARI; KNEIFEL; DOMIG, 2015), a definir inter-relações entre genomas e genes e para aumentar nossa compreensão de como os constituintes dietéticos influenciam o metabolismo (BONACIC et al., 2016).

O sequenciamento de genomas tem sido um importante passo para decifrar mecanismos moleculares e acelerar melhorias genéticas de características economicamente importantes (YU et al., 2015). Cerca de 24 projetos de sequenciamento de genoma de espécies importantes para a aquicultura foram finalizados (YUE; WANG, 2017). Como exemplos de espécies cultivadas com seu genoma sequenciado, temos a ostra do pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), importante bivalve para consumo humano (ZHANG et al., 2012); a carpa comum *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758), que representa 10% da produção mundial da piscicultura de água doce (XU et al., 2014); a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), uma das espécies mais cultivadas na aquicultura mundial (BRAWAND et al., 2014). O sequenciamento do genoma completo de uma espécie de interesse da aquicultura oferece mais oportunidades para compreender a biologia da

mesma e facilitar a busca por marcadores genéticos e funcionais. Espera-se que mais genomas de referência das espécies cultivadas na aquicultura estejam disponíveis, no futuro e de domínio público (YUE; WANG, 2017).

Até a publicação deste trabalho, o genoma do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, ainda não havia sido sequenciado e disponibilizado publicamente, embora esforços estejam sendo feitos neste sentido (YU et al., 2015). A razão para isso pode ser devido ao alto conteúdo de sequências repetidas nos genomas de espécies de camarão (HUANG et al., 2011), como, por exemplo, a região PVSI em *L. vannamei*, onde o motivo CCTAA aparece repetido inúmeras vezes, e segundo Bagshaw & Buckholt (1997), pode representar até 7% do genoma. Estima-se que comparado a outras espécies de peneídeos próximas, o genoma de *L. vannamei* apresente um tamanho aproximado de 2.0 Gigabases e altas taxas de mutação (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2009).

Quando o genoma completo de uma espécie não está disponível publicamente, outra abordagem para a identificação de marcadores moleculares pode ser adotada a partir do sequenciamento de cDNA – a tecnologia RNA-Seq, que aproveita as ferramentas de NGS para capturar o conjunto completo de transcritos de RNAm numa célula ou tecido de um organismo (HAAS; ZODY, 2010; NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010). Analisar o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar constituintes moleculares das células e tecidos, bem como compreender o desenvolvimento e os processos associados a enfermidades (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). O sequenciamento de alto rendimento permitiu uma sondagem profunda e eficiente de transcriptomas, e as abordagens correntes para montagem dos transcritos a partir dos dados gerados dependem frequentemente do alinhamento das sequências/leituras com um genoma ou transcriptoma de referência (GRABHERR et al., 2011).

O RNA-seq para a aquicultura, segundo Zhang et al. (2012), tem grande importância, permitindo a identificação de marcadores associados a genes; análise do perfil de expressão de genes de interesse, caracterização de transcriptomas e anotação de genes. No peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822), por exemplo, pesquisadores analisaram o transcriptoma, após infecção por micobactéria (HEGEDŰS et al. (2009). Zeng e colaboradores (2013), com o objetivo de melhor compreender a interação entre o sistema imune de *L. vannamei* e a Síndrome de Taura

(TSV, do inglês *Taura Syndrome Virus*), analisaram o transcriptoma no hepatopâncreas de camarões desafiados com o vírus. Maralit e colaboradores (2014) identificaram marcadores relacionados à resistência, em *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798), desafiados com WSSV. Powell e colaboradores (2015), por sua vez, analisaram o transcriptoma de oito tecidos diferentes no camarão *Fenneropenaeus merguensis* (De Man, 1888), identificando genes associados com reprodução e desenvolvimento.

1.3.2 Marcadores Microsatélites

Na década de 80, surgiram os primeiros trabalhos constatando uma região repetitiva em *tandem* no genoma de eucariotos. Diethard e Renz (1984) descreveram estas regiões como microsatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs): sequências simples de DNA que consistem em uma ou mais repetições em *tandem* de nucleotídeos. Os autores propuseram que esse polimorfismo encontrado, poderia ser consequência de eventos como *slipage* ou *cross-over* e que essa mudança nem sempre poderia afetar a expressão do gene. Os pesquisadores Litt e Luty (1989), reconheceram regiões microsatélites no genoma humano – por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polimerase Chain Reaction*), tendo amplificado uma região (TG)_n, e encontraram 12 diferentes alelos em 37 indivíduos, sendo 32 heterozigotos.

Desde então, estes marcadores ficaram populares devido ao elevado grau de polimorfismo, tamanho favorável do *amplicon*, rápida detecção e alta reprodutibilidade (MADESIS; GANOPOULOS; TSAFTARIS, 2013). De modo geral, podem ser definidos como sequências repetidas em *tandem* dispersas no genoma, compostas por um a seis nucleotídeos, flanqueadas por regiões conservadas, tendo como características principais: herança mendeliana do tipo codominante e multialelismo (TAUTZ; RENZ, 1984; WRIGHT; BENTZEN, 1994).

A prospecção de microsatélites informativos é considerada como uma ferramenta importante para estimar a variabilidade genética, realizar seleção de famílias por *pedigree* e para o estabelecimento de programas de melhoramento genético, garantindo a sustentabilidade dos sistemas de produção direcionados por estratégias genéticas (WOLFUS; GARCIA; ALCIVAR-WARREN, 1997; CRUZ et al 2001; MEEHAN et al., 2003; PÉREZ et al., 2005). Para espécies que ainda não têm o seu genoma sequenciado – existe a limitação da construção de bibliotecas

genômicas (WANG; GUO, 2007; DAWSON et al., 2010; LABORDA, 2011).

Outra abordagem, mais recente, que tem contribuído na descoberta de novos marcadores é por meio do uso das ferramentas de NGS – o que pode aumentar consideravelmente a descoberta de novas variações alélicas (SALEM, 2012; YUE, 2013). As novas tecnologias de sequenciamento, não requerem mais a construção de bibliotecas a partir de clonagem. Assim, uma vantagem de dados gerados a partir de transcriptoma é a informação produzida sobre a variação genética funcional em genes específicos que podem estar em seleção, podendo, conseqüentemente, orientar para análise dos perfis de expressão gênica, examinar as variações neutras e as regiões genômicas sob seleção, fornecendo ferramentas sem precedentes para entender a adaptação das populações em nível molecular (HELYAR et al., 2012).

Embora apresentem importância mundial relevante, marcadores genéticos disponíveis em base de dados pública são ainda limitados para a espécie *L. vannamei* (YU et al., 2014; YUE et al. 2014). Até maio de 2017, estavam disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) um total de 675 sequências microssatélites. A maioria delas representa sequências caracterizadas a partir da construção de bibliotecas genômicas; enquanto 12 são sequências caracterizadas a partir de cDNA. Em populações de cultivo, o uso de marcadores microssatélites é informativo quanto à diversidade genética dos estoques e podem direcionar programas de melhoramento genético, auxiliando o melhoramento genético clássico.

Nos últimos anos, foram publicados diferentes estudos com foco em aumentar o conhecimento genético de *L. vannamei* (CRUZ et al. 2002; VALLES-JIMENEZ; CRUZ; PEREZ-ENRIQUEZ, 2004; ZHANG et al., 2007; FREITAS; CALGARO; GALETTI JUNIOR, 2007; CIOBANU et al., 2010 ; GORBACH et al., 2010, LI et al. 2012; ZHANG, 2013; YU et al., 2014). Pesquisadores caracterizaram marcadores microssatélites para esta espécie a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas (CRUZ et al 2001; MEEHAN et al., 2003; GARCIA; ALCIVAR-WARREN, 2007; ALCIVAR-WARREN et al., 2006; ZHI-YING et al., 2006; FREITAS; JESUS; GALETTI, 2006). No Brasil, estudos caracterizaram novos microssatélites, a partir de bibliotecas genômicas e mineração em base de dados (FREITAS; JESUS; GALETTI, 2006; MARQUES, 2009; ASANTOS et al. 2011).

Pérez et al. (2005), apresentaram um relatório sobre o desenvolvimento e uso de marcadores EST-SSR nos camarões *L. vannamei*; *L. stylirostris* (Stimpson, 1874) e *Rimapenaeus byrdi*

(Burkenroad, 1934), por meio de buscas na base de dados *Marine Genomics* (<http://www.marinegenomics.org>). ASantos et al. (2011) encontraram 21 regiões microssatélites associadas a genes a partir de dados de ESTs.

Em famílias de *L. vannamei*, derivadas de populações SPF, Wolfus; Garcia; Alcivar-Warren, (1997), analisaram a variabilidade genética com marcadores microssatélites em um programa de reprodução. Cruz et al. (2003), monitoraram por meio de marcadores microssatélites a diversidade genética por duas gerações de *L. vannamei*, com o objetivo de estabelecer os níveis de variação e prosseguir com o programa de seleção. Valles-Jimenez; Cruz; Perez-Enriquez (2004), investigaram a variação genética e estrutura da população do camarão branco *L. vannamei* em quatro diferentes localidades entre o México e Panamá. Na China, a diversidade genética e nível de endogamia de sete estoques de cultivo de *L. vannamei*, introduzidos da América Central e América do Sul, foram avaliados utilizando sete marcadores microssatélites (ZHANG, 2013). O uso de marcadores microssatélites se mostrou informativo para estudos de diversidade e estruturação genética de *L. vannamei* (CRUZ et al., 2003; MEEHAN et al., 2003; GARCIA; ALCIVAR-WARREN, 2007; MAGGIONI et al., 2013).

Existe, no Brasil, uma carência de informações recentes e disponíveis publicamente sobre a variabilidade genética dos estoques desta espécie de peneídeo. Gonçalves et al., 2005; Francisco; Galetti Junior, 2005; Magalhães; Martinez; Gaiotto, 2007; Luvesuto; Freitas; Galetti Junior, 2007; Lima et al. 2008; Marques, 2009 e Maggioni et al., 2013, realizaram trabalhos em populações de *L.vannamei* nos anos 2006-2008. No entanto, como consequência do endocruzamento, desde a proibição de importação de novas matrizes, a perda de variabilidade genética pode vir a afetar o desempenho zootécnico dos animais. Deste modo, se faz necessário retomar as análises da diversidade genética de plantéis no país, em um contexto onde doenças causadas por vírus continuam afligindo os cultivos.

1.3.3 Polimorfismo de Nucleotídeo Único

Como o próprio nome sugere, um marcador de polimorfismo de nucleotídeo único, é a alteração de uma única base na sequência de DNA. Amplamente distribuídos ao longo do genoma, são um dos principais marcadores para aplicações em genômica e genética (YUE; WANG, 2017). São bialélicos, por definição, encontrados em mais de

1% da população, distribuídos no genoma em regiões não codificadoras e codificadoras. (WANG et al., 1998). Os mecanismos de mutação resultam em transições: trocas purina-purina ($A \leftrightarrow G$), pirimidina-pirimidina ($C \leftrightarrow T$), ou transversões: purina-pirimidina ou pirimidina-purina ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$, $G \leftrightarrow T$) (VIGNAL et al., 2002).

Em geral, ocorrem com menor frequência nas regiões codificadoras do genoma do que em regiões não codificadoras (NICKERSON et al., 1998). SNPs localizados em regiões regulatórias, podem afetar a taxa de transcrição, alterando assim a expressão das proteínas correspondentes (LIAO; LEE, 2010). São denominados SNPs não sinônimos quando, nas regiões codificadoras, alteram a sequência de aminoácido dos produtos proteicos. Neste caso, a substituição pode ser conservativa ou não conservativa – quando ocorrem modificações estruturais e funcionais na proteína, em função dos aminoácidos envolvidos na troca. São nominados SNPs sinônimos, quando essas substituições não afetam a sequência primária dos produtos.

Em geral, a análise SNP envolve três etapas: (1) SNPs são identificados e mapeados em sequências ou genomas de genes conhecidos; (2) a sequência do genoma pode ser verificada pela presença ou ausência de SNPs conhecidos; (3) os SNPs no genoma podem estar ligados a um fenótipo específico, sendo baseada em diferentes modelos de estudo e análise computacional (LIAO; LEE, 2010).

Sem um genoma de referência, recentemente o sequenciamento de transcriptoma tornou-se o principal método para descoberta de SNPs (HELYAR et al., 2012.) O método RNA-seq, permitiu que genes funcionais pudessem ser sequenciados com alta cobertura, assegurando a descoberta em grande escala de novos marcadores SNPs, associados a caracteres economicamente importantes em condições de cultivo (YU et al., 2014). Mas, em peneídeos, o número de SNPs disponíveis em banco de dados públicos ainda é pequeno. Uma maior disponibilidade de sequências disponíveis poderá contribuir para a busca de marcadores SNPs em caracteres de importância econômica, como a resistência ou menor susceptibilidade a doenças em camarões de cultivo (CIOBANU et al. 2010).

Dados de RNA-seq disponíveis em base de dados pública, foram usados para a descoberta de novos marcadores SNPs em *Oreochromis niloticus* (XIA et al., 2014). Em um estudo com três populações de *Crassostrea gigas*, após sequenciamento de cDNA, utilizando a plataforma Illumina, e análise dos dados, pesquisadores

encontraram um SNP a cada 47 pb, e 1301 marcadores SNPs polimórficos, sendo que do total de 272 SNPs validados, todos estavam associados a genes induzidos em condições de estresse – salinidade, temperatura, metais pesados (WANG et al. 2014).

Em camarões, alguns estudos identificaram SNPs em genes funcionais. Glenn et al. (2005), identificaram quatro SNPs no gene alfa-amilase (*AMY2*) e um SNP no gene catepsina-L (*CTSL*), em *L. vannamei*. Mei (2006), encontrou dois SNPs associados ao hormônio hiperglicêmico de crustáceo (CHH do inglês *crustacean hyperglycemic hormone*) em *L. vannamei*. Ciobanu e colaboradores (2010), realizaram uma análise de associação entre os SNPs encontrados e resistência a doenças virais. Liu et al. (2012) analisaram 155.411 ESTs publicadas no NCBI, por meio de ferramentas de bioinformática, encontraram 17.225 SNPs (9.546 transições, 5.124 transversões e 2.481 *indels*), um total de 250 SNP não-sinônimos em genes associados com traços econômicos foram identificados como candidatos para marcadores em reprodução seletiva. Yu e colaboradores (2014), utilizaram o método de RNA-seq para o sequenciamento de *L. vannamei* no estágio de desenvolvimento misis e sequências de transcriptoma de pós larva disponíveis no NCBI. Neste trabalho os pesquisadores detectaram uma frequência de um SNP a cada 776 pb, foram selecionados 50 SNPs para validação, apontando que estes marcadores serão úteis para a construção de mapa de ligação e estudos de associação genômica.

