



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

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

SAMARA CARDOSO DA SILVA

FORTALEZA
2007

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

**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**

SAMARA CARDOSO DA SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar LABOMAR da Universidade Estadual do Ceará como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais, área de concentração: Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

FORTALEZA-CE

2007

Samara Cardoso da Silva

**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**

Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Moura Coimbra
(Dep. de Pesca e Aqüicultura / UFRPE)

Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto
(Dep. de Engenharia de Pesca / UFC)

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni
(Feclesc/UECE- Orientador)

Fortaleza

2007

**Dedico este trabalho a
meus pais por todo apoio,
dedicação e sacrifícios
doados com tanto carinho e
amor.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS, que em sua infinita misericórdia me deu força e coragem para enfrentar os obstáculos apresentados permitindo mais essa conquista em minha vida.

Ao caminho NEO-Catecumenato, pelo apoio e cumplicidade nos momentos difíceis.

Aos meus pais Jacy e Eduardo, por todos os ensinamentos, conselhos e exemplo de vida que me doam até hoje sem reclamar nada em troca, simplesmente por puro amor.

A todos os meus irmãos que mesmo distante sempre olharam e torceram por mim.

A minha Querida irmã Neuly e toda sua família pelo acolhimento, dedicação e ajuda ofertados a mim desde o início dessa jornada.

A minha Querida irmã Florise pela amizade e segurança que tem me dado durante todos esses anos.

Ao Instituto de Ciências Marinhas Tropicais (LABOMAR) pela oportunidade de crescimento intelectual e pessoal.

Ao meu orientador Prof. Rodrigo Maggioni por ter confiado em mim, e por todos os ensinamentos ofertados tão generosamente durante esses dois anos de convivência. Muito obrigada pela lição de vida que és e por marcar para sempre essa etapa da minha vida.

A professora Diana Magalhães e Prof. Raimundo Bezerra pelo auxílio e por compartilhar suas experiências de forma tão caridosa, muito obrigada.

A todos que fazem parte do Grupo de Genômica e Bioinformática NUGEN/UECE pela amizade incondicional, e por tornarem-se minha segunda família.

Muito obrigada a Marcília, Michel, Carol, Michele, Carlos Eduardo, por tudo o que fizeram e fazem por mim.

Em especial aos grandes amigos Cássia, Sarah, Daniel e Carla Renata, pelo auxílio no laboratório, ajuda teórica, amizade e principalmente por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, além dos momentos de descontração.

A amiga Patrícia pelo auxílio na análise de dados.

A todos os Professores que fazem parte do corpo docente do mestrado em Ciências Marinhas Tropicais, em especial a Prof^a. Teresa Cristina, Prof^a. Cristina Rocha, Prof. Roberto Feitosa pelo crescimento alcançado.

A toda minha turma de mestrado pela convivência, e a minha grande amiga Cláudia, que se tornou irmã de coração, pelos conselhos dados tanto no lado profissional como pessoal. Admiro-te muito amiga, você sabe.

A Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) pela bolsa.

Enfim a todos que fizeram parte direta ou indiretamente desta conquista meu MUITO OBRIGADO!

A Sabedoria se deixa encontrar

A sabedoria é radiante, não fenece.
Facilmente é contemplada por aqueles que a amam.
E se deixa encontrar por aqueles que a buscam.
Ela mesma se dá a conhecer aos que a desejam.
Quem por ela madruga não se cansa.
Encontra-a sentada a porta.
Medita-la é a perfeição da inteligência.
Quem vigia por ela.
Logo se isenta de preocupações.
Ela mesma busca, em toda parte, os que a merecem.
Benigna, aborda-os pelos caminhos.
E a cada pensamento os procede.
Seu princípio é o desejo autêntico de instrução.
O afã da instrução é o amor.
O amor é a observância de suas leis.
O respeito das leis é garantia de incorruptibilidade.
E a incorruptibilidade aproxima de DEUS.
Portanto o desejo da sabedoria conduz a realeza.
Chefes dos povos: se vos agradam tronos e cedros.
Honrai a sabedoria e reinareis para sempre.

Resumo

Visando não só o progresso da carcinicultura como também a sua sustentabilidade, novas técnicas e tecnologias vêm sendo buscadas. Dentre elas, destaca-se o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, os quais visam à construção de linhagens de altas performances. Atualmente, a classe de marcadores moleculares mais amplamente utilizados para avaliar e monitorar a variabilidade genética, tanto em populações naturais como em espécies domesticadas, são os microssatélites, devido ao seu alto polimorfismo e co-dominância. Outra classe de marcadores utilizada é o conjunto de genes do DNA mitocondrial, no qual a região controle, rica em A+T e não codificadora demonstrou ser a mais útil para avaliação de variação genética intraespecífica, quando comparada com outros genes mitocondriais. No presente estudo, locos de microssatélites e a região controle mitocondrial de *Litopenaeus vannamei* foram utilizados com o objetivo de estimar a variabilidade intraespecífica e avaliar o potencial destas regiões do genoma em subsidiar a elaboração de estratégias que permitam explorar o potencial representado pelo germoplasma disponível. A variabilidade de reprodutores de laboratórios de maturação de duas fazendas do Estado do Ceará foi analisada através da utilização de 10 loci de microssatélites. A diversidade genética entre os laboratórios foi estimada pelo número de alelos por loci e heterozigosidade observada que variaram de 3,0 a 10,5 e de 0,46 a 0,84 respectivamente. Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram detectados para a maioria dos *loci* estudados dos dois laboratórios. Os níveis de endocruzamento foram analisados pelos valores positivos de Fis com exceção do loci 1003 que apresentou valores negativos para os dois laboratórios. Valores de Fst não demonstraram diferenciação significativa entre os dois laboratórios. Na análise da região controle mitocondrial o alinhamento das seqüências obtidas apresentou alta homologia entre si. Um dendrograma construído a partir da matriz Kimura 2P entre as seqüências deste estudo e seqüências de populações naturais disponíveis no GenBank®/NCBI demonstrou um bom nível de variabilidade da região controle mitocondrial, não havendo nenhum tipo de diferenciação populacional entre estas. Com os resultados obtidos neste estudo percebe-se que as populações de camarão marinho cultivados no Ceará ainda guardam grande variabilidade genética e os plantéis estudados já acumulam diferenças genéticas, ainda que em pequeno nível.