1.3.4 Aplicação de Marcadores na Aquicultura

Amplamente utilizadas em programas de melhoramento genético de plantas e espécies terrestres de interesse comercial, o uso e a aplicação das técnicas moleculares na aquicultura ainda são incipientes. Uma vez que a diversidade de espécies cultivadas no setor é maior e existem menos oportunidades de financiamento do que na agricultura e pecuária, estes fatos podem refletir o grau de relativa incipiência atual (YUE; WANG, 2017). Marcadores moleculares apresentam potencial de uso nas pesquisas com foco no avanço da atividade aquícola, contribuindo nos estudos de rastreabilidade de espécies comercializadas, conservação, estruturação e diversidade genética e melhoramento genético.

A rastreabilidade do pescado, é essencial para o monitoramento de áreas protegidas, detecção de problema na cadeia de produção (doença ou toxina), ou mesmo a certificação de que um produto

comercializado, seja a mesma espécie anunciada. Os marcadores moleculares podem ser utilizados para identificar e genotipar espécies a partir de amostras de animais vivos ou já processados para venda e consumo (HAYES, 2004). Desta forma, a aplicação dos marcadores moleculares visa, ainda, contribuir para uma maior seguridade para o consumidor final, possibilitando a introdução de legislações e normas que regulamentem a rastreabilidade em nível local ou global de toda a cadeia produtiva (JÉRÔME et al., 2008; NIELSEN et al. 2012).

Hayes (2004), a partir de dados simulados, baseados na indústria norueguesa de salmão, determinou o número de marcadores microssatélites e SNPs necessários para atribuir com 95% de confiança a origem do pescado da aquicultura comercializado. Nielsen e colaboradores (2012), com o objetivo de monitorar áreas de pesca ilegal, utilizaram marcadores SNP, para atribuir a origem de quatro diferentes espécies de peixes comerciais da Europa: *Godus morhua* (Linnaeus, 1758) *Clupea harengus* (Linnaeus, 1758), *Solea solea* (Linnaeus, 1758) e *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758). GH et al., (2012), desenvolveram um sistema de rastreamento baseado em DNA, avaliando a eficiência de marcadores microssatélites.

Um estudo de diferenciação genética de populações de *Crassostrea gigas*, encontradas em áreas naturais da costa Europeia, próximas a zonas de atividade aquícola, a partir de uma análise de sete *loci* microssatélites, foi realizado por Meistertzheim et al, (2012). Em um estudo de paternidade, Castro et al. (2007), utilizaram 11 *loci* microssatélites previamente descritos para espécies da família Sparidae e avaliaram a sua transferibilidade para o *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), atribuindo a origem da prole.

Características economicamente importantes, como crescimento, qualidade da carne e resistência a doenças, são controlados por inúmeros genes, fatores ambientais e suas interações. O mapeamento genético de regiões cromossômicas identifica *Loci* de Características Quantitativa (QTLs, do inglês *Quantitative Traits Loci*), que permitem compreender numericamente os efeitos dos genes que determinam certa característica, acelerando o melhoramento genético (YUE, 2013). QTLs, de características importantes foram mapeados para espécies da aquicultura, como a resistência à mortalidade de verão em *C. gigas* (SAUVAGE et al., 2010); determinação do sexo em espécies de tilápia (CNAANI et al., 2008); maturidade sexual no *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) (GUTIERREZ et al., 2013).

Em *L. vannamei*, com o objetivo de compreender mecanismos moleculares para caracteres desejados, pesquisas de genética molecular

utilizando marcadores SSR e SNP para a construção de mapas de ligação e, conseqüente mapeamento de características quantitativas, foram conduzidas para permitir a seleção assistida por marcadores moleculares (ALCIVAR-WARREN et al., 2007; ZHANG et al., 2007; DU et al., 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Desde a proibição de importação de novos espécimes pelo IBAMA em 1998, o estoque nacional de *L. vannamei* é mantido com reprodutores selvagens importados antes da vigência da Portaria nº 145/98. Salvo em 2006, quando, após atender as exigências legais, um laboratório comercial localizado no Rio Grande do Norte, importou animais SPF com o objetivo de melhorar seu programa genético (AQUATEC, 2017). Desde então, novas linhagens foram criadas a partir de animais nascidos em cativeiro.

Existe, no país, uma carência de informações recentes e disponíveis publicamente sobre a variabilidade genética desta espécie de crustáceo. Visto que os trabalhos relacionados à variabilidade genética para esta espécie remontam de 2006 - 2008 (Gonçalves et al., 2005; Francisco; Galetti Junior, 2005; Magalhães; Martinez; Gaiotto, 2007; Luvesuto; Freitas; Galetti Junior, 2007; Lima et al. 2008; Marques, 2009; Maggioni et al., 2013), faz-se necessário retomar tais estudos.

Em populações de cultivo, o uso de marcadores moleculares é informativo quanto à diversidade genética dos estoques e podem direcionar programas de melhoramento, auxiliando o melhoramento genético clássico.

Embora sua importância mundial seja relevante, marcadores genéticos disponíveis em base de dados pública são ainda limitados para a espécie *Litopenaeus vannamei* (YUE et al 2014). A ausência de uma coleção de marcadores genéticos representa uma desvantagem significativa para a pesquisa relacionada com a carcinicultura. Até maio de 2017, haviam 675 sequências de marcadores microssatélites depositadas no GenBank – dessas, apenas 12 foram caracterizadas a partir de sequências de transcriptoma.

Para uma melhor compreensão de características importantes como, por exemplo, resistência a doenças, os *loci* responsáveis precisam ser identificados. A descoberta *in silico* de marcadores microssatélites e SNPs em transcriptomas disponíveis, deve contribuir para a pesquisa sobre o camarão *L. vannamei*. Dados sobre marcadores moleculares gerados a partir de transcritos são relacionados com a variação genética em genes específicos, que podem estar atuando de uma maneira mais direta no fenótipo da espécie estudada. Marcadores funcionais fornecem ferramentas sem precedentes para entender a adaptação das populações em nível molecular (HELYAR et al., 2012).

Este trabalho pretende fornecer subsídios e contribuir com futuros estudos genômicos envolvendo a espécie *Litopenaeus vannamei*,

por meio da busca de marcadores funcionais *in silico* e avaliar o uso de marcadores microssatélites funcionais. A genotipagem realizada por meio de marcadores microssatélites não associados a genes, e a análise dos dados correspondentes, em espécimes de *L. vannamei* – de uma linhagem comercializada para produtores hoje no Brasil – devem fornecer informações sobre a diversidade de uma parcela do estoque cativo nacional.

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar ferramentas moleculares, envolvendo marcadores microssatélites, fornecendo subsídios para a caracterização genética das populações de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no Brasil.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar e caracterizar *in silico* marcadores moleculares do tipo SSR e SNP em transcriptoma de camarão *L. vannamei*;
- Padronizar a metodologia de genotipagem de marcadores microssatélites no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica – UFSC;
- Caracterizar marcadores microssatélites em uma população de *L. vannamei* e definir o grau de polimorfismo em genótipos variados;
- Genotipar por meio de marcadores microssatélites espécimes de uma população de *L. vannamei* mantida em laboratório.

APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados em dois capítulos em formato de artigo científico que serão submetidos, respectivamente, à publicação na revista *Bioinformatics and Biology Insights* e *Molecular Biology Reports*.

O primeiro capítulo relata os dados da prospecção de sequências microssatélites e SNP para a espécie *Litopenaeus vannamei*, obtidos a partir da mineração em bases de dados públicas, por meio de ferramentas de bioinformática.

No segundo capítulo, foram analisados os níveis de diversidade genética em espécimes de uma população de *Litopenaeus vannamei* mantida em laboratório, por meio de marcadores descritos na literatura. Os microssatélites utilizados neste estudo foram escolhidos com base no polimorfismo e reprodutibilidade, conforme relatado por Cruz et al. (2002) e Marques (2009). Ademais, está incluída uma avaliação quanto à viabilidade da aplicação de marcadores microssatélites minerados em uma montagem *de novo* de transcriptoma de *L.vannamei* na mesma população.

4 CAPÍTULO 1: Busca *in silico* por marcadores microssatélites (SSRs) e marcadores polimórficos de nucleotídeo único (SNPs) em um transcriptoma de *Litopenaeus vannamei*, obtido por montagem *de novo*.

Laura Freitas Saraiva de Oliveira, Bárbara Othero Nunes Mugnaini, Guilherme de Toledo-Silva, Maria Risoleta Freire Marques

Resumo

A partir de uma mineração *in silico*, 37 mil seqüências correspondentes a microssatélites (*Simple Sequence Repeats*, SSRs), e 510.050 mil SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) foram encontradas em um transcriptoma de *Litopenaeus vannamei*, montado por metodologia *de novo*. A maioria dos motivos microssatélites encontrados nos transcritos corresponde a motivos trinucleotídeos (66,49%). Os motivos tetranucleotídeos (12,97%), dinucleotídeos (10,01%), hexanucleotídeos (8,21%), e pentanucleotídeos (2,32%) foram identificados, respectivamente, em menor proporção. De um total de 25.273 transcritos contendo motivos microssatélites, 38,83% correspondem a transcritos anotados. Por outro lado, entre os marcadores SNPs potenciais encontrados, 50,78% envolvem transições e 49,22% transversões, com uma razão de 1,03 (ts/tv). Nossos resultados fornecem subsídios e suporte para futuros estudos com marcadores genéticos funcionais em *L.vannamei*, podendo subsidiar a busca por genótipos com melhor perfil e/ou desempenho nesta espécie de peneídeo.

Palavra-chave: microssatélites, SSRs, SNPs, *Litopenaeus vannamei*, mineração *in silico*.

Abstract

Using an approach based on *in silico* mining, a total of 37,000 microsatellite sequences (*Simple Sequence Repeats*, SSRs) and 510,050 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) were found in a *de novo* assembled transcriptome of *Litopenaeus vannamei*. Most of the microsatellites present in the transcripts correspond to trinucleotides (66.49%). Motifs comprising tetranucleotides (12.97%), dinucleotides (10.01%), hexanucleotides (8.21%) and pentanucleotides (2.32%) were correspondently, identified to a lesser extent. From a total of 25,273 transcripts displaying microsatellite motifs, 38.83% correspond to transcripts that have been annotated. Regarding the putative identified

SNPs, 50.78% correspond to transitions, whereas 49.22% to transversions, with a ratio of 1.03 (ts / tv). Our results provide evidence of new functional genetic markers in *Litopenaus vannamei* that may contribute to the search for genotypes with better profile/performance in future studies with this penaeid species.

Keywords: Microsatellites, SSRs, SNPs, *Litopenaeus vannamei*, *in silico* mining.

5 Introdução

Marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*), e microssatélites (SSRs, *Simple Sequence Repeats*) têm sido os marcadores moleculares mais usados em estudos genômicos de espécies aquícolas (ZHANG et al. 2012). SNPs, são bialélicos, por definição, sendo encontrados em mais de 1% da população, distribuídos no genoma em regiões não codificadoras e codificadoras (WANG et al., 1998). Marcadores microssatélites (SSRs), são multialélicos, definidos como sequências repetidas em *tandem* dispersas no genoma, compostas por um a seis nucleotídeos, flanqueadas por regiões conservadas (TAUTZ; RENZ, 1984; WRIGHT; BENTZEN, 1994). São considerados marcadores funcionais, quando derivados de sítios polimórficos em genes associados a variações fenotípicas (BAGGE et al., 2007).

Compreender os dados gerados em transcriptomas é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar constituintes moleculares das células e tecidos, bem como compreender o desenvolvimento do organismo e o estabelecimento de enfermidades (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). O avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) permitiu o aumento das aplicações em estudos de expressão gênica; resultando em descobertas de novos marcadores SNPs e SSRs funcionais, tendo impacto direto no melhoramento genético vegetal e animal (VOELKRDING; DAMES; DURTSCHI, 2009; SALEM, 2012).

Aplicadas ao setor aquícola, estas tecnologias têm contribuído para identificar marcadores genéticos associados a características de interesse comercial (YUE, 2013); desvendar as bases moleculares de diferentes processos fisiológicos (YASUIKE et al., 2016), identificar peptídeos antimicrobianos, selecionar bactérias benéficas para uso como probióticos (GHANBARI; KNEIFEL; DOMIG, 2015); definir inter-relações entre genomas e genes, e para aumentar a compreensão de

como os constituintes dietéticos influenciam o metabolismo (BONACIC et al., 2016).

No entanto, poucos estudos com marcadores SNPs e SSRs funcionais caracterizados em transcriptoma foram publicados com peneídeos (CIOBANU et al. 2010; SANTOS et al, 2011; LIU et al., 2012; ZENG et al., 2013).

O presente estudo tem como objetivo identificar marcadores SSRs e SNPs *in silico*, associados a genes de *Litopenaeus vannamei*.

6 Materiais e métodos

6.1 Transcriptoma de *Litopenaeus vannamei*

As análises de prospecção dos microssatélites, SSRs, e dos SNPs, tiveram como base um transcriptoma de referência de *Litopenaeus vannamei*, montado por metodologia *de novo* (dados não publicados de OLIVEIRA, L.F.S., 2017). A referida montagem *de novo* foi resultante da compilação e, subsequente análise de transcriptomas disponíveis publicamente, bem como daquele gerado a partir de dados do nosso grupo de pesquisa. A compilação envolveu transcritos de diferentes tecidos (glândula digestiva, brânquias e hemócitos), tanto de camarões infectados, como de camarões não infectados, pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Este transcriptoma de referência obtido por OLIVEIRA, L.F.S (2017) encontra-se disponível no servidor de alta performance do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI – UFSC).

6.2 Identificação de potenciais microssatélites

No conjunto de transcritos foram identificados microssatélites (SSRs), através do programa MISA (THIEL et al., 2003). A procura de nucleotídeos considerou para motivos de dinucleotídeos apenas aqueles que possuíam seis ou mais repetições. Para motivos de trinucleotídeos, o padrão adotado para o mínimo de repetições foi quatro, enquanto para motivos de tetranucleotídeos até hexanucleotídeos, o número mínimo de repetições considerado foi três. A respectiva anotação dos transcritos contendo os motivos SSR foi recuperada do banco de dados referente ao transcriptoma de referência de *L. vannamei* do LABCAI.

6.3 Identificação dos SNPs

O mapeador Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (LI; DURBIN, 2009) foi usado para alinhar sequências curtas referentes a transcritos de diferentes tecidos de *L. vanammei*, dados gerados no trabalho de Ghaffari et al. (2014), ao nosso transcriptoma referência de *L. vanammei*. O alinhamento resultante foi analisado e processado usando o pacote SAMtools (LI et al., 2009), usando os seguintes parâmetros: *minimum read counting for variant calling 2, minimum base quality 30, minimum mapping quality 20, minimum coverage 20*. As variantes do tipo SNP foram filtradas e classificadas de acordo com o programa VCFtools (DANECEK et al., 2011)

7 Resultados e Discussão

7.1 Estatísticas dos Microsatélites

Aproximadamente 37.000 motivos microsatélites foram encontrados neste trabalho (Tabela 1). No trabalho de Zeng et al (2013), 770 motivos, foram encontrados no transcriptoma camarões desafiados com o vírus da Síndrome de Taura (TSV). A classe com maior ocorrência nos transcritos corresponde a de motivos trinucleotídeos (66,49%), o que é esperado em regiões transcritas, pois estas variantes não alterariam o *frame* de leitura da janela aberta de leitura (*open reading frame*, ORF). Os motivos tetranucleotídeos (12,97%), dinucleotídeos (10,01%), hexanucleotídeos (8,21%) e pentanucleotídeos (2,32%) completam o conjunto de marcadores SSR detectados. Zeng et al., (2013), também identificaram um número maior de trinucleotídeos (36,88%), seguida das classes tetranucleotídeos (36,23%), dinucleotídeos (23,90%) e pentanucleotídeos (2,99%).

Tabela 1. Estatísticas da identificação dos microssatélites (SSRs) para *Litopenaeus vannamei*.

Número total de sequências examinadas	119.563
Total de Microssatélites identificados	36.607
Sequências com Microssatélites	25.273
Dinucleotídeos	3.664 (10,01%)
Trinucleotídeos	24.341 (66,49%)
Tetranucleotídeos	4.748 (12,97%)
Pentanucleotídeos	848 (2,32%)
Hexanucleotídeos	3.006 (8,21%)

Os diferentes tipos de microssatélites encontrados na classe de trinucleotídeos estão representados na Figura 1. Nesta classe, o motivo específico AGG/CCT foi o mais encontrado.

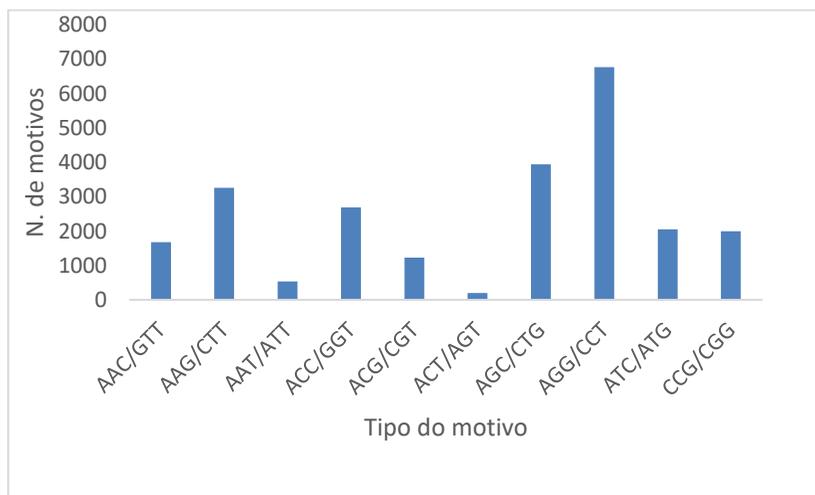


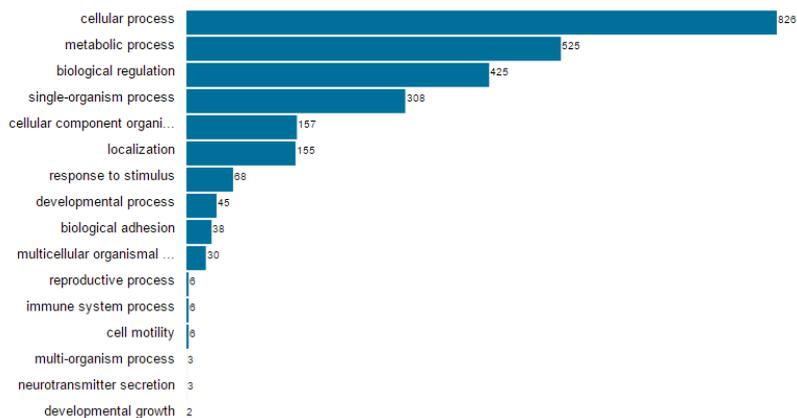
Figura 1: Tipos de motivos SSR trinucleotídeos encontrados no transcriptoma referência de *L. vannamei*, e sua respectiva correspondência numérica.

Do total de 25.273 transcritos contendo microssatélites, 38,83% correspondem a transcritos anotados. Foram recuperadas informações referentes ao sistema *Gene Ontology* (GO), que consiste de um vocabulário controlado atualizado e que representa uma importante ferramenta para descrever as propriedades de genes e seus produtos em qualquer tipo de organismo (YE et al., 2006). Com base nas anotações do sistema GO, três principais classes emergiram, função molecular, componente celular e processo biológico as quais foram representadas por 2187, 1605 e 1218 termos, respectivamente.

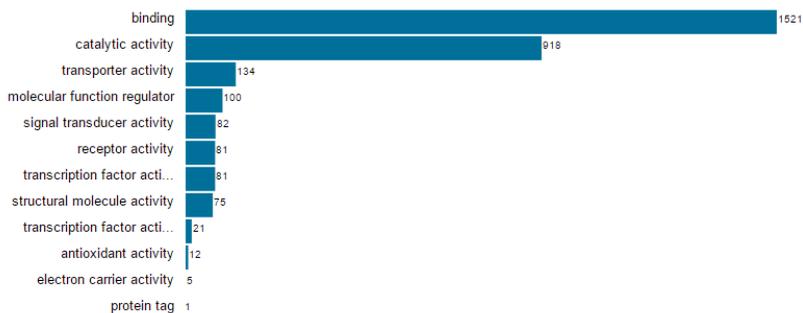
Na classe de processos biológicos (Figura 2A), os três termos mais encontrados foram: *cellular process* (GO:0009987, termos), seguido por *metabolic process* (GO:0008152, 525 termos) e *biological regulation* (GO:0065007, 425 termos). Estes três termos representam funções generalistas e mostram que os marcadores SSR são encontrados em genes envolvidos em uma variedade de processos moleculares distintos.

Dentro do subgrupo *response to stimulus* (GO:0050896), o qual pode conter genes importantes para combater enfermidades, como a causada pelo WSSV por exemplo, os termos mais abundantes foram representados por *response to stress* (GO:1905259) e *cellular response to stimulus* (GO:0051716) (Figura 2B), podendo refletir a ocorrência de potenciais marcadores funcionais. De forma análoga, os principais termos registrados na classe de função molecular foram: *binding* (GO:0005488); *catalytic activity* (GO:0003824) e *transport activity* (GO:0006810) (Figura 2C), refletindo novamente a ampla gama de genes, nos quais foram identificados motivos SSR.

A)



B)



C)



Figura 2: Classificação funcional dos genes contendo motivos SSR em *L. vannamei*, com base no sistema *Gene Ontology*. (A) Classe de processos biológicos; (B) Sub-classe do processo biológico “*response to stimulus* (GO:0051716)”; (C) Classe de função molecular.

Zeng et al., (2013), identificaram que nos genes contendo motivos microssatélites, SSRs, a maioria dos termos GO da classe de processo biológico eram os referentes a *metabolic process* (GO:0008152) e *cellular process* (GO:0009987), enquanto que nos genes da classe função molecular, a maioria estava associada à *catalitic activity* (GO:0003824), *binding* (GO:0005488) e *transport activity* (GO:0006810), de maneira muito similar aos resultados encontrados no presente trabalho. Em genes contendo motivos microssatélites, SSRs, e anotados como codificantes para enzimas, as principais classes de enzimas identificadas foram aquelas das transferases e hidrolases (Figura 3). Uma investigação complementar, voltada para encontrar microssatélites em genes codificantes de enzimas envolvidas em processos de biotransformação e outros sistemas de defesa celular, pode aumentar ainda mais a chance de encontrar marcadores funcionais envolvendo SSRs. O alto número de marcadores SSR potenciais encontrados no presente trabalho, e a diversidade gênica representada por este conjunto, aumentam consideravelmente as chances de sucesso no desenvolvimento de marcadores SSR funcionais em *L. vannamei*.

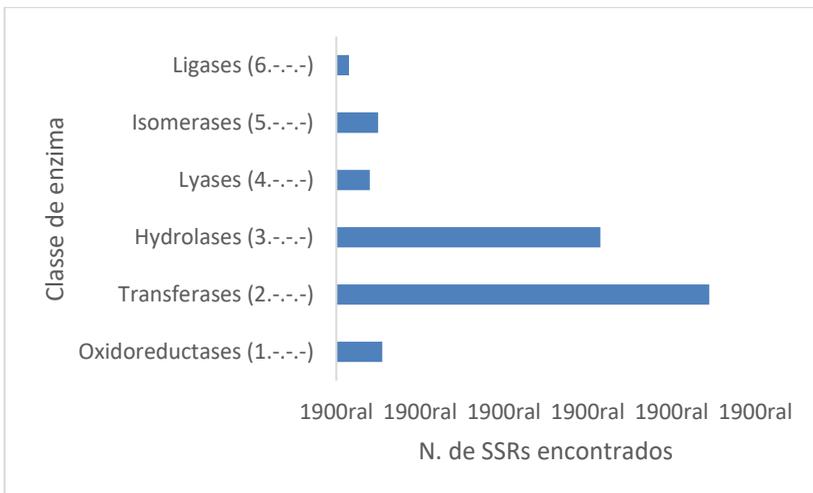


Figura 3: Classes de enzimas classificadas de acordo com a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), em cujos genes foram encontrados motivos SSRs em *L. vannamei*. Os números de seqüências SSRs estão indicados para as respectivas classes de enzimas.

7.2 Estatísticas dos marcadores SNPs

Do total de 510.050 SNPs encontrados, 50,78% são transições e 49,22% transversões, com uma razão de 1,03 de transições para transversões (Tabela 2). Em outros trabalhos com *L. vannamei*, um número menor de SNPs foi encontrado, ou seja, 1.221 por Ciobanu et al., (2010), e 20.225 por Yu et al. (2014). Em termos de substituições por transições, a quantidade de C-T/T-C e A-G/G-A foram as mais frequentes. Estas foram seguidas pelas substituições por transversões A-T/T-A, A-C/C-A, T-G/G-T e G-C/C-G (Figura 4).

O valor encontrado da razão ts/tv foi menor do que o encontrado por Ciobanu et al., (2010) (1,73) e Yu et al. (2014) (2,00), respectivamente, ambos estudos também realizados com *Litopenaeus vannamei*. Uma taxa de 2,00 na razão ts/tv é o esperado em situações neutras do genoma, devido a maior chance de ocorrência natural de transições. Como o número de SNPs encontrados no presente trabalho é comparativamente maior do que aquele evidenciado nos outros dois estudos citados, o que poderia ser explicado por uma maior quantidade de falsos positivos detectados, este fato poderia ter atuado nas taxas iguais de transversões e transições encontradas. Outra hipótese é de que as variantes detectadas tenham sofrido pressão de seleção, não podendo mais serem consideradas como parte de regiões neutras do genoma, o que implica, conseqüentemente, em diferentes razões de ts/tv. A validação experimental de uma amostra significativa destes marcadores SNPs potenciais pode elucidar esta questão, abrindo caminho para o desenvolvimento de marcadores SNPs funcionais para uso na carcinicultura.

Tabela 2: Estatísticas de transição e tipo de transversão no total de SNPs encontrados

Transições (ts)	259.023
Transversões (tv)	251.027
Total	510.050
ts/tv	1.03

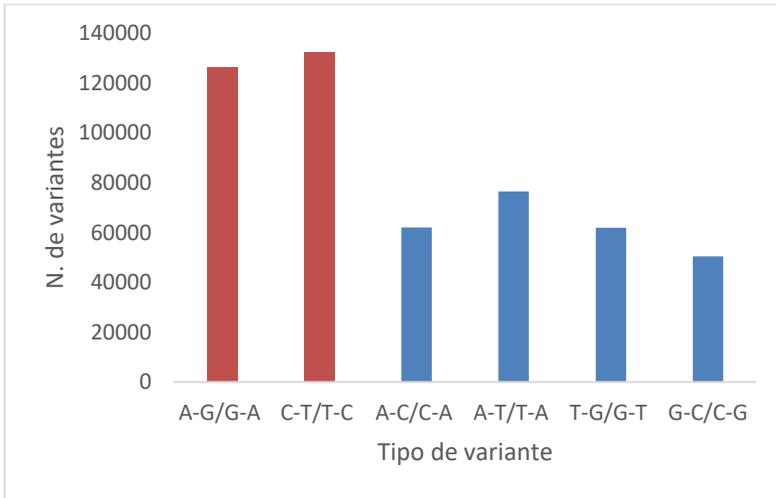


Figura 4: Tipos e número de variantes encontradas nos SNPs identificados no transcriptoma referência de *L.vannamei*.