Abstract

Shrimp is the most important commodity, by value, in the international seafood trade, while new techniques and technologies are needed to keep the shrimp farming and industry growing exponentially and with sustainability in Brazil. Shrimp farmers and aquaculture scientists will demand knowledge gathered from genetic improvement programs through husbandry and/or disease management to reduce the loss of genetic diversity in successive generations. A currently popular type of molecular marker approach to evaluate genetic variability (both in wild and farmed populations) is microsatellites. They can be assayed more rapidly than other types of molecular markers and their high allelic nature (high polymorphism and co-dominance) means that they confer more information per unit assay than any other marker systems, thus reducing costs. Another type of marker is the sequence analysis of hypervariable segments within the mitochondrial DNA (mtDNA) control region, a set of non-coding A+T rich genes that are useful to evaluate genetic intra-species variation. In this study, microsatellite loci and the mtDNA control region of *Litopenaeus vannamei* were used to estimate the genetic variability of commercial broodstocks. Expected results might help in developing strategies to fully explore the available germplasm. Broodstocks from two laboratories located in the State of Ceará were investigated using 10 microsatellite DNA loci. The genetic diversity between laboratories was indicated by the number of alleles per locus, together with the observed heterozygosity (ranging from 3,0 to 10,5 and from 0,46 - 0,84, respectively). Deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium were found at most loci in both laboratories. Inbreeding levels have shown positive F_{is} values, exception made to the locus 1003 that had negative values for both laboratories. F_{st} values were not significantly different between the two laboratories. Analyses of multiple sequence alignment of the mtDNA control region showed high homology. Using Kimura's two-parameter (K2P) model, a dendrogram was generated with our sequences (those obtained in this study) and wild populations' sequences available at GenBank®/NCBI. The resulting dendrogram confirmed a good variability index in the mtDNA control region, without evidences of population differentiation among them. Accordingly, analyses of our data do indicate that cultured shrimp populations in Ceará still keep some level of genetic variability, with studied broodstocks seeming to have accumulated genetic differences.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	22
Figura 2	Anatomia externa do camarão marinho	25
Figura 3	Principais órgãos internos do camarão marinho	26
Figura 4	Ciclo de vida do camarão marinho	28
Figura 5	Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco TUMXLv5.27	43
Figura 6	Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco TUMXLv8.2	44
Figura 7	Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco TUMXLv5.38	44
Figura 8	Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco TUMXLv8.32	45
Figura 9	Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco Pvan 8.193	45
Figura 10	Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco Pvan 0013	46
Figura 11	Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco Pvan 1758	46
Figura 12	Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco Pvan 1815	47
Figura 13	Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco Pvan 1003	47
Figura 14	Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco TUMXL V8.256	48
Figura 15	Exemplo de Amplicons da Região Controle Mitocondrial de <i>L. vannamei</i> purificados, visualizados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, com marcador 1Kb plus	49

(Invitrogen), em transluminador UV.

- Figura 16** Dendrograma UPGMA construído a partir de distâncias não corrigidas entre seqüências parciais da região controle mitocondrial de *L. vannamei* provenientes de um mesmo plantel 51
- Figura 17** Dendrograma UPGMA construído a partir da matriz de Kimura 2P entre seqüências parciais da região controle mitocondrial de *L. vannamei* provenientes de um mesmo plantel 52
- Figura 18** Dendrograma UPGMA entre as seqüências parciais da região controle mitocondrial de indivíduos criados em cativeiro e indivíduos de população selvagem 53
- Figura 19** Alinhamento da seqüência consenso do grupo de seqüências parciais e região controle mitocondrial de *L.vannamei* completo. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados da carcinicultura brasileira em 2003 e 2004	15
Tabela 2	Produção mundial de camarão cultivado 2003/2005	21
Tabela 3	Classificação de espécies de camarão marinho do gênero <i>Penaeus</i>	23
Tabela 4	Tabela de microssatélites apresentando: repetições, primer <i>forward</i> e <i>reverse</i> , tamanho esperado, temperatura de anelamento	37
Tabela 5	Variabilidade genética da espécie <i>L. vannamei</i> para 10 loci de microssatélites em dois laboratórios de maturação do Estado do Ceará	42
Tabela 6	Valores de p para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os 10 loci nos dois laboratórios analisados	43
Tabela 7	Índices de Fis	48
Tabela 8	Abaixo da diagonal estão os valores da distância genética não corrigida e acima os valores da distância de Kimura 2P	51
Tabela 9	Matriz Kimura 2P entre as seqüências parciais da região controle mitocondrial de indivíduos de cativeiro e de população selvagem	53

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABCC** - Associação Brasileira de Criadores de Camarão
- PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- RNA** - Ácido Ribonucleico
- STR** - Repetições Curtas em *Tandem*
- SSR** - Repetições Simples Curtas
- mtDNA** - DNA mitocondrial
- RFLP** - Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
- EST** - Etiquetas de seqüências expressas
- RAPD** - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
- AFLP** - Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
- SNP** - Polimorfismo de Nucleotídeo Único
- ATP** - Adenosina Tri-fosfato
- rRNA** - RNA ribossômico
- COI** - Citocromo oxidase subunidade I
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- SDS** - Duodecilsulfato de sódio
- TE** - Tampão de eluição
- dNTPs** - Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
- ddNTPs** - Didesoxirribonucleotídeos trifosfatos
- UPGMA** - Método de agrupamento não ponderado com significado aritmético

Sumário

1. Introdução	14
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Revisão Bibliográfica	19
3.1. Carcinicultura: Visão geral	19
3.1.1. Produção e desenvolvimento mundial	20
3.1.2. Produção e desenvolvimento Brasileiro	21
3.2. A Espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	22
3.2.1. Classificação Sistemática	22
3.2.2. Anatomia Externa	25
3.2.3. Anatomia interna	26
3.2.4. Ciclo de vida	28
3.3. Estudos genéticos na carcinicultura	29
3.3.1. Marcadores moleculares	31
3.3.2. DNA mitocondrial	34
4. Materiais e Métodos	36
4.1. Amostragem	36
4.2. Ensaio Laboratoriais	36
4.2.1. Extração de DNA	37
4.2.2. Amplificação dos microssatélites	37
4.2.3. Quantificação de DNA	39
4.2.4. Genotipagem	39
4.2.5. Análises Estatísticas dos genótipos	39
4.2.6. Amplificação da região controle mitocondrial	39
4.2.7. Seqüenciamento	40
4.2.8. Análise estatística das seqüências	41
5. Resultados	42
5.1. Genotipagem de microssatélites	42
5.1.1. Análise de variabilidade genética e Equilíbrio de Hardy-Weinberg	42
5.1.2. Análise de frequência e valores de Fis e Fst	43
5.2. Resultados de seqüenciamento	50
5.2.1. Amplificação e quantificação das amostras da região controle mitocondrial	50
5.2.2. Análise das seqüências da região controle mitocondrial	51
6. Discussão	56
6.1. Análise da variabilidade dos microssatélites	56
6.2. Região controle mitocondrial	58
7. Conclusões	61
8. Referências Bibliográficas	62

1. INTRODUÇÃO

O camarão marinho passou a ser um dos mais importantes recursos pesqueiros utilizado pelo homem, devido principalmente ao aumento de seu consumo como fonte de proteína. Este recurso serve também como fator de subsistência a comunidades ribeirinhas, elevando a sua qualidade de vida e mantendo sua permanência local. O desenvolvimento crescente desta atividade fez com que os países costeiros tivessem maior interesse na pesca e cultivo do camarão marinho, tornando assim a exploração comercial destes estoques bastante intensa (ZANOLO, R. 2006).