8 Conclusão

Ao encontrar potenciais marcadores funcionais, a partir de um transcriptoma de referência, decorrente de uma montagem *de novo*, foi gerado um recurso com valioso potencial de aplicação em estudos genéticos em *Litopenaeus vannamei*. Cabe ressaltar, porém, que estes potenciais marcadores funcionais ainda necessitam validação experimental. Associar marcadores genéticos funcionais, ao desempenho destes animais frente ao desafio às condições de cultivo, pode contribuir na busca por genótipos com melhor desempenho e/ou características, e auxiliar no gerenciamento da diversidade genética dos estoques, em futuros estudos com esta espécie de peneídeo.

9 Referências

A SANTOS, Camilla et al. Characterization and genomic annotation of polymorphic EST-SSR loci in *Litopenaeus vannamei* shrimp. *Aquaculture Research*, [s.l.], v. 43, n. 10, p.1567-1570, 2 set. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02956.x>.

APWEILER, R. *et al.* UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic acids research*, v. 32, n. Database issue, p. D115-9, 2004.

BAGGE M, XIA X, Lübberstedt T (2007) Functional markers in wheat. *Current Opinion in Plant Biology* 10(2), pp. 211-216.

BONACIC, Kruno *et al.* Mechanisms of lipid metabolism and transport underlying superior performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) larvae fed diets containing n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, [s.l.], v. 450, p.383-396, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.009>.

CIOBANU, D. C. *et al.* A major SNP resource for dissection of phenotypic and genetic variation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animal Genetics*, [s.l.], v. 41, n. 1, p.39-47, fev. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01961.x>.

DANECEK, Petr *et al.* The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, [s.l.], v. 15, n. 27, p.2156-2158, jul. 2011.

GHAFFARI, Noushin *et al.* Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-10, 25 nov. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep07081>.

GHANBARI, Mahdi; KNEIFEL, Wolfgang; DOMIG, Konrad J.. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, [s.l.], v. 448, p.464-475, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>.

LI, Chaozheng *et al.* Analysis of *Litopenaeus vannamei* Transcriptome Using the Next-Generation DNA Sequencing Technique. *Plos One*, [s.l.], v. 7, n. 10, p.1-12, 11 out. 2012. Public Library of Science (PLoS). DOI: 10.1371/journal.pone.0047442.

LI, H *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, [s.l.], v. 16, n. 25, p.2078-2079, jul. 2009.

LI, H.; DURBIN, R.. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, [s.l.], v. 25, n. 14, p.1754-1760, 18 maio 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.

LIGHTNER, D.v.. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal Of Invertebrate Pathology*, [s.l.], v. 106, n. 1, p.110-130, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.012>.

LIU, Chengzhang et al. EST-derived SNP discovery and selective pressure analysis in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chinese Journal Of Oceanology And Limnology*, [s.l.], v. 30, n. 5, p.713-723, set. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00343-012-1252-2>.

MOSS, Shaun M; DOYLE, Roger W; LIGHTNER, Donald V. Breeding Shrimp for Disease Resistance: Challenges and Opportunities for Improvement. In: WALKER, P.; LESTER, R.; BONDAD-REANTASO, M.g.. *Diseases in Asian Aquaculture V*. Manila.: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 2005. p. 379-393.

RAMSAY, L. *et al.* A simple sequence repeat-based linkage map of Barley. *Genetics*, v. 156, n. 4, p. 1997–2005, 2000.

TAUTZ, Diethard; RENZ, Manfred. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl Acids Res*, [s.l.], v. 12, n. 10, p.4127-4138, 1984. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/12.10.4127>.

THIEL, T. *et al.* Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum*

VALENTIM-NETO, Pedro A. et al. Hsp70 expression in shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to IHNV and WSSV infection. *Virusdisease*, [s.l.], v. 25, n. 4, p.437-440, 24 out. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13337-014-0236-6>.

VOELKERDING, K. V.; DAMES, S. A.; DURTSCHI, J. D.. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical*

Chemistry, [s.l.], v. 55, n. 4, p.641-658, 26 fev. 2009. American Association for Clinical Chemistry (AACC). <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246620>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

WANG, D. G.. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*, [s.l.], v. 280, n. 5366, p.1077-1082, 15 maio 1998. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.280.5366.1077>.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, [s.l.], v. 10, n. 1, p.57-63, jan. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2484>.

WRIGHT, Jonathan M.; BENTZEN, Paul. Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews In Fish Biology And Fisheries*, [s.l.], v. 1, n. 4, p.384-388, jan. 1994.

YASUIKE, Motoshige et al. A functional genomics tool for the Pacific bluefin tuna: Development of a 44K oligonucleotide microarray from whole-genome sequencing data for global transcriptome analysis. *Gene*, [s.l.], v. 576, n. 2, p.603-609, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.023>.

YE, J. et al. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 34, n. , p.293-297, 1 jul. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl031>.

YU, Yang et al. SNP Discovery in the Transcriptome of White Pacific Shrimp *Litopenaeus vannamei* by Next Generation Sequencing. *Plos One*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-9, 30 jan. 2014. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087218>.

ZENG, Digang et al. Transcriptome Analysis of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Hepatopancreas in Response to Taura Syndrome Virus (TSV) Experimental Infection. *Plos One*, [s.l.], v. 8, n. 2, p.1-8, 28 fev. 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057515>.

ZENG, Digang et al. Transcriptome Analysis of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Hepatopancreas in Response to Taura Syndrome Virus (TSV) Experimental Infection. *Plos One*, [s.l.], v. 8, n. 2, p.1-8, 28 fev. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057515>.

ZHANG, Jiaren et al. Genomic Resources for Functional Genomics in Aquaculture Species. In: SAROGLIA, Marco; LIU, Zhanjiang (john). *Functional Genomics in Aquaculture*. Iowa: John Wiley & Sons, 2012. p. 41-77.

10 CAPÍTULO 2: Avaliação da diversidade genética de uma população comercial de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1932).

Bárbara Othero Nunes Mugnaini, Laura Freitas Saraiva de Oliveira, Alison Paulo Bernardi, Guilherme de Toledo-Silva, Maria Risoleta Freire Marques.

Resumo

Marcadores microssatélites (*Simple Sequence Repeats*, SSRs) foram utilizados para estimar os níveis de diversidade e o perfil da estrutura genética em espécimes (n=30) de *Litopenaeus vannamei*, de uma linhagem comercializada no Brasil. Com este objetivo, além do uso de SSRs descritos na literatura, uma avaliação do uso de marcadores funcionais foi também realizada, a partir de sequências SSR, mineradas em um transcriptoma de referência, obtido através de montagem *de novo*. Com base nestas sequências, um conjunto de 19 potenciais marcadores foi desenvolvido. A heterozigosidade observada variou de 0,07 a 0,68. O índice de fixação, indicou um nível considerável de consanguinidade entre os animais. A análise com o *software* STRUCTURE sugere a existência de dois *pools* gênicos, enquanto estimadores de parentesco apontam para taxas elevadas de endogamia. Os dados aqui apresentados retomam os estudos genéticos de populações cativas de *L.vannamei* no Brasil e fornecem ferramentas potenciais para a escolha de reprodutores e para o controle de diversidade genética, utilizando marcadores genômicos e funcionais.

Palavras chave: *Litopenaeus vannamei*, microssatélites, SSR, diversidade genética.

11 Introdução

O penéideo *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1932), espécie nativa do Oceano Pacífico, é o crustáceo mais cultivado em todo o mundo, tendo, conseqüentemente, importante valor comercial (YU et al., 2015). Nas Américas, é produzido cerca de 20% de todo o camarão de cultivo mundial, estando entre os principais produtores Equador, Brasil, Honduras e México (LIGHTNER, 2011). Hoje, o principal desafio para uma carcinicultura intensificada é barrar a ocorrência de doenças, principalmente aquelas causadas por vírus (ROBLES-SIKISAKA, 2012). Entre estas, a enfermidade causada pelo vírus da

mancha branca (WSSV) é considerada a principal e mais devastadora doença que aflige a espécies cultivados de *Litopenaeus vannamei*, podendo atingir taxas de mortalidade de até 100% em poucos dias, tendo sido responsável por perdas na casa dos bilhões de dólares na carcinicultura mundial (MOSS; DOYLE; LIGHTNER, 2005; LIGHTNER, 2011; SITHIGORNGUL et al. 2011).

Desde 1998, o estoque brasileiro de camarões cultivados (*L.vannamei*) é mantido com reprodutores nascidos em cativeiro, salvo quando, em 2006, após atender as exigências legais, um laboratório comercial localizado no Rio Grande do Norte, importou animais livres de patógenos específicos (SPF), oriundos dos Estados Unidos, com o objetivo de iniciar um seu programa de melhoramento genético e fornecer uma perspectiva para o setor (AQUATEC, 2017). O resultado desta iniciativa foi o início da comercialização de pós-larvas (linhagem *Speedline –SPF*) em 2009.

Apesar da expressiva importância econômica da espécie para a aquicultura no país, existe uma carência de informações recentes e disponíveis publicamente sobre a variabilidade genética de populações de *L. vannamei* aqui cultivadas. Os últimos trabalhos publicados neste sentido foram estudos restritos a algumas populações nos anos 2006-2007 (Gonçalves et al., 2005; Francisco; Galetti Junior, 2005; Magalhães; Martinez; Gaiotto, 2007; Luvesuto; Freitas; Galetti Junior, 2007; Lima et al. 2008 e Maggioni et al., 2013).

Desde que foram descritos na década de 1980, os microssatélites se consolidaram em estudos de genética populacional e, recentemente, em estudos de genômica funcional, na busca por marcadores associados a genes. São marcadores codominantes, multialélicos, auxiliam no diagnóstico genético das populações cultivadas, podendo, assim, direcionar o manejo.

No presente estudo, os níveis de diversidade genética em espécimes de *Litopenaeus vannamei*, oriundos de uma linhagem comercializada no Brasil por um laboratório comercial, foram analisados por meio de marcadores microssatélites. Marcadores microssatélites descritos na literatura foram escolhidos com base no seu polimorfismo e reprodutibilidade, conforme relatado por Cruz et al. (2001) e Marques (2009). De modo adicional e complementar, foi ainda incluída uma avaliação em relação à viabilidade de marcadores microssatélites minerados em um transcriptoma de *L.vannamei*, cuja montagem foi realizada *de novo*. Como critério de seleção dos microssatélites advindos desta prospecção foi considerado sua

associação a genes de importância para o sistema de defesa imune de crustáceos.

12 Materiais e métodos

12.1 População de estudo e escolha dos *loci* microssatélites

Foi selecionado, aleatoriamente, um total de 30 camarões juvenis de uma população de *L.vannamei*, mantida no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Esta população tem sua origem associada a única linhagem hoje comercializada no Brasil (*Speed line- HB12*).

Os *loci* microssatélites previamente descritos na literatura, foram escolhidos com base no polimorfismo e reprodutibilidade, conforme relatado por Cruz et al. (2002) e Marques (2009).

Os *loci* microssatélites associados a genes do sistema imune de *Litopenaeus vannamei* foram aqueles encontrados em um transcriptoma referência, advindo da montagem *de novo* (OLIVEIRA, L.S.F. dados não publicados). Os pares de iniciadores para estes microssatélites, foram desenvolvidos utilizando o *software* BatchPrimer3 v1.0 (YOU et al., 2008). A ferramenta utiliza um algoritmo para detectar as repetições e os motivos microssatélites, e, então, desenhar iniciadores para suas regiões flanqueadoras.

Para o desenho dos iniciadores foram seguidos os seguintes critérios: (1) iniciadores de, no máximo, 22 pb; (2) Temperatura de anelamento igual ou superior a 55 °C – com no máximo 5°C de diferença entre o par de iniciadores, (3) conteúdo de GC entre 40% a 60%, (4) ausência de complementaridade entre os iniciadores; (5) tamanho esperado dos produtos de PCR entre 200 e 300 pb.

12.2 Extração de material genômico

O DNA foi extraído seguindo o protocolo modificado de Maciel (2002), a partir de amostras individuais de pleópodes. O tecido foi colocado em tampão TE 1X + SDS 1% e proteinase K (1mg/ml), macerado e incubado, sob leve agitação, por 60 minutos a 65 °C. Finalizado o tempo de incubação, foram adicionados NaCl 5M e CTAB 10%, sendo o material incubado por mais 40 minutos a 55°C. Foi adicionado clorofórmio: isoamílico (24:1), misturado manualmente, e, em seguida, o material foi submetido a centrifugação a 14.000 rpm por

oito minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado em um novo microtubo, sendo a ele adicionado isopropanol, e misturado por inversão. As amostras permaneceram *overnight* em freezer -20 °C, e novamente foram centrifugadas nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, seco em banho seco a 50 °C, e ao final ressuspensionado em água para biologia molecular e armazenada em freezer a -20°C. A verificação da qualidade e quantificação do material extraído se deu por meio de leituras a 260nm/280nm em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technologies). A integridade das amostras obtidas foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

12.3 Otimização das reações de amplificação dos *loci* microssatélites

A otimização das reações de amplificação, ou seja, as reações em cadeia da polimerase (PCR) para cada iniciador foi realizada sob as seguintes condições: 1 X tampão de reação 1,2 – 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM para cada dNTPs, 0,1 – 0,2U de Taq (5U/ul, Uniscience), 10µM de cada iniciador, 50-100ng da amostra (DNA molde). As condições dos ciclos de PCR ocorreram em termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus Gradiente, com temperaturas de anelamento que variaram entre 45 °C e 60 °C.

Os produtos de PCR foram visualizados sob luz UV, após serem submetidos a eletroforese em gel de agarose 3%, na presença de GelRed™. Os produtos que corresponderam a um perfil satisfatório de amplificação, ou seja, apresentaram uma banda única, específica, de tamanho esperado, com boa resolução e intensidade – foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em condições desnaturantes. Os produtos foram visualizados por coloração com nitrato de prata, seguindo o protocolo adaptado de Sanguinetti, Dias-Neto e Simpson (1994). Para os *loci* que não apresentaram o perfil satisfatório, novas condições de PCR foram estabelecidas, visando otimizar a reação de amplificação. Os parâmetros cuja alteração foi testada incluíram: a concentração dos reagentes, o número de ciclos e a temperatura de anelamento. Os *loci* genômicos polimórficos para esta população, conforme o perfil obtido em eletroforese em gel de poliacrilamida, foram utilizados neste estudo para as análises genéticas, a partir de uma leitura conservativa dos géis.

12.4 Análise dos dados

Para estimar os valores de heterozigosidade esperada e heterozigosidade observada, assim como as frequências alélicas e outras métricas relacionadas, foi utilizado o programa Genealex (PEAKALL; SMOUSE, 2006). A distância genética de Nei e o dendrograma baseado nestes valores foram calculados por meio do pacote *poppr* para a plataforma estatística R (KAMVAR; TABIMA; GRÜNWARD, 2014), a partir do método de agrupamento Neighbor-Joining (NJ), utilizando um valor de *bootstrap* de 10.000. O programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000), foi utilizado para inferir sobre a estrutura da população. O programa STRUCTURE realiza a clusterização dos genótipos, baseada em uma abordagem Bayesiana, formando grupos considerando o equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação. Foram realizadas corridas independentes com período de *burn-in* de 200.000 e 500.000 repetições de MCMC, após o *burn-in*, utilizando um modelo que permite *admixture*, tendo sido testado um valor de K entre 1 e 10, com 20 repetições cada. O número ótimo de populações (K) foi selecionado de acordo com o método de Evanno, Regnaut e Goudet (2005), utilizando o programa Harvester (EARL; VONHOLDT, 2011). Para a análise de parentesco, foi utilizado o pacote *related* (PEW et al., 2014) da plataforma estatística R. Para definir qual estimador de parentesco a ser utilizado entre lynchli (LI; WEEKS; CHAKRAVARTI, 1993), lynchrd (LYNCH; RITLAND, 1999), quellert (QUELLER; GOODNIGHT, 1989) e wang (WANG, 2002), foram realizadas 100 simulações internas, e então, calculados os índices de correlação de Pearson entre os valores observados e esperados, selecionado o maior valor. Para a construção da matriz de parentesco, comparações pareadas com índices de parentesco apresentando valores acima de 0,5 foram considerados como altamente aparentados, e valores entre 0 e 0,5 como moderadamente aparentados.

13 Resultados e discussão

13.1 Padronização e otimização das reações de PCR

Durante as etapas de padronização das reações de PCR, no Laboratório de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), quatro animais foram aleatoriamente escolhidos (Figura 1A), para otimização inicial das reações. Ao se alcançar o perfil satisfatório de acordo com os critérios estabelecidos (Figura 1 - B, C, D), quer seja, banda única, específica, tamanho esperado, com boa resolução e intensidade, as reações foram reproduzidas em todos os trinta animais da

população de estudo. A análise e a comparação do perfil dos indivíduos foram realizadas a partir de uma leitura conservativa dos géis de poliacrilamida desnaturante 6%, visando a genotipagem (Figura 2). Com base nos genótipos interpretados nos géis de poliacrilamida as análises genéticas foram realizadas.

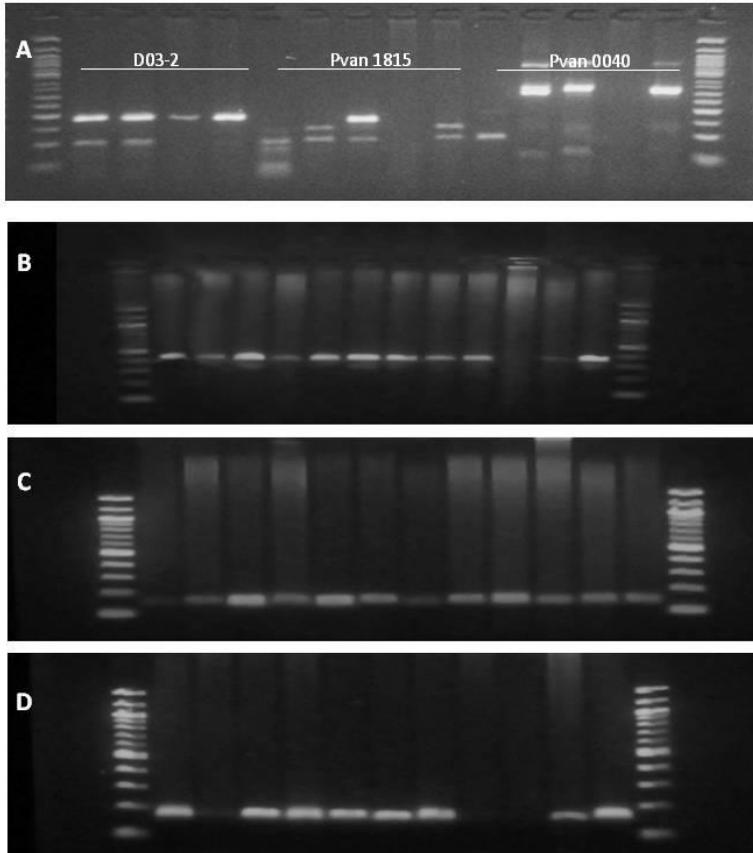


Figura 1 - Perfil de amplificação dos iniciadores durante a fase de padronização e otimização das reações de PCR, em espécimes de *L. vannamei*. A: Otimização das reações de PCR dos iniciadores D03-2, Pvan1815 e Pvan0040. Podem ser observados fragmentos amplificados de tamanho dentro do esperado, mas com a presença de bandas inespecíficas. Marcador de padrões de peso de molecular 50pb. B: Resultado da otimização da PCR para o iniciador D03-2, C: Resultado da otimização da PCR para o iniciador Pvan1815 e D: Resultado da otimização da PCR para o iniciador Pvan 0040. - Marcador de padrões de peso de molecular 100pb. Géis de agarose 3%, em TBE 1X. Coloração dos géis com GelRed®

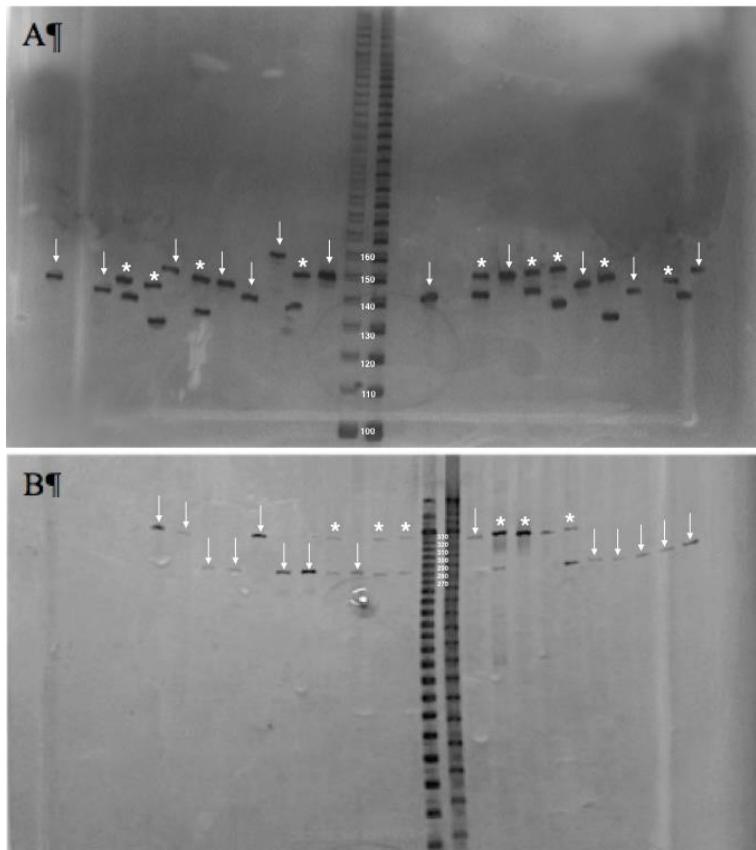


Figura 2 - Gel de poliacrilamida representativo dos perfis de genotipagem de 30 espécimes de *L. vannamei*, para cada um dos *loci* analisados. **A:** *Locus* Pvan0040, **B:** *Locus* Pvan0013. Os indivíduos que mostraram amplificação das sequências microssatélites, estão indicados com setas, no caso dos homocigotos e com asteriscos no caso dos animais heterocigotos. Gel de poliacrilamida desnaturante 6% em TBE 1X, corado com prata. Marcador padrão de peso molecular 10bp.

Do total de 37 iniciadores encontrados no transcriptoma de referência (dados não publicados), após considerar os critérios para desenho das sequências de iniciadores para as suas regiões flanqueadoras, um total de 19 iniciadores foram selecionados (Tabela 1). Na padronização inicial do conjunto de novos marcadores (Figura 3), foi observado o produto resultante da reação de amplificação correspondente a nove desses iniciadores. Dentre eles, cinco

apresentaram um tamanho de fragmento maior do que o esperado – *Peroxiredoxina*, *Destabilase 1*, Proteína IRAK1, *Myosin heavy chain type 1*, *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*. Os outros quatro, mostraram um produto da reação de amplificação de tamanho esperado. Entre estes últimos, estão incluídos aqueles relacionados ao gene Dicer -1, o qual codifica uma proteína envolvida com a ativação do complexo de silenciamento RISC, essencial para a via RNA de interferência (XUEMEI et al., 2010), e ao gene Toll 3, integrante da família de genes que codificam uma família de receptores TOLL-like, cuja indução por bactérias Gram-positivas ativa a resposta imune celular e a síntese de alguns peptídeos antimicrobianos (VU et al., 2017). Os demais estão relacionados aos genes Domeless, Quinase 1 ativada por TGF-beta, e ao gene que codifica a proteína 2 de ligação a MAP3K7 (ELEFThERIANOS et al., 2016; CAO et al., 2015). Cabe ressaltar que a observação de amplicons com tamanho diferente do esperado, pode ser explicada devido a presença de íntrons nos respectivos genes codificantes. Como não existe genoma referência disponível para a espécie, não é possível verificar as coordenadas genômicas de éxons e íntrons. Transcriptomas referências têm como dados ou base de análise os transcritos maduros, livres de íntrons. Este contexto, quando aplicado a um *template* de PCR baseado em DNA genômico, pode explicar os tamanhos maiores encontrados nos amplicons, no caso de alguns genes, o que não invalida o uso como marcadores funcionais, bastando apenas o sequenciamento do amplicon para a verificação final de sua sequência.

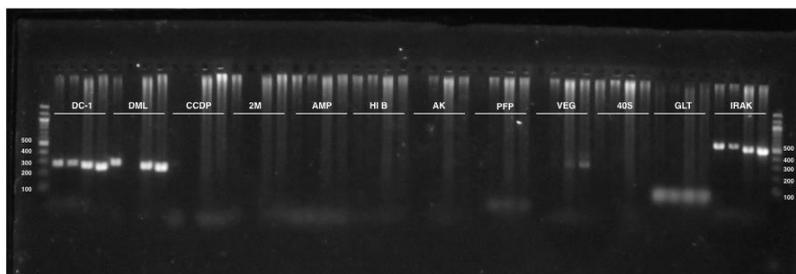


Figura 3 – Perfil de amplificação obtido com os iniciadores selecionados a partir do conjunto de microssatélites (SSRs) encontrados no transcriptoma referência, obtido na fase inicial de padronização. DC-1: *Dicer -1*; DML: *Domeless*; CCDP: *Calcium-calmodulin dependent protein kinase*; 2M: *Alpha 2 macroglobulin*; AMP: *AMP-activated protein kinase subunit gamma*; HIB: *Hypoxia inducible fator 1*; AK: *Akirin*, PFP: *Puntative c-Fos protein*, VEG: *Vascular endotelial growth fator*, 40S: *40S ribossomal protein*, GLT: *Glucose transporter 1*, IRAK: *IRAK 1*

Tabela 1 – Iniciadores baseados nos microssatélites (SSRs) encontrados no transcriptoma montado *de novo* (OLIVEIRA, L.S.F., dados não publicados). Os respectivos motivos e o gene a que estão associados estão mostrados.

<i>Locus</i>	Motivo	Função	Iniciadores (5'-3')
<i>Locus_20879</i>	(ACC)4	Peroxiredoxina	F:CTGCCAGATGAAGAGCAAGAA R:CTCCTTGAAGTGTCCGTC AAC
<i>Locus_32888</i>	(AAT)6	Destabilase I	F:ACCCTTTGTAGCGTTGTGTC R:CAGGGTCCACACACTTCTGA
<i>Locus_5072</i>	(GAT)4	Dicer-1	F:GGGTGGGACATGTTTGGTAG R:TGCCATACTAGACCGCCTCT
<i>Locus_1021</i>	(ATG)4	Domeless	F:TACCTGCTACATTGCCAAACC R:GCCCACCATGTCTTTTATGT
<i>Locus_2527</i>	(GGA)5	Proteína quinase dependente de Cálcio-calmodulina	F:GCAATCGTGATGGTTCACAAG R:CTTAGTGCCAGCAGCCTCAT
<i>Locus_340</i>	(GGC)5	Alfa 2 macroglobulina	F:CGTCTTCAACTACCTCGACCA R:TGATCAAGGTGTCCCTCCTC
<i>Locus_4604</i>	(AGC)4	Proteína quinase AMP-ativada subunidade gamma	F:GAAGTCTGATGCCTCATCTCG R:CGATTCTTATCTGCAGGTTG
<i>Locus_4121</i>	(GCG)4	Hypoxia inducible factor 1 beta	F:GAGAGATTTGCCAGGGAGAAC R:TGGTCAGTGAGGAATGATGGT
<i>Locus_868</i>	(CCA)4	Akirin	F:CTTCTCCTCCATCTCCAGCAT R:GTTCTCGCAGAAGCTGTTTAC
<i>Locus_813</i>	(CAG)5	Proteína c-Fos Puntativa	F:CATTACGACCAGCCTCAACAT R:GGTCTGTTTCGATGTTCCCTCAA
<i>Locus_1225</i>	(GCC)5	Factor de crescimento endotelial vascular 2	F:CAAGGTCAAGGTGCTGAAGAC R:CTTGCACACAC AAGCACACTC
<i>Locus_5170</i>	(GCT)4	Proteína 40S ribossomal	F:TGATGTGAATGATCCCGATG R:CCAGTCATCACCAGTTCCAGT
<i>Locus_50713</i>	(GAG)5	Transportador de glicose 1	F:GAAGAAGGAACGGAAGACCAG R:TATCTTCTCCCCACTTCTCTG
<i>Locus_6934</i>	(AG)6	Proteína IRAK1	F:ACCCTACCTGCCTGTGATTA R:CTGGTCTGCAATTTCTGTCTC
<i>Locus_34732</i>	(GAC)4	Lit v 3 allergen myosin light chain	F:CATCAACTTCACCATGTTGCTC R:GTCATCCATGTGCAACTGGTC
<i>Locus_74101</i>	(AAG)4	Myosin heavy chain type 1	F:CAAAGGTGGTGTGTCTGAGT R:CTGTACGGCAAGCTCAAGTTC
<i>Locus_4260</i>	(CAC)4	Quinase 1 ativada por TGF-beta e proteína 2 de ligação a MAP3K7	F:CCCATTACAACAACCACAAC R:GACCGACCACAACTGACACT
<i>Locus_30445</i>	(ACA)4	Toll 3	F:GACAAGGCTTTTCAGGGAGTC R:CGAGGTCCAAGGTCTTCAGAT
<i>Locus_14782</i>	(AGC)4	Transforming growth factor beta-activated kinase 1	F:CCCTGCAAGAGAAACTGTCC R:GGTTTGATCCTAAGCCACCTC

13.2 Diversidade genética

As análises de variabilidade genética na criação de camarão, podem ser decisivas no gerenciamento eficiente dos cultivos. Devido ao Efeito Fundador, uma certa perda de variabilidade genética e aumento dos níveis de endogamia são esperadas em populações de cultivo. Os descritores genéticos (Tabela 2) na população de estudo, apresentaram um total de 47 diferentes alelos observados nos cinco *loci* analisados, variando de 5 a 13 em cada. Valores estes muito semelhante aos trabalhos em que os marcadores foram caracterizados, com exceção do *locus* Pvan 0013, em que Cruz et al. (2002) encontraram dois alelos, enquanto no presente estudo, nove alelos foram visualizados – um aumento considerável da diversidade neste *locus*. O *locus* D11-1, foi o que apresentou o maior número de alelos.