A exploração comercial de camarões da família Penaeidae é uma atividade amplamente difundida nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, e atingiu um elevado nível devido ao aumento da demanda nos últimos anos. Com isso teve-se como resultado uma sensível diminuição destes recursos que, juntamente com o aumento da população mundial, passam a representar um grande desafio para a indústria aquícola. Essa indústria já supre em torno de 38% dos pescados em nível mundial e 26% em nível nacional (ZANOLO, R. 2006).

O Brasil detém uma posição de destaque na área de produção de camarão. Isto se dá como reflexo nos investimentos tecnológicos no setor que é estimulado pela grande demanda mundial por frutos do mar. A região nordeste é a área de maior domínio da atividade, devido principalmente ao clima propício ao cultivo, sendo a espécie mais cultivada o camarão branco *Litopenaeus vannamei* (BONNE, 1931), o qual é uma espécie exótica encontrada ao longo da costa oeste do oceano Pacífico ocorrendo desde o México até o Peru (PEREZ-FARFANTE e KESLEY 1997), na última década seu cultivo se proliferou no país.

O camarão branco foi introduzido no Brasil nos anos 80, onde os reprodutores eram obtidos através de exportação dos seus locais de origem, mas devido a problemas com a introdução de patógenos externos que podem causar danos irreversíveis e catastróficos a carcinicultura brasileira, tornou-se proibida a importação de mais espécimes de reprodutores no país. Desde

então, a continuidade dos estoques foi assegurada pelo cruzamento de indivíduos de um mesmo plantel, repassando para a geração subsequente. Este peneídeo está entre as cinco espécies de camarão marinho mais cultivadas no mundo juntamente com *Penaeus monodon*, *Penaeus chinensis*, *Penaeus stylirostris*, *Penaeus japonicus* (BENZIE, 2000).

O censo de 2004 da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) relata a existência de 997 fazendas de cultivo de camarão marinho no Brasil, sendo 88,6% destas localizadas no nordeste brasileiro, que é responsável por 93,1% da produção do país (ROCHA *et al.* 2004). Segundo este censo, o estado do Ceará está em 2º lugar no perfil da carcinicultura brasileira em 2004, com uma produção equivalente a 25,6% (19.405 ton.), ficando atrás apenas do Rio Grande do Norte que tem uma produção de 40,6% (30.807ton.). A produtividade do estado tem se mantido em torno de 5.000 kg/ha/ano (ROCHA *et al.* 2004). Ainda pelo censo de 2004 da ABCC, pode-se observar que mesmo com um aumento no número de produtores e de áreas utilizadas, foi registrada uma queda, na produção, se comparado ao ano de 2003, de 25.915 para 19.405 toneladas (Tab. 1). Essa queda ocorreu devido a uma série de eventos associados a variações climáticas, surgimento de doenças, somados às flutuações da economia internacional, causando um impacto na atividade no País.

Estado	Censo 2003			Censo 2004		
	Nº	Area	Prod.	Nº	Area	Prod.
RN	362	5.402	37.473	381	6.281	30.807
BA	42	1.737	8.211	51	1.850	7.577
CE	185	3.376	25.915	191	3.804	19.405
PE	79	1.131	5.831	98	1.108	4.531
PI	16	688	3.309	16	751	2.541
PA	6	159	324	5	38	242
SE	54	398	957	69	514	2.543
AL	2	15	130	2	16	102
PB	66	591	3.323	68	630	2.963
SC	62	865	3.251	95	1.361	4.267
MA	19	306	703	7	85	226
PR	1	49	390	1	49	310
ES	10	103	370	12	103	370
RS	1	4	3	1	8	20
TOTAL	905	14.824	90.190	997	16.598	75.904

Tabela 1: Dados da carcinicultura brasileira em 2003 e 2004, Fonte ABCC

Estes eventos, assim como as oscilações sofridas pela produção nacional, reforçam a noção de que para atingir os ideais de produtividade e sustentabilidade é necessário incentivo e investimento em contínua pesquisa científica, de forma a criar uma base tecnológica consistente que venha a auxiliar a atividade para seu desenvolvimento. Esse desenvolvimento tecnológico global ocorre com avanços na área de genética, alimentação, reprodução, doença e manejo operacional (MARTINS, 2006).

A variabilidade genética constitui a base de todo programa de melhoramento genético. Estudos preliminares em estoques comerciais de peneídeos têm demonstrado a presença de erosão genética em algumas gerações de cultivo (FREITAS e GALLETI J.R., 2002). A carcinicultura brasileira já sofre com a perda de desempenho advinda dessa erosão, refletida, por exemplo, na redução da taxa de crescimento do camarão cultivado (Freitas 2003). As técnicas moleculares têm sido utilizadas como ferramentas auxiliares para o estudo da genética de populações destes estoques. A utilização destas técnicas tem como vantagens, além do monitoramento da variabilidade genética, a caracterização de linhagens, o diagnóstico e controle de doenças, o estudo de distâncias genéticas e o melhor aproveitamento de programas de melhoramento genético.

A variabilidade genética de populações cultivadas é menor que as encontradas em populações selvagens, sendo que essa diminuição depende diretamente dos procedimentos de manejo (BENZIE, 2000). O manejo e conservação dos recursos explorados devem incluir também aspectos de definição genética destes estoques para assegurar a sua sustentabilidade (VALLES-JIMENEZ, 2005). O monitoramento regular do nível de variabilidade genética dos estoques é essencial para orientação adequada do manejo aplicado que se faz necessário também para a obtenção do controle da saúde do animal.

O desenvolvimento da tecnologia de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polimerase Chain Reaction*) aumentou a eficiência na detecção de polimorfismos no nível de DNA e RNA (MATIOLI e PASSOS-BUENO, 2004). Esta técnica, a qual é a base de várias aplicações em biologia molecular, tem sido amplamente aplicada na identificação de marcadores de DNA úteis na

aqüicultura, permitindo desde a estimativa do grau de variabilidade genética de uma dada população à construção de árvores filogenéticas, dendrogramas, relacionando espécies próximas e elucidando questões de parentesco. Como ferramenta essencial em programas de melhoramento genético, o monitoramento da variabilidade ao longo das gerações através de marcadores moleculares é indicado para revelar mudanças de variabilidade causada por deriva genética, endogamia, ou seleção (ALLENDORF e RYMAN 1987).

Nos dias de hoje a classe de marcadores moleculares mais amplamente utilizados para avaliar e monitorar a variabilidade genética, tanto em populações naturais como em espécies domesticadas, são as regiões hipervariáveis conhecidas como microssatélites. Microssatélites, STR (*Short Tandem Repeats*) ou SSR (*Short Simple Repeats*) os quais fazem parte do DNA nuclear e são regiões altamente repetitivas de seqüências curtas de 1 a 6 nucleotídeos (LEWIN, 2000). Uma outra classe de marcadores utilizada amplamente no estudo de invertebrados marinhos é o conjunto de genes do DNA mitocondrial o qual além destes genes, possui uma região rica em A+T, a região controle, não codificadora, que está relacionada com o início da replicação do mtDNA (LEWIN, 2000).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estimar a variabilidade genética de dois plantéis de camarões *L. vannamei* cultivados no estado do Ceará, através da genotipagem de locos de microssatélites e do sequenciamento da região controle mitocondrial.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Otimizar a amplificação de 10 locos de microssatélites de *L. vannamei*;
- b) Genotipar 50 indivíduos de ambos os sexos, para cada um dos 10 microssatélites, em dois laboratórios de maturação do estado do Ceará;
- c) Amplificar e seqüenciar a região controle mitocondrial dos indivíduos de um dos laboratórios estudados;
- d) Produzir estimativas de variabilidade genética, comparando-a com os resultados publicados para populações naturais, para os mesmos tipos de marcadores.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Carcinicultura: visão geral

A carcinicultura surgiu no sudoeste da Ásia em meados do século XV, onde pescadores artesanais conseguiam as larvas de camarão oriundas do mar, pelo movimento de maré através do uso de cativeiros operacionais (ARANA, 1999). Apenas em 1930 foram realizados os primeiros experimentos com desova do camarão *Marsupenaeus japonicus* em laboratório. Por volta da década de 70, alguns países iniciaram o cultivo de camarão em escala comercial (ARANA, 1999).

Devido a crescente demanda do produto no mercado internacional, a boa rentabilidade do agronegócio e a sua capacidade de gerar renda, emprego e divisas, evidencia-se, a partir dos anos 80, um crescimento mundial do cultivo do camarão marinho (ABCC, 2004).

O cultivo de camarão marinho é baseado no ciclo de vida natural do animal e é constituído por três etapas: o laboratório de maturação e larvicultura; a fazenda de crescimento e engorda e o beneficiamento.

Nos laboratórios de maturação e larvicultura os machos e fêmeas são colocados juntos em tanques onde ocorrerá a maturação das gônadas e conseqüente cópula e desova. Com o intuito de acelerar o processo de maturação nas fêmeas faz-se a ablação destas, que consiste na retirada do pedúnculo ocular das fêmeas, onde estão situadas as glândulas produtoras do hormônio inibidor da vitelogênese gonadal, permitindo assim que as fêmeas abladadas entrem em estágio de maturação mais rápido (LAWRENCE, A. L. *et al*, 1985). Após a obtenção dos náuplios (primeira fase do desenvolvimento larval) estes são encaminhados para a larvicultura onde irão passar por volta de 20 dias pelos estágios larvais de zoea, mysis e pós-larva. Durante a fase de larvicultura, as larvas recebem cuidados especiais no tocante à alimentação, controle de temperatura, oxigênio, amônia, nitrito e pH, entre outras, visando à superação dos desafios das diversas metamorfoses que ocorrem nessa fase de cultivo (ROCHA, 2007).

Outro setor é a fazenda de crescimento e engorda que corresponde ao local onde as pós-larvas são encaminhadas para o seu crescimento até

atingirem o tamanho comercial. E, por conseguinte após a despesca os camarões prontos para a comercialização são conduzidos ao centro de processamento e congelamento do produto, onde é preparado para o mercado consumidor (ABCC, 2004).

3.1.1 Produção e desenvolvimento mundial

Os camarões marinhos Peneídeos representam aproximadamente um terço das espécies de grande importância comercial no mundo, simbolizando mais de 80% das capturas (BALDWIN et al., 1998). Segundo Fast e Lester (1992) esses peneídeos fornecem a base para a indústria de cultivo mundial.

O camarão branco do Pacífico *L. vannamei* é uma das principais espécies comercial ao longo da costa do Pacífico dominando a indústria pesqueira e liderando as espécies utilizadas na aquicultura em todo o hemisfério ocidental, (CRUZ, 2002). O cultivo desta espécie vem se difundindo em todo o mundo em regiões costeiras e águas oligoalinas, inclusive nos países do sudeste asiático (PRESTON e CLIFORD III, 2002) sendo que esse grande advento da atividade no mundo pode causar sérios riscos a sua sustentabilidade.

O cultivo de camarão marinho é o setor na produção pesqueira que mais se destaca em âmbito global, alcançando em 2005 uma produção mundial superior a 2 milhões de ton/ano (FAO, 2007). Do ponto de vista sócio econômico a carcinicultura se constitui como uma alternativa de maior viabilidade para o estabelecimento de uma ordem econômica no setor primário, onde a qualificação prévia de mão-de-obra não representa um impedimento para a implantação dos seus empreendimentos (ROCHA, 2007).

A produção desse setor cresceu de 917.273 t em 1996 para 2.733.134 t em 2005, correspondendo a um incremento médio de 13,38% ao ano e representando 45% da produção mundial de camarão. Os países em desenvolvimento do continente asiático vêm liderando o grupo dos principais produtores, respondendo em 2005 por 86% da produção mundial enquanto a América latina respondia pelos 26% restantes (FAO, 2007).

No final do ano de 2003 o Brasil estava liderando o hemisfério ocidental superando o Equador e México que tradicionalmente ocupavam o primeiro e

segundo lugar respectivamente (Tab. 2). Contudo devido a uma série de eventos associados a variações climáticas, surgimento de doenças, somados às flutuações da economia internacional, resultou na redução da produção a partir de 2004 (Tab 2).

Tabela 2: Produção mundial de camarão cultivado 2003/2005 segundo Rocha, 2007.