Tabela 2 – Descritores genéticos dos cinco marcadores SSR genotipados neste trabalho, utilizando sequências descritas por Cruz et al (2002) e Marques (2009).

<i>Locus</i>	N	Na	produto (pb)	He	Ho	PIC	Fis
<hr/> Cruz et al. (2002) <hr/>							
Pvan 0040	22	5	145 - 163	0,71	0,27	0,64	0,620
Pvan 1815	28	11	133 - 160	0,91	0,68	0,88	0,256
Pvan 0013	21	9	278 - 333	0,87	0,24	0,83	0,730
<hr/> Marques, (2009) <hr/>							
D03-2	25	9	258 - 297	0,76	0,08	0,72	0,896
D11-1	15	13	160 - 210	0,95	0,07	0,91	0,932

N = número de indivíduos que mostraram amplificação no *locus*; Na = número de alelos encontrados; He = Heterozigiosidade esperada; Ho = Heterozigiosidade observada; PIC = conteúdo de polimorfismo, Fis = Índice de fixação

A heterozigiosidade esperada (He) variou de 0,71 a 0,95. A heterozigiosidade observada (Ho) variou bastante entre os *loci*, de 0,07 a 0,68, sendo o menor valor encontrado no *locus* D11-1 e o maior no *locus* Pvan 1815. Cruz et al. (2002), encontraram valores médios de Ho de: 0,18 no *locus* Pvan0040; 0,53 no *locus* Pvan 1815; e 0,06 no *locus* Pvan 0013, todos mais baixos que os encontrados no presente estudo.

Marques (2009), no locus D03-2 e D11-1, encontrou valores de H_o igual a 0,59 e 0,28, respectivamente – ambos superiores aos encontrados.

Uma justificativa para as diferenças encontradas pode ser a presença de alelos nulos, os quais podem aparecer quando ocorrem mutações nas regiões flanqueadoras, impedindo um ou os dois iniciadores de se ligarem ao alvo. As mesmas foram relatadas como sendo comuns em peneídeos por Cruz et al., (2002) e Meehan et al., (2003). Também não devemos desconsiderar possíveis erros amostrais associados à técnica e as características inerentes à cada população. Finalmente, os números encontrados aqui refletem de forma provisória a situação dos estoques catarinenses, e mostram que apesar do cultivo controlado as taxas apresentadas são similares a outros estudos com o mesmo enfoque.

A endogamia, estimada através do índice de fixação FIS de Wright, indica um nível considerável de consaguinidade entre os indivíduos estudados. Isso pode ser explicado por serem animais originados de uma única desova. Maggioni et al., 2013, em um estudo, com a mesma classe de marcadores, em laboratórios de cultivo no Brasil, nos anos 2005 e 2006, encontraram níveis de endogamia baixos. No entanto, a maioria dos trabalhos com populações de cultivo no país relatam a redução da variabilidade genética e aumento dos níveis de endogamia, entre linhas específicas (GONÇALVES et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2007; FREITAS; CALGARO; GALETTI JUNIOR, 2007). Por outro lado, Luvesuto; Freitas; Galetti Junior, 2007, não detectaram reduções da diversidade genética após três gerações sucessivas. Esses autores discutem seus resultados em termos da grande importância das estratégias de gestão para manter níveis adequados de diversidade genética.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) – é um indicador do potencial discriminatório de um marcador, baseado em seu polimorfismo – variou de 0,64 a 0,91. Valores semelhantes foram relatados por Silva, (2007), em um estudo com plantéis de camarão no Ceará.

A estrutura da população aqui estudada foi inferida através do programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000). O programa utiliza uma abordagem de clusterização Bayesiana, que determina, probabilisticamente, indivíduos a populações, baseado em seus genótipos, sem informação *a priori*. Em termos de formação de grupos, não existe estruturação genética. O resultado sugere dois grupos distintos (Figura 4), com taxas de contribuição próximas a 50% em todos os animais analisados.



Figura 4: Representação dos clusters formados pelo STRUCTURE. Cada indivíduo é representado por uma segmento vertical, o qual pode ser particionado entre os diferentes grupos, identificados por cores específicas. Grupo A= vermelho; Grupo B = verde.

Este resultado aponta que são proles diretas de dois grupos de pais com características muito distintas. O método de Evanno, Regnaut e Goudet (2005), indica que o número mais provável é existirem dois grupos gênicos, considerando o maior valor de Delta K (Tabela 3, Figura 5). Como também devemos considerar a probabilidade de existir apenas um *pool* gênico, o maior valor de $K = k$ calculado pelo programa Harvester, indicado na tabela 4, também foi considerado. Nesta abordagem o valor de $K=1$, ou seja, não existe estruturação genética alguma, foi a mais provável (99% de chance). Ambos os resultados são plausíveis e seria interessante obter informações sobre os reprodutores para um estudo mais detalhado, possibilitando inferir com maior precisão a estrutura genética destes animais. No entanto laboratórios de reprodução, raramente divulgam publicamente suas informações detalhadas sobre a diversidade genética e os dados utilizados para tomar decisões de reprodução, o que, quando o caso, dificulta ou impossibilita determinadas avaliações de seu processo (BENZIE, 2009).

Tabela 4: Dados do programa Harvester, utilizando os resultados do programa Structure. Foram considerados como critérios de seleção de melhor K os valores de *Mean LnP(K)* e *Delta K*.

KK	Reps	Mean LnP (K)	Delta K	Prob(K=k)
1*	20	-463.3	—	0.99
2*	20	-578.4	5.80	2.57e-56
3	20	-495.4	4.17	6.55e-12
4	20	-477.2	2.43	4.53e-05
5	20	-481.6	3.54	8.33e-08
6	20	-543.3	0.48	5.13e-14
7	20	-498.2	2.33	3.78e-12
8	20	-503.9	0.12	6.66e-18
9	20	-511.2	0.51	1.65e-21
10	20	-525.4	—	9.67e-27

*número mais provável de grupos.

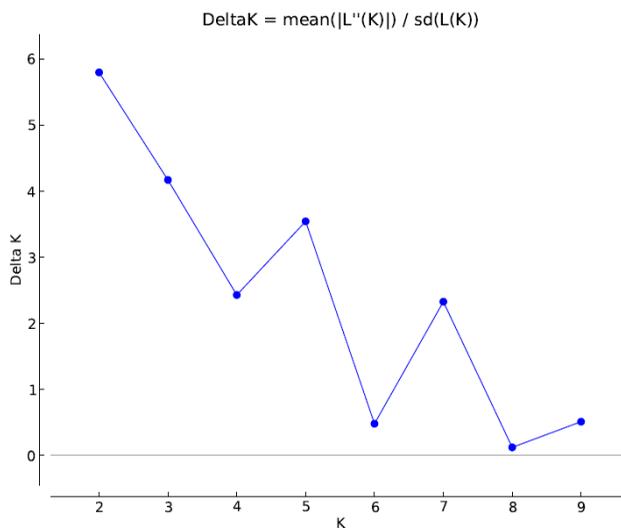


Figura 5: Gráfico de Delta K do programa Harvester, utilizando dados do programa Structure

O dendograma (Figura 6) revelou uma estreita relação genética entre os animais analisados, e devido a falta de amostras externas, a comparação serve para mostrar apenas relações intra-populacionais. Os baixos valores de *bootstrap* encontrados refletem uma necessidade de mais marcadores genotipados, assim como a presença de mais amostras para aumentar a resolução do dendograma de distância genética. Contudo, esses resultados podem ser utilizados em conjunto com os dados de parentesco. O estimador de parentesco escolhido foi o de Wang (WANG, 2002), que obteve o maior valor de correlação entre os valores observados e esperados, conforme Tabela 5. Considerando todos os 30 genótipos de *L. vannamei*, uma tendência maior foi verificada nos tipos de relação de parentesco do tipo irmãos completos (*full-sibs*) e/ou pai-filho (*parent-offspring* ou PO), do que meio irmãos (*half-sibs*), ou, ainda, de não serem aparentados (*unrelated*), conforme mostrado na Figura 7.

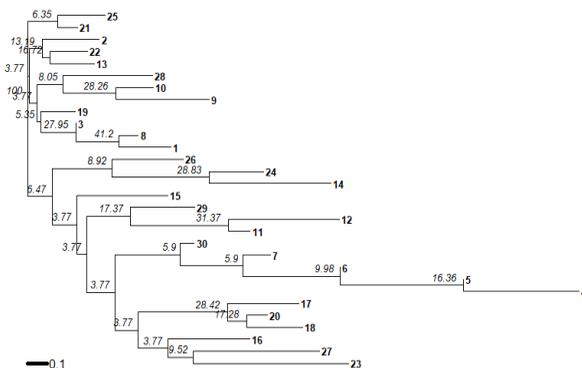


Figura 6: Dendograma incluindo os 30 indivíduos amostrados, baseado em agrupamento NJ e distância genética de Nei. Valores de *bootstrap* destacados nos nós.

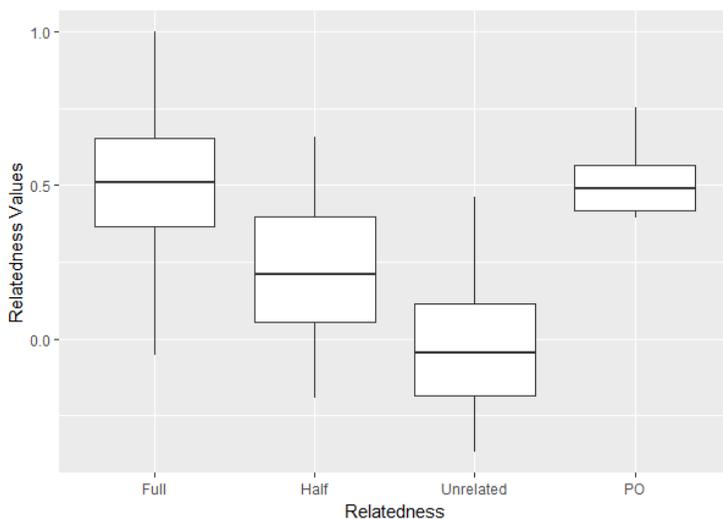


Figura 7: Gráfico de tendência de relação de parentesco, considerando todos os 30 genótipos, segundo estimador de parentesco de Wang (WANG, 2002). Tipos de relação de parentesco: *Full* - irmãos completos (*full-sibs*); *PO* – pai-filho (*parent-offspring*); *Half* - meio irmãos (*half-sibs*); *Unrelated* - não aparentados.

Tabela 5: Coeficientes de correlação entre os valores esperados e observados, utilizando quatro diferentes estimadores de parentesco.

Wang	0,776
Lynchli	0,750
Lynchrd	0,760
Quellergt	0,742

A matriz de parentesco (Figura 8), foi desenvolvida para comparar par-a-par todos os animais, a partir de uma estimativa do índice de parentesco de Wang. Os valores marcados em vermelho, destacam os animais mais aparentados. Os marcados em amarelo, têm uma relação moderada de parentesco. Os resultados da matriz, podem ser analisados juntamente com o dendograma e servem como proposta de metodologia

aplicada para seleção de animais mais distantes geneticamente, em um possível cruzamento.



Figura 8: Matriz de parentesco, considerando os 30 indivíduos analisados. Os valores marcados em vermelho destacam os animais mais aparentados, enquanto aqueles marcados em amarelo têm uma relação moderada de parentesco.

Os dados apresentados aqui mostram que apesar de descritores genéticos serem similares a de outras localidades estudadas, existe evidência de taxas elevadas de endogamia e parentesco. Um maior esforço deve ser empregado para genotipagem de mais espécimes, de diferentes laboratórios, assim como o uso de mais marcadores polimórficos, visando um estudo com mais robustez e possibilidades de análise.

Conclusão

Neste estudo os resultados apontam para um baixo nível de diversidade genética na população estudada. A análise de parentesco mostrou ser um recurso interessante para o uso direto na produção em aquicultura, podendo servir como diretriz na escolha de animais mais

distantes em futuros estudos genéticos, visando a seleção de reprodutores e/ou uma maior diversidade genética populacional nos cultivos. Os 19 potenciais marcadores funcionais encontrados no presente trabalho com base no transcriptoma de *L.vannamei* obtidos por montagem *de novo*, representam uma abordagem recente visando a seleção animal e a compreensão de possíveis respostas individuais frente a agentes estressores. Além disso, esforços devem ser feitos no sentido de encontrar um grupo de iniciadores polimórficos para futuros estudos.