Principais Países Produtores	2003			2005			Cresc. da Produção (%)
	Produção (T)	Área em Produção (há)	Produtividade (kg/ha/ano)	Produção (T)	Área em Produção (há)	Produtividade (kg/ha/ano)	
China	789.373	257.200	3.069	1.024.949	300.000	3.416	29,84%
Tailândia	330.725	64.000	5.168	375.320	64.000	5.864	13,48%
Vietnã	231.717	500.000	463	327.200	722.000	453	41,21%
Indonésia	191.148	480.000	398	279.539	395.000	708	46,24%
Índia	113.240	195.000	581	130.805	170.000	769	15,51%
Equador	82.133	130.900	627	130.000	150.000	867	58,28%
México	45.857	37.469	1.224	72.279	43.000	1.681	57,62%
Brasil	90190	14.824	6.084	65.000	15.000	4.333	-27,93%
Bangladesh	56.503	145.000	390	63.052	145.000	435	11,59%
Filipinas	37.033	30.000	1.234	39.909	30.000	1.330	7,77%
América Central*	51.484	35.000	1.471	41.919	40.000	1.048	-18,58%
Outros	132.770	118.866	1.117	183.162	161.900	1.131	37,95%
Total	2.152.173	2.008.259	1.072	2.733.134	2.235.900	1.222	29,99%

Dentre os países que se destacam na importação de crustáceos os EUA, União Européia e Japão lideram o grupo dos países que mais importam camarão respondendo juntos por 79% das importações, gerando bons resultados para ambos os lados tanto para os países produtores como para os importadores (FAO 2007).

3.1.2 Produção e desenvolvimento Brasileiro

A carcinicultura brasileira teve origem no início da década de 70 com o cultivo da espécie nativa *Farfantepenaeus brasiliensis* e da espécie exótica *Marsupenaeus japonicus*. A introdução da espécie exótica *Litopenaeus vannamei*, na década de 80 resultou em um aumento considerável na indústria camaroneira, proporcionando modernização da atividade através do surgimento de laboratórios de produção de pós-larvas e introdução de novas técnicas de manutenção e manejo (WAINBERG e CÂMARA, 1998).

Apenas a partir de 1995, a espécie *L. vannamei*, começou a ser produzida comercialmente nos laboratórios das pós-larvas. A partir deste momento a atividade tomou um novo impulso, passando a crescer a taxas superiores a 60% ao ano, até 2003, quando a produção atingiu a marca de

90.190 t, com exportações de 58.455 t e US\$ 226,0 milhões. A partir de 2004, esse setor, cuja base comercial era o mercado internacional, perdeu competitividade nas exportações, tendo como resultado uma redução significativa na produção e naturalmente, de forma mais expressiva, nas exportações (ROCHA, 2007).

Desde seu início o desenvolvimento da carcinicultura brasileira vem se fundamentando em tecnologias importadas e aprimoradas, que vêm passando por avanços na área da genética, alimentação, reprodução, doenças e no aprimoramento do sistema de manejo operacional procurando sempre uma intensa experimentação e validação tecnológica no contexto da realidade vivenciado no Brasil (MARTINS, 2006), cujos procedimentos estão amplamente referenciados no acervo tecnológico elaborado e organizados pela ABCC, nas suas diversas publicações, envolvendo todos os elos da cadeia produtiva.

3.2 A Espécie *Litopenaeus vannamei*

3.2.1 Classificação Sistemática

Os camarões Peneídeos são animais pertencentes ao reino Animalia, classificados no filo Arthropoda, possuindo a seguinte classificação taxonômica:

Subfilo: Crustacea

Classe: Malacostraca

Ordem: Decapoda

Subordem: Dendrobranchiata

Superfamília: Penaeoidea

Família: Penaeidae

Gênero: *Litopenaeus*

Espécie: *Litopenaeus vannamei*



Fig. 1 *Litopenaeus vannamei*

Até 1997 na família dos peneídeos existiam cerca de 12 gêneros reconhecidos, entre eles o gênero *Penaeus*, possuindo em torno de 27 espécies, o qual foi dividido em subgêneros baseados em características morfológicas comuns (FLEGEL, 2007). Em 1997, com base em características morfológicas e biogeográficas Pérez-Farfante e Kensley (1997) publicaram um estudo onde subdividiram o gênero *Penaeus*, elevando seus subgêneros a categoria gênero (Tabela 3).

Tabela 3: classificação de espécies de camarão marinho do Gênero *Penaeus*, segundo revisão de Perez-Farfante e Kensley, 1997 (Freitas, 2003).

Gênero <i>Penaeus</i>		Novos Gêneros
<i>P. setiferus</i>	Linnaeus, 1761	<i>Litopenaeus setiferus</i>
<i>P. schmitti</i>	Burkenroad, 1934	<i>Litopenaeus schmitti</i>
<i>P. vannamei</i>	Boone, 1931	<i>Litopenaeus vannamei</i>
<i>P. stylirostris</i>	Stimpson, 1871	<i>Litopenaeus stylirostris</i>
<i>P. occidentalis</i>	Streets, 1871	<i>Litopenaeus occidentalis</i>
<i>P. monodon</i>	Fabricius, 1798	-
<i>P. semisulcatus</i>	Haan, 1844	-
<i>P. esculentus</i>	Haswell, 1879	-
<i>P. orientalis</i>	Kishinouye, 1896	-
<i>P. indicus</i>	Milne-Edwards, 1837	<i>Fenneropenaeus indicus</i>
<i>P. merguensis</i>	Man, 1888	<i>Farfantepenaeus merguensis</i>
<i>P. penicillatus</i>	Alcock 1905	<i>Farfantepenaeus penicillatus</i>
<i>P. brasiliensis</i>	Latreille, 1817	<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>
<i>P. duorarum</i>	Burkenroad, 1939	<i>Farfantepenaeus duorarum</i>
<i>P. notialis</i>	Perez Farfante, 1967	<i>Farfantepenaeus notialis</i>
<i>P. subtilis</i>	Perez Farfante, 1967	<i>Farfantepenaeus subtilis</i>
<i>P. azectus</i>	Ives, 1891	<i>Farfantepenaeus azectus</i>
<i>P. pauliensis</i>	Perez Farfante, 1967	<i>Farfantepenaeus pauliensis</i>
<i>P. californiensis</i>	Holmes, 1900	<i>Farfantepenaeus californiensis</i>
<i>P. brevirostris</i>	Kingsley, 1878	-
<i>P. kerathurus</i>	Forskal, 1775	-
<i>P. marginatus</i>	Randall, 1840	-
<i>P. longistylus</i>	Kubo, 1943	-
<i>P. canaliculatus</i>	Oliver, 1811	-
<i>P. plebejus</i>	Hess, 1865	-
<i>P. japonicus</i>	Bate, 1888	<i>Marsupenaeus japonicus</i>
<i>P. latissulcatus</i>	Kishinouye, 1896	-
<i>P. chinensis</i>	Osbeck, 1765	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>

No início, houve certo questionamento em relação à veracidade dessa nova nomenclatura apresentada por Perez-Farfante e Kesley. Com o advento da biologia molecular no auxílio às relações taxonômicas, pôde-se realizar estudos que discutissem esses fatos, empregando-se o mtDNA para comprovar a existência de uma nova espécie, previamente chamada de *F. subtilis*, na costa litorânea de Fortaleza a Cabo Frio (MAGGIONI *et al*, 2001).

3.2.2 Anatomia Externa

Os Artrópodes constituem o filo mais abundante e diversificado do mundo, capaz de habitar todos os locais possíveis, aptos ao mínimo de sobrevivência (HICKMAN, 2001). Essa boa adaptação pode ser explicada pela existência de um exoesqueleto cuticular, composto por substâncias calcárias, que o tornam rígido, e a quitina, cuja função é impedir que o animal perca água, o que poderia desidratá-lo (RUPPERT e BARNES, 1996).

Os crustáceos possuem cerca de 300.000 espécies descritas, a maior parte habita os oceanos, lagos e rios, dentre elas os camarões. O camarão marinho caracteriza-se por possuir o corpo dividido em duas regiões distintas denominadas cefalotórax e abdômen (BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2001). O cefalotórax resulta da fusão de alguns segmentos torácicos à cabeça. É recoberto pelo prolongamento do exoesqueleto, a carapaça, cuja extremidade é chamada rostro. Nesta região se encontram olhos pedunculados e apêndices profundamente modificados. Os dois primeiros pares de apêndices são antenas (um par de antênulas e um par de antenas) situadas numa posição pré-oral responsáveis basicamente pela função sensorial. Os três últimos pares de apêndices localizam-se atrás da boca (um par de mandíbulas e dois pares de maxilas) úteis na alimentação do animal. A mandíbula possui bordas capazes de moer e cortar os alimentos, enquanto que as maxilas ajudam as mandíbulas na manipulação do alimento. No tórax se encontram cinco pares de patas conhecidas por pereiópodes (apêndices ambulatórios) que desempenham a função de locomoção. Os apêndices que se localizam no tórax servem para o nado, a cópula (nos machos) ou ainda o transporte de óvulos (nas fêmeas). Os pleiópodos localizados na região abdominal realizam a função de nadar e no final da região encontramos o Telson caracterizado por um leque caudal com o último segmento abdominal e seus urópodes responsáveis por direcionar o animal durante a natação (BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2001).

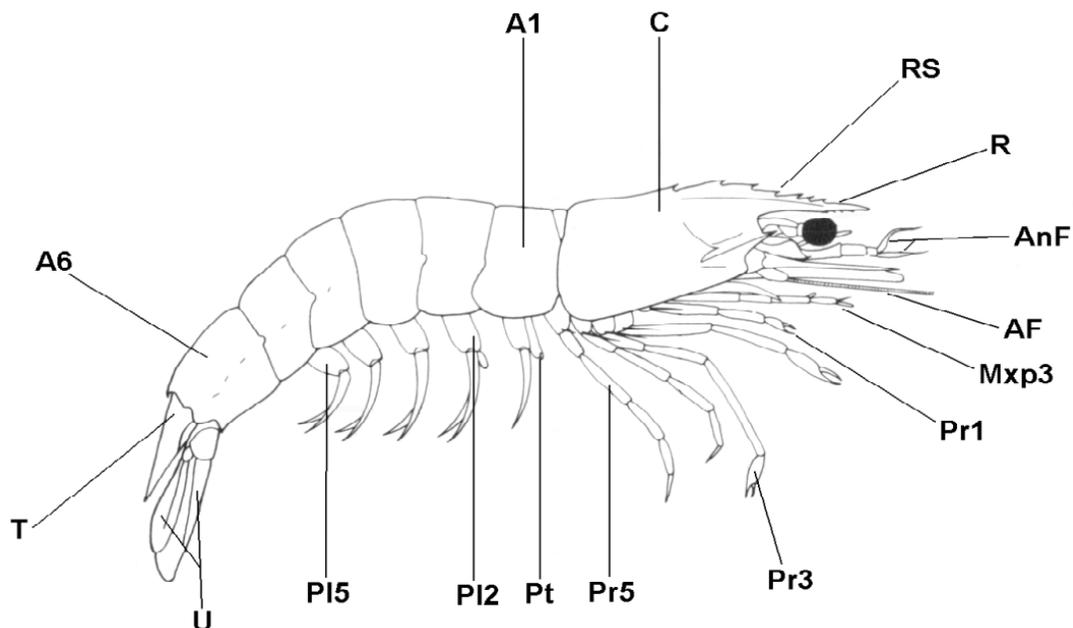


Fig. 2 Anatomia externa do camarão marinho: A1, A6 - somitos abdominais; C - carapaça; R - rostro; RS - espinha rostral; AnF e AF - antena flagelar; Mxp3 - maxilípede 3; Pr1, Pr3, Pr5 - pereiópodos 1, 3, 5; Pt - petasma; Pl2, Pl5 - pleópodos 2 e 5; U - úropode; T - telson. (Fonte Dall et al, 1990).

3.2.3 Anatomia interna

Os artrópodes possuem órgãos excretores pareados e compostos de um saco terminal, um canal excretor e um duto de saída, todos localizados na cabeça sendo chamados de glândulas antenais ou maxilares, pois os poros excretores encontram-se na base das antenas ou das maxilas. As brânquias excretam amônia e são os órgãos responsáveis pelo equilíbrio salino (RUPPERT e BARNES, 1996).

O estômago possui muitos músculos permitindo que só seja repassado ao hepatopâncreas o que está totalmente liquefeito. O hepatopâncreas é uma glândula de suma importância assumindo um papel no metabolismo destes animais interagindo com os processos fisiológicos de muda, produzindo respostas rápidas a alterações induzidas por fatores endógenos e ambientais. É responsável pelo armazenamento de substâncias de reservas e produz

enzimas digestivas (RUPPERT e BARNES, 1996). O sistema circulatório é aberto, possuindo hemolinfa (sangue) onde circulam os hemócitos. Os hemócitos são produzidos pelo tecido hematopoiético localizado próximo ao estômago. A hemolinfa passa por todo o corpo retornando sempre para o coração, principal órgão propulsor, pequeno e constituído por três partes de óstio. O órgão linfóide é o órgão responsável pela defesa se tornando hipertrofiado em algumas enfermidades. O sistema nervoso dos camarões marinhos é bem rudimentar tendo o cordão nervoso indo para todos os segmentos (RUPPERT e BARNES, 1996).