Referências

BENZIE, John A. H.. Use and exchange of genetic resources of penaeid shrimps for food and aquaculture. Reviews In Aquaculture, [s.l.], v. 1, n. 3-4, p.232-250, set. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01018.x>.

CAO, Xiaolong et al. The immune signaling pathways of *Manduca sexta*. Insect Biochemistry And Molecular Biology, [s.l.], v. 62, n. 1, p.64-74, jun. 2015.

CHEN, Xiaohan et al. Transcriptome Analysis of *Litopenaeus vannamei* in Response to White Spot Syndrome Virus Infection. Plos One, [s.l.], v. 8, n. 8, p.1-8, 26 ago. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073218>.

CIOBANU, D. C. et al. A major SNP resource for dissection of phenotypic and genetic variation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Animal Genetics, [s.l.], v. 41, n. 1, p.39-47, fev. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01961.x>.

CRUZ, P. et al. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Molecular Ecology Notes, [s.l.], v. 2, n. 2, p.239-241, dez. 2001.

CRUZ, Pedro et al. Genetic Variability Assessed by Microsatellites in a Breeding Program of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Mar. Biotechnol., [s.l.], v. 6, n. 2, p.157-164, 6 nov. 2003. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10126-003-0017-5.

EARL, Dent A.; VONHOLDT, Bridgett M.. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources, [s.l.], v. 4, n. 2, p.359-361, 13 out. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.

ELEFTHERIANOS, Ioannis. TGF- β signaling regulates resistance to parasitic nematode infection in *Drosophila melanogaster*. Immunobiology, [s.l.], v. 221, n. 12, p.1362-1368, dez. 2016.

FRANCISCO, Ana Karina de; GALETTI JUNIOR, Pedro Manoel. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. Genetics And Molecular Biology, [s.l.], v. 2, n. 28, p.258-261, fev. 2005.

FREITAS, Pd.; CALGARO, Mr.; GALETTI JUNIOR, Pm.. Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) and its implication for the gene pool conservation. Brazilian Journal Of Biology, [s.l.], v. 67, n. 4, p.939-943, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-69842007000500019>.

FREITAS, Pd.; CALGARO, Mr.; GALETTI JUNIOR, Pm.. Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) and its implication for the gene pool conservation. Brazilian Journal Of Biology, [s.l.], v. 67, n. 4, p.939-943, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-69842007000500019>.

GONÇALVES, Michelle Mantovani et al. Fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) analyses and genetic diversity in *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). Genetics And Molecular Biology, [s.l.], v. 2, n. 28, p.267-270, mar. 2005.

KAMVAR, Zhian N.; TABIMA, Javier F.; GRÜNWALD, Niklaus J.. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. PeerJ, [s.l.], v. 2, p.1-12, 4 mar. 2014. PeerJ. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.281>.

LI, C.c.; WEEKS, D.e.; CHAKRAVARTI, A.. Similarity of DNA Fingerprints Due to Chance and Relatedness. *Human Heredity*, [s.l.], v. 43, n. 1, p.45-52, 1993. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000154113>.

LI, Chaozheng et al. Analysis of *Litopenaeus vannamei* Transcriptome Using the Next-Generation DNA Sequencing Technique. *Plos One*, [s.l.], v. 7, n. 10, p.1-12, 11 out. 2012. Public Library of Science (PLOS). DOI: 10.1371/journal.pone.0047442.

LUVESUTO, Eloize; FREITAS, Patrícia Domingues de; GALETTI JUNIOR, Pedro Manoel. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genetics And Molecular Biology*, [s.l.], v. 4, n. 30, p.1156-1160, jul. 2007.

LYNCH, M; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, [s.l.], v. 4, n. 152, p.1753-1766, jul. 1999.

MACIEL, Maria Luiza Toschi. Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina. 2002. 35 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

MAGALHÃES, Marcelo; MARTINEZ, Romari Alejandra; GAIOTTO, Fernanda Amato. Diversidade genética de *Litopenaeus vannamei* cultivado na Bahia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, n. 8, p.1131-1136, jul. 2007.

MARQUES, Carla Guinart. Prospecção de marcadores microssatélites em *Litopenaeus vannamei* e análise da diversidade genética em duas famílias de referência de camarões cultivados. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MEEHAN, Dawn et al. High Frequency and Large Number of Polymorphic Microsatellites in Cultured Shrimp, *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* [Crustacea: Decapoda]. *Marine*

Biotechnology, [s.l.], v. 5, n. 4, p.311-330, 1 ago. 2003. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-002-0092-z>.

PEAKALL, Rod; SMOUSE, Peter E.. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, [s.l.], v. 6, n. 1, p.288-295, mar. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.

PEREZ-ENRIQUEZ, Ricardo; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Fidencio; CRUZ, Pedro. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. Aquaculture, [s.l.], v. 297, n. 1-4, p.44-50, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.038>.

PEW, Jack et al. Related: an R package for analysing pairwise relatedness from codominant molecular markers. Molecular Ecology Resources, [s.l.], v. 15, n. 3, p.557-561, 20 set. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12323>.

QUELLER, David C.; GOODNIGHT, Keith F.. Estimating Relatedness Using Genetic Markers. Evolution, [s.l.], v. 43, n. 2, p.258-275, mar. 1989. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2409206>.

SANGUINETTI, Carlos; DIAS-NETO, Emmanuel; SIMPSON, A.j.g.. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques, Belo Horizonte, v. 17, n. 5, p.915-919, dez. 1994.

SILVA, Samara Cardoso da. Estimativa de variabilidade genética de plantéis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em laboratórios de maturação do Estado do Ceará, baseado em microssatélites e na região controle mitocondrial. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

TAUTZ, Diethard; RENZ, Manfred. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucl Acids Res, [s.l.], v. 12, n. 10, p.4127-4138, 1984. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/12.10.4127>.

VU, Ann et al. Toll-like receptors in mycobacterial infection. *European Journal Of Pharmacology*, [s.l.], v. 808, n. 5, p.1-7, ago. 2017.

WOLFUS, Greg M.; GARCIA, Denise K.; ALCIVAR-WARREN, Acacia. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture*, [s.l.], v. , n. 152, p.35-47, nov. 1997.

XUEMEI, Yao et al. A Dicer-1 gene from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Expression pattern in the processes of immune response and larval development. *Fish & Shellfish Immunology*, [s.l.], v. 29, n. 4, p.565-570, out. 2010.

YOU, Frank M et al. BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *Bmc Bioinformatics*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.253-266, 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-253>.

YU, Yang et al. Genome survey and high-density genetic map construction provide genomic and genetic resources for the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 5, p.1-14, 27 out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep15612>.

YU, Yang et al. SNP Discovery in the Transcriptome of White Pacific Shrimp *Litopenaeus vannamei* by Next Generation Sequencing. *Plos One*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.87218-87218, 30 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087218>

14 CONCLUSÃO

Estudos genéticos contribuem direta e indiretamente na melhoria da gestão, criação de animais, nutrição, diagnóstico de doenças, e melhoramento genético de características importantes para a produção. Uma maior disponibilidade de marcadores SNPs e microssatélites (SSRs), associados a genes, considerados como marcadores funcionais, deve contribuir na identificação de genes envolvidos nos mecanismos de defesa de *Litopenaeus vannamei* e sua modulação, direcionando estudos futuros com a espécie.

Uma avaliação da diversidade genética em *L. vannamei* de camarões cultivados no Brasil é importante para a carcinicultura. Na aquicultura, a melhoria de um grupo de caracteres, usando ferramentas de seleção tradicionais, pode causar uma significativa de diversidade genética, através da endogamia, principalmente em populações nas quais a diversidade genética já é limitada.

As ferramentas de genotipagem, avaliação do parentesco e estrutura populacional, baseados em técnicas de biologia molecular, apresentadas neste trabalho, trazem uma contribuição relevante para a carcinicultura e o setor aquícola como um todo, fornecendo estimativas precisas para o direcionamento na escolha dos animais, visando a composição dos plantéis em cultivo.

15 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ALCIVAR-WARREN, Acacia et al. SHRIMPMAP: A Low-Density, Microsatellite-Based Linkage Map of the Pacific Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus Vannamei*. *Journal Of Shellfish Research*, [s.l.], v. 26, n. 4, p.1259-1277, dez. 2007. National Shellfisheries Association. [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[1259:salmlm\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[1259:salmlm]2.0.co;2).

ALCIVAR-WARREN, Acacia et al. Isolation and Mapping of Telomeric Pentanucleotide (TAACC) n Repeats of the Pacific Whiteleg Shrimp, *Penaeus vannamei*, Using Fluorescence In Situ Hybridization. *Marine Biotechnology*, [s.l.], v. 8, n. 5, p.467-480, 26 maio 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-005-6031-z>.

AI, Hua-shui et al. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, [s.l.], v. 25, n. 1-2, p.28-39, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.12.002>.

A SANTOS, Camilla et al. Characterization and genomic annotation of polymorphic EST-SSR loci in *Litopenaeus vannamei* shrimp. *Aquaculture Research*, [s.l.], v. 43, n. 10, p.1567-1570, 2 set. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02956.x>.

ABCC. História da Carinicultura no Brasil. 2011. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/historia-da-carcinicultura-no-brasil/>>. Acesso em: 23 fev. 2017.

ANDRIANTAHINA, Farafidy; LIU, Xiaolin; HUANG, Hao. Genetic Map Construction and Quantitative Trait Locus (QTL) Detection of Growth-Related Traits in *Litopenaeus vannamei* for Selective Breeding Applications. *Plos One*, [s.l.], v. 8, n. 9, p.1-11, 25 set. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075206>.

AQUATEC. Aquatec. 2017. Disponível em: <<http://www.aquatec.com.br/>>. Acesso em: 27 maio 2017.

BAGGE M, XIA X, Lübberstedt T (2007) Functional markers in wheat. *Current Opinion in Plant Biology* 10(2), pp. 211-216.

BAGSHAW, Joseph C; A BUCKHOLT, Michael. A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Gene*, [s.l.], v. 184, n. 2, p.211-214, jan. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119\(96\)00597-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119(96)00597-5).

BARMAN, Debtanu et al. Specific pathogen free shrimps: Their scope in aquaculture. 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Debtanu_Barman/publication/237046566_Specific_pathogen_free_shrimps_Their_scope_in_aquaculture/links/00b7d51b006ab7c7c5000000/Specific-pathogen-free-shrimps-Their-scope-in-aquaculture.pdf>. Acesso em: 24 maio 2017.

BONACIC, Kruno et al. Mechanisms of lipid metabolism and transport underlying superior performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) larvae fed diets containing n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, [s.l.], v. 450, p.383-396, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.009>.

BRASIL. Constituição (1998). Portaria nº 145, de 29 de outubro de 1998. Portaria Nº 145/98, de 29 de Outubro de 1998. Brasília, DF, Disponível em: <http://www.institutohorus.org.br/download/marcos_legais/PORTARIA_N_145_DE_29_DE_OUTUBRO_DE_1998.pdf>. Acesso em: 14 maio 2017.

BRAWAND, David et al. The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature*, [s.l.], v. 513, n. 7518, p.375-381, 3 set. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13726>.

CASTRO, Jaime et al. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, [s.l.], v. 272, p.210-216, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.020>.

CIOBANU, D. C. et al. A major SNP resource for dissection of phenotypic and genetic variation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animal Genetics*, [s.l.], v. 41, n. 1, p.39-47,

fev. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01961.x>.

CRUZ, P. et al. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Molecular Ecology Notes*, [s.l.], v. 2, n. 2, p.239-241, dez. 2001.

CRUZ, Pedro et al. Genetic Variability Assessed by Microsatellites in a Breeding Program of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Mar. Biotechnol.*, [s.l.], v. 6, n. 2, p.157-164, 6 nov. 2003. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10126-003-0017-5.

DAWSON, Deborah A. et al. New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility - as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, [s.l.], v. 10, n. 3, p.475-494, maio 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02775.x>.

DIETHARD, Tautz; RENZ, Manfred. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 12, n. 10, p.4127-4138, maio 1984.

DU, Z.-q. et al. A gene-based SNP linkage map for pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Animal Genetics*, [s.l.], v. 41, n. 3, p.286-294, 6 maio 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.02002.x>.

EPAGRI. Síntese Informativa da Maricultura 2015. 2015. Disponível em: <<http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Sintese-informativa-da-maricultura-2015.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2017.

FAO. Aquaculture. 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/aquaculture/en>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

FAO. Fishery and Aquaculture Statistics. 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/019/i3507t/i3507t.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

FAO. *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/3404/en>>. Acesso em: 17 maio 2017.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. 2016. Disponível em: <www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2017.

FERREIRA JUNIOR, Augusto Luiz. Análise de polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNPs) do gene HSP7- em populações de *Litopenaeus vannamei* comercializadas no Brasil. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

FRAGA, Ana Paula de Medeiros. Proteínas Expressas Diferencialmente em Hemócitos do Camarão-Branco, *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931), Infectado com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). 2016. 179 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Cap. 1.

FRANCISCO, Ana Karina de; GALETTI JUNIOR, Pedro Manoel. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. *Genetics And Molecular Biology*, [s.l.], v. 2, n. 28, p.258-261, fev. 2005.

FREITAS, Patrícia D.; JESUS, Celia M.; GALETTI, Pedro M.. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. *Molecular Ecology Notes*, [s.l.], v. 7, n. 2, p.324-326, 9 nov. 2006. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01595.x. Disponível em: <<http://api.wiley.com/onlineibrary/tdm/v1/articles/10.1111/j.1471-8286.2006.01595.x>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

FREITAS, Pd.; CALGARO, Mr.; GALETTI JUNIOR, Pm.. Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) and its implication for the gene pool conservation. *Brazilian Journal Of Biology*, [s.l.], v. 67, n. 4, p.939-943, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-69842007000500019>.

GARCIA, Denise K.; ALCIVAR-WARREN, Acacia. Characterization of 35 new microsatellite genetic markers for the pacific whiteleg shrimp, *litopenaeus vannamei*: their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks, tracing pedigree in breeding programs, and linkage mapping. *Journal Of Shellfish Research*, [s.l.], v. 26, n. 4, p.1203-1216, dez. 2007. National Shellfisheries Association. [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[1203:conmgm\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[1203:conmgm]2.0.co;2).