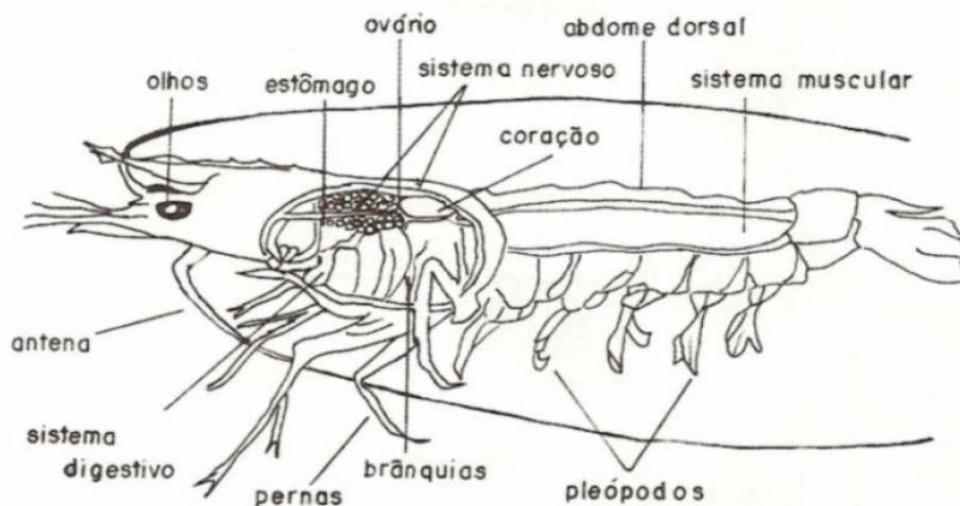


Fig. 3 Principais órgãos internos do camarão marinho segundo Andreatta e Beltrame (2004).

A espécie exótica *L. vannamei*, apesar de sua distribuição ser restrita ao oceano Pacífico ocorrendo desde o nordeste do México até o nordeste do Peru (PEREZ-FARFANTE e KENSLEY, 1997) e não ocorrer na costa brasileira é atualmente a principal espécie cultivada em toda a América Latina, em função de sua boa adaptação às condições de cultivo em baixa salinidade e elevados índices zootécnicos como elevadas taxas de crescimento e conversão alimentar (WAINBERG e CÂMARA, 1998). O *L. vannamei* já nasce com uma tolerância à salinidade da água. Esta espécie é reconhecida como potente osmoreguladora. Apesar de alguns camarões peneídeos serem classificados

como estenohalinos, suportando apenas uma estreita faixa de variação na salinidade, outras espécies como o *L. vannamei* e o *Penaeus monodon* são consideradas eurihalinas, tolerando rápidas e amplas flutuações na salinidade de até 10 ppm (partes por mil). A tolerância a uma extensa faixa de salinidade foi uma característica adquirida ao longo do processo evolutivo (NUNES, 2001). A ótima salinidade para o cultivo de determinada espécie de camarão é aquela que se aproxima do seu ponto isosmótico, devido à diminuição do gasto energético durante o processo de osmorregulação (MARQUES et al., 1999).

De uma forma geral, os peneídeos são classificados como onívoros. No entanto, verifica-se que em algumas espécies os adultos podem ser também detritívoros e/ou carnívoros. Em aquacultura, nutrientes (proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas, minerais e água) encontrados nas rações para animais, incluindo as dos camarões, são utilizados para a construção, manutenção dos tecidos e o suprimento de energia. De acordo com Cuzon *et al.* (2004), os níveis de proteínas exigidos para o desenvolvimento dos camarões variam em cada fase da vida. Em pós-larvas, esses níveis variam em torno de 30%-35% e em juvenis de 30%. Camarões cultivados em baixa salinidade retiram principalmente do alimento os minerais necessários para a sua osmorregulação

3.2.4 Ciclo de vida

O *L. vannamei* habita lagoas costeiras e mar aberto preferindo locais com águas turvas com profundidades de 70 m. Seu ciclo de vida consiste de uma fase larval planctônica oceânica, uma fase de pós-larva juvenil estuarina com salinidade moderada e fase adulta retornando ao ambiente marinho para maturação e desova (VALLES-JIMENEZ *et al.*, 2005).

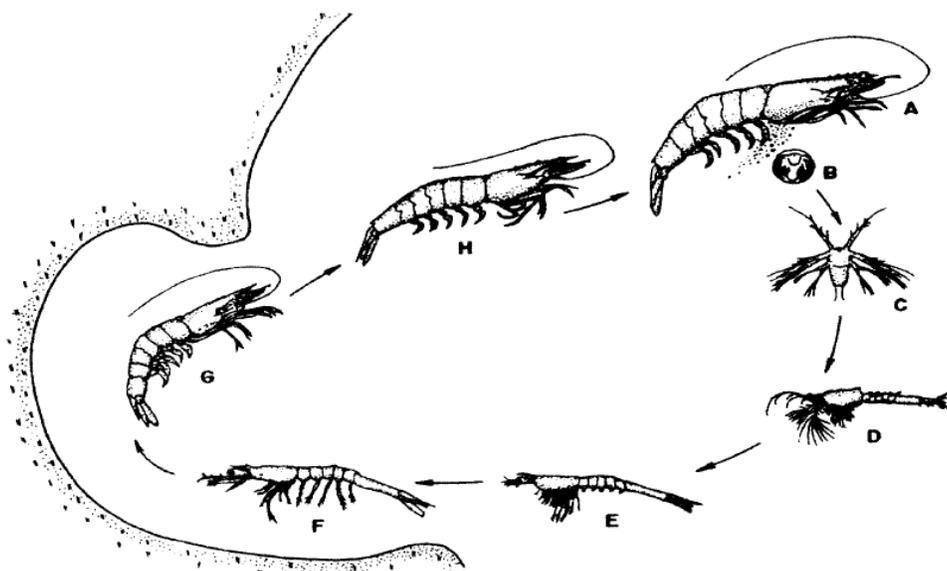


Fig. 4: Ciclo de vida do camarão marinho: A - Reprodutor desovando, B - Ovo, C - Nauplio, D - Zoea, E - Misis, F - Pos-larva, G - juvenil, H - Adulto. Segundo Freitas, 2003.