GH, Yue et al. Tracing Asian Seabass Individuals to Single Fish Farms Using Microsatellites. *Plos One*, [s.l.], v. 7, n. 12, p.1-5, dez. 2012. Disponível em: <www.plosone.org>. Acesso em: 16 set. 2015.

GHANBARI, Mahdi; KNEIFEL, Wolfgang; DOMIG, Konrad J.. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, [s.l.], v. 448, p.464-475, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>.

GLENN, K. L. et al. SNP analysis of AMY2 and CTS Lgenes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp. *Animal Genetics*, [s.l.], v. 36, n. 3, p.235-236, jun. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01274.x>.

GONÇALVES, Michelle Mantovani et al. Fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) analyses and genetic diversity in *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genetics And Molecular Biology*, [s.l.], v. 2, n. 28, p.267-270, mar. 2005.

GORBACH, Danielle M. et al. Mining ESTs to Determine the Usefulness of SNPs Across Shrimp Species. *Animal Biotechnology*, Ames, v. 1, n. 21, p.100-103, 07 abr. 2010.

GOUDET J. FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3. 2001

GRABHERR, Manfred G et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, [s.l.], v. 29, n. 7, p.644-652, 15 maio 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1883>.

GUERRELHAS., Ana Carolina de Barros. Primeiros Resultados do *vannamei* SPF no Brasil. 2006. Disponível em:

<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/103/PRresult_Vannamei .asp>. Acesso em: 27 maio 2017.

GUTIERREZ, Alejandro P. et al. Detection of Quantitative Trait Loci (QTL) Related to Grilsing and Late Sexual Maturation in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Marine Biotechnology*, [s.l.], v. 16, n. 1, p.103-110, 4 ago. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-013-9530-3>.

HAAS, Brian J; ZODY, Michael C. Advancing RNA-Seq analysis. *Nature Biotechnology*, [s.l.], v. 28, n. 5, p.421-423, maio 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0510-421>.

HAYES, Ben; SONESSON, Ana K.; GJERDE, Bjarne. Evaluation of three strategies using DNA markers for traceability in aquaculture species. *Aquaculture*, [s.l.], v. , n. 250, p.70-81, mar. 2005.

HEGEDŐS, Zoltán et al. Deep sequencing of the zebrafish transcriptome response to mycobacterium infection. *Molecular Immunology*, [s.l.], v. 46, n. 15, p.2918-2930, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2009.07.002>.

HELYAR, Sarah J. et al. SNP Discovery Using Next Generation Transcriptomic Sequencing in Atlantic Herring (*Clupea harengus*). *Plos One*, [s.l.], v. 7, n. 8, p.1-11, 7 ago. 2012. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042089>.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2015. 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf>. Acesso em: 20 maio 2017.

JÉRÔME, Marc et al. Toward Fish and Seafood Traceability: Anchovy Species Determination in Fish Products by Molecular Markers and Support through a Public Domain Database. *J. Agric. Food Chem.*, [s.l.], v. 56, n. 10, p.3460-3469, maio 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf703704m>.

KUBITZA, Fernando. Principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. *Panorama da Aquicultura*, [s.l.], v. 25, n. 150, p.10-23, jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ferrazmaquinas.com.br/en/imagens/uploads/conteudos/42/arquivo/20151009160433oLNAnjgD3p.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

LABORDA, Prianda Rios. Marcadores moleculares microssatélites na investigação do gelo de *Drosophila mediopunctata*: desenvolvimento e construção de mapa genético de ligação. 2011. 129 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011. Cap. 1.

LI, Chaozheng et al. Analysis of *Litopenaeus vannamei* Transcriptome Using the Next-Generation DNA Sequencing Technique. Plos One, [s.l.], v. 7, n. 10, p.1-12, 11 out. 2012. Public Library of Science (PLOS). DOI: 10.1371/journal.pone.0047442.

LIAO, Pei-yu; LEE, Kelvin H.. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. Biochemical Engineering Journal, [s.l.], v. 49, n. 2, p.149-158, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.021>.

LIGHTNER, D.v.. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. Journal Of Invertebrate Pathology, [s.l.], v. 106, n. 1, p.110-130, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.012>.

LIMA, Ana Patrícia Souza de et al. Genetic monitoring of broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* in a closed rearing system in Pernambuco, Brazil. Aquaculture Research, [s.l.], v. 39, n. 13, p.1461-1466, set. 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02022.x>.

LITT, Michael; LUTY, Jeffrey A.. A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat with in the Cardiac Muscle Actin Gene. Am J Hum Genet., [s.l.], v. 3, n. 44, p.397-401, nov. 1989.

LIU, Chengzhang et al. EST-derived SNP discovery and selective pressure analysis in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Chinese Journal Of Oceanology And Limnology, [s.l.], v. 30, n. 5, p.713-723, set. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00343-012-1252-2>.

LIU, Shikai et al. Generation of genome-scale gene-associated SNPs in catfish for the construction of a high-density SNP array. *Bmc Genomics*, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-13, 21 jan. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-53>.

LIU, Z.j.; CORDES, J.f.. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, [s.l.], v. 238, n. 1-4, p.1-37, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.027>.

LUVESUTO, Eloize; FREITAS, Patrícia Domingues de; GALETTI JUNIOR, Pedro Manoel. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genetics And Molecular Biology*, [s.l.], v. 4, n. 30, p.1156-1160, jul. 2007.

MADESIS, Panagiotis; GANOPOULOS, Ioannis; TSAFTARIS, Athanasios. Microsatellites: Evolution and Contribution. *Methods In Molecular Biology*, [s.l.], p.1-13, 2013. Springer Science + Business Media. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_1.

MAGALHÃES, Marcelo; MARTINEZ, Romari Alejandra; GAIOTTO, Fernanda Amato. Diversidade genética de *Litopenaeus vannamei* cultivado na Bahia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, n. 8, p.1131-1136, jul. 2007.

MAGGIONI, Rodrigo et al. Genetic variability of marine shrimp in the Brazilian industry. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, [s.l.], v. 48, n. 8, p.968-974, ago. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2013000800023>.

MARALIT, Benedict A. et al. Subtracted Transcriptome Profile of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) That Survived WSSV Challenge. *Dataset Papers In Science*, [s.l.], v. 2014, p.1-11, 2014. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/807806>.

MARQUES, Carla Guinart. Prospecção de marcadores microssatélites em *Litopenaeus vannamei* e análise da diversidade genética em duas famílias de referência de camarões cultivados. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MEEHAN, Dawn et al. High Frequency and Large Number of Polymorphic Microsatellites in Cultured Shrimp, *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* [Crustacea: Decapoda]. *Marine Biotechnology*, [s.l.], v. 5, n. 4, p.311-330, 1 ago. 2003. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-002-0092-z>.

MEI, Yu. SNP analysis of Molting related genes in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* shrimp (Brief report). *Arch. Tierz.*, [s.l.], v. 4, n. 49, p.411-412, abr. 2006.

MEISTERTZHEIM, Anne-leila et al. Genetic structure of wild European populations of the invasive Pacific oyster *Crassostrea gigas* due to aquaculture practices. *Marine Biology*, [s.l.], v. 160, n. 2, p.453-463, 30 out. 2012. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00227-012-2102-7.

METZKER, Michael L.. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, [s.l.], v. 11, n. 1, p.31-46, 8 dez. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2626>. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n1/full/nrg2626.html>>. Acesso em: 03 mar. 2017.

MILLER, M P . TFPGA Version 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Depart. of Biological Sci. Northern Arizona University. p. 30. 1997.

MOSS, Shaun M; DOYLE, Roger W; LIGHTNER, Donald V. Breeding Shrimp for Disease Resistance: Challenges and Opportunities for Improvement. In: WALKER, P.; LESTER, R.; BONDAD-REANTASO, M.g.. *Diseases in Asian Aquaculture V*. Manila.: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 2005. p. 379-393.

MPA. Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira. 2015. Disponível em: <http://seafoodbrasil.com.br/wp-content/uploads/2015/09/Plano_de_Desenvolvimento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf>. Acesso em: 24 maio 2017.

NAGALAKSHMI, Ugrappa; WAERN, Karl; SNYDER, Michael. RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. *Current Protocols In Molecular Biology*, [s.l.], p.1-13, jan. 2010. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142727.mb0411s89>.

NICKERSON, Deborah A. et al. DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nature Genetics*, [s.l.], v. 19, n. 3, p.233-240, 1 jul. 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/907>.

NIELSEN, Einar E. et al. Gene-associated markers provide tools for tackling illegal fishing and false eco-certification. *Nature Communications*, [s.l.], v. 3, p.851-858, 22 maio 2012. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1845>.

PÉREZ, Franklin et al. Development of EST-SSR Markers by Data Mining in Three Species of Shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus biridy*. *Marine Biotechnology*, [s.l.], v. 7, n. 5, p.554-569, 14 jul. 2005. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-004-5099-1>.

PRIMACK, Richard B; RODRIGUES, Efraim. *Biologia da conservação*. Londrina: Ed. do Autor, 2001. 327p.

ROBLES-SIKISAKA, Arun K. Dhar And Refugio. Functional Genomics in Shrimp Disease Control. In: SAROGLIA, Marco; LIU, Zhanjiang (john). *Functional Genomics in Aquaculture*. Iowa: Wiley-blackwell, 2012. p. 361-375.

ROSENBERRY, Bob. Camarão Marinho: cultivo passo a passo. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/23/Cultivo.asp>>. Acesso em: 24 maio 20

SEIFFERT, Walter Quadros. A Mancha Branca em Santa Catarina. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/87/ManchaBrancaemSC87.asp>>. Acesso em: 15 maio 2017.

SITHIGORNGUL, Paisarn et al. Simultaneous and rapid detection of white spot syndrome virus and yellow head virus infection in shrimp with a dual immunochromatographic strip test. *Journal Of Virological Methods*, [s.l.], v. 173, n. 1, p.85-91, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.01.011>.

SAUVAGE, C. et al. QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Animal Genetics*, [s.l.], p.390-399, jan. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.02018.x>.

TAUTZ, Diethard; RENZ, Manfred. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl Acids Res*, [s.l.], v. 12, n. 10, p.4127-4138, 1984. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/12.10.4127>.

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*, [s.l.], v. 6, n. 5, p.475-484, 24 ago. 2004. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-004-3138-6>.

VASEEHARAN, Baskaralingam et al. Molecular markers and their application in genetic diversity of penaeid shrimp. *Aquaculture International*, [s.l.], v. 21, n. 2, p.219-241, 13 set. 2012. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-012-9582-9>.

VIGNAL, Alain et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, [s.l.], v. 34, n. 3, p.275-305, maio 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1051/gse:2002009>.

VOELKERDING, K. V.; DAMES, S. A.; DURTSCHI, J. D.. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry*, [s.l.], v. 55, n. 4, p.641-658, 26 fev. 2009. American Association for Clinical Chemistry (AACC). <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246620>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, [s.l.], v. 10, n. 1, p.57-63, jan. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2484>.

WANG, D. G.. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*, [s.l.], v. 280, n. 5366, p.1077-1082, 15 maio 1998. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.280.5366.1077>.

WANG, Yongping; GUO, Ximing. Development and Characterization of EST-SSR Markers in the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology*, [s.l.], v. 9, n. 4, p.500-511, 9 jun. 2007. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-007-9011-7>.

WANG, Jiafeng et al. Discovery and validation of genic single nucleotide polymorphisms in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Resources*, [s.l.], v. 15, n. 1, p.123-135, 11 jun. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12278>.

WOLFUS, Greg M.; GARCIA, Denise K.; ALCIVAR-WARREN, Acacia. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture*, [s.l.], v. , n. 152, p.35-47, nov. 1997.

XIA, Jun Hong et al. Genome-wide discovery and in silico mapping of gene-associated SNPs in Nile tilapia. *Aquaculture*, [s.l.], v. 432, p.67-73, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.028>.

XU, Peng et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nature Genetics*, [s.l.], v. 46, n. 11, p.1212-1219, 21 set. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3098>.

YASUIKE, Motoshige et al. A functional genomics tool for the Pacific bluefin tuna: Development of a 44K oligonucleotide microarray from whole-genome sequencing data for global transcriptome analysis. *Gene*, [s.l.], v. 576, n. 2, p.603-609, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.023>.

YU, Yang et al. Genome survey and high-density genetic map construction provide genomic and genetic resources for the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 5, p.1-14, 27 out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep15612>.

YU, Yang et al. SNP Discovery in the Transcriptome of White Pacific Shrimp *Litopenaeus vannamei* by Next Generation Sequencing. *Plos One*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.87218-87218, 30 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087218>.

YU, Yang et al. SNP Discovery in the Transcriptome of White Pacific Shrimp *Litopenaeus vannamei* by Next Generation Sequencing. *Plos One*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.87218-87218, 30 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087218>.

YUE, Gen Hua. Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture. *Fish And Fisheries*, [s.l.], v. 15, n. 3, p.376-396, 11 fev. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/faf.12020>.

ZENG, Digang et al. Transcriptome Analysis of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Hepatopancreas in Response to Taura Syndrome Virus (TSV) Experimental Infection. *Plos One*, [s.l.], v. 8, n. 2, p.1-8, 28 fev. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057515>.

ZHANG, Guofan et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, [s.l.], v. 490, n. 7418, p.49-54, 19 set. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11413>.

ZHANG, Jiaren et al. Genomic Resources for Functional Genomics in Aquaculture Species. In: SAROGLIA, Marco; LIU, Zhanjiang

(john). *Functional Genomics in Aquaculture*. Iowa: John Wiley & Sons, 2012. p. 41-77.

ZHANG, Kai et al. Analysis of Genetic Diversity and Differentiation of Seven Stocks of *Litopenaeus vannamei* Using Microsatellite Markers. *Journal Ocean University China*, [s.l.], v. 4, n. 13, p.647-656, jul. 2013.

ZHANG, Liusuo et al. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. *Genetica*, [s.l.], v. 33, n. 1, p.37-49, nov. 2007.

ZHANG, Xiaojun et al. Construction and Characterization of a Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Library of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Marine Biotechnology*, [s.l.], v. 12, n. 2, p.141-149, 8 jul. 2009. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-009-9209-y>.

ZHI-YING, Jia et al. Isolation and characterization of microsatellite markers from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Molecular Ecology Notes*, [s.l.], v. 6, n. 4, p.1282-1284, 21 set. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01515.x>.