3.3 Estudos genéticos na carcinicultura

Em sistemas de aqüicultura, algumas práticas de manejo inadequadas prejudicam a manutenção das populações cativas resultando em uma diminuição da variabilidade genética existente naquele plantel, devido à ocorrência de altos níveis de deriva e endogamia (FREITAS e GALETTI, 2002). Devido aos organismos aquáticos possuírem uma alta fecundidade não se faz necessário à utilização de grande quantidade de reprodutores para a formação de plantéis. O cultivo em pequenas populações está sujeito aos efeitos da deriva e do endocruzamento (PEREZ e ROMERO, 1991). Altos níveis de endocruzamento são frequentemente associados ao surgimento de deformidades susceptibilidade a doenças, ou diminuição do tamanho médio dos indivíduos (GARCIA *et al.*, 1996).

Assim é imprescindível o planejamento apropriado dos cruzamentos o que irá diminuir os efeitos da endogamia, permitindo um conhecimento do nível de heterozigiosidade entre e dentro dos estoques, tornando assim a análise genética entre plantéis útil para a preservação dos mesmos (ALLEGRUCCI, *et al.*, 1998).

Contudo já se é observado avanços genéticos na aqüicultura, os quais vieram a auxiliar no desenvolvimento desta área possibilitando uma síntese nas informações de base genética de seus plantéis visando um aumento na produção de camarão (CRUZ, 2004). Com isso a indústria da aqüicultura tem investido em pesquisas que garantam a estabilidade e o crescimento da produção, levando em consideração vários aspectos, como a tecnologia de nutrição, à ecologia dos viveiros e, em especial, o acompanhamento e melhoramento genético dos plantéis.

Para se evitar uma rápida queda na variabilidade genética, recomenda-se levar em consideração alguns aspectos, tais como: formação de plantéis a partir de um estoque fundador de alta variabilidade com pelo menos 50 indivíduos não aparentados em proporção sexual de 1:1 (ALLENDORF e RYMAN 1987).

No Brasil devido à utilização de uma espécie exótica no cultivo, tornando assim os estoques mais propícios a uma baixa variabilidade genética, é de suma importância pesquisas relacionadas a programas de melhoramento. Em programas de melhoramento a caracterização da variabilidade genética é essencial. O intuito principal destes vem sendo conseguir uma diminuição da dependência dos estoques selvagens, uma maior resistência a doenças, e aumento da produtividade contribuindo assim com a sustentabilidade da atividade (LIU e CORDES 2004).

3.3.1 Marcadores moleculares

O uso da genética e biotecnologia na aquicultura tem se revelado como um grande potencial para a aquisição de informações aos carcinicultores, da situação real dos seus estoques. Técnicas de melhoramento genético tem tido um grande potencial de aplicação utilizando-se de métodos de criação que venham a promover melhorias na atividade de cultivo tais como: seleção de linhagens, produção de indivíduos híbridos, transgenia (HULATA, 2001). O advento da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) nos anos 80 assim como técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA proporcionou um apurado avanço na biologia molecular no que diz respeito a diversos processos biológicos, que levaram ao desenvolvimento de técnicas mais eficazes e atuantes sobre estrutura genética populacional e melhoramento genético de espécies (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Todas essas ferramentas fornecem base para uma descrição detalhada do genoma dos camarões peneídeos.

Uma das grandes contribuições destes avanços é a identificação de marcadores moleculares, os quais são todos e quaisquer fenótipos moleculares decorrente de regiões do genoma expressa, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, correspondendo a regiões expressas ou não do genoma. A utilização destes marcadores tem auxiliado em estudos de diversidade genética em diferentes espécies de interesse econômico, assim como no diagnóstico e controle de doenças em grupos de organismos cultivados (ARGUE e ALCIVAR-WARREN, 1999, WOLFUS 19997, CRUZ, 2004). Em Programas de monitoramento de variação genética, os marcadores moleculares têm revelado, através das gerações, mudanças na variabilidade causada por deriva genética, endogamia ou seleção (ALLENDORF e RYMAN, 1987).

Estes marcadores podem ser aplicados com diversos fins, como, por exemplo, para estudar a estrutura genética de populações; análise de filogenias; detecção de ligação gênica com caracteres mono e poligênicos; identificação de variedades; avaliação de germoplasma; seleção indireta de características agrônômicas, dentre outros (FERREIRA, 1995).

Segundo O'Brien (1991) os principais tipos de marcadores moleculares empregados em pesquisa genética na aquicultura são classificados em dois tipos: marcadores associados com genes de função conhecidas e os associados com segmentos genômicos desconhecidos. Entre os associados em genes com função conhecida estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Botstein *et al.*, 1980) Aloenzimas, EST (Expressed Sequence Tag). E os associados em segmentos com função desconhecida incluem os marcadores do tipo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams *et al.*, 1990); Microsatélite (LITT & LUTTY, 1989); AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos *et al.*, 1995); e SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Desde 1960, eletroforese de aloenzimas em gel de amido tem sido o método molecular mais comumente empregado na genética da indústria de pesca. (RYMAN e UTER, 1987; HILLIS *et al.*, 1996). Numa abordagem inicial, a grande utilidade destes marcadores como ferramenta para o acompanhamento da produtividade dos estoques de cultivo de camarões peneídeos foi revelada pela associação próxima de um declínio na produtividade de camarões com a redução na variabilidade genética de variação de aloenzimas em fazendas de *P. japonicus* (SBORDONI *et al.*, 1986). As Aloenzimas são variantes alélicas de proteínas produzidas por locus gênico particular, e são consideradas interessantes como marcadores por possuírem polimorfismos e representarem produtos protéicos de genes. Contudo em relação aos camarões Peneídeos, os marcadores moleculares de microsatélites vêm substituindo rapidamente esses marcadores mais antigos, pelo seu grande potencial para estudos populacionais e aplicações em aquicultura (BENZIE, 2000). Tornou-se um dos marcadores moleculares mais utilizados nesta área, demonstrando seu potencial como uma ferramenta de análise genética para o manejo de espécies cultivadas em programas de criação (WOLFUS, 1997).

Os microsatélites estão dispersos homogeneamente no genoma de eucariotos e são marcadores co-dominantes e, de maneira geral, altamente polimórficos e seletivamente neutros (SCHLÖTTERER, 1998). Os microsatélites mais comuns no genoma de eucariotos, à exceção dos mononucleotídeos, são os dinucleotídeos (CA)_n, e sua característica

informacional para o estudo populacional e a identificação individual foi rapidamente reconhecida (WEBER, 1990). Ainda segundo Weber (1990) os marcadores microssatélites podem ser classificados em perfeitos, imperfeitos e complexos de acordo com o tipo de seqüências repetitivas.

Seqüências de microssatélites têm se mostrado eficientes para identificar marcas genéticas no uso de programas de monitoramento genético (FREITAS, 2003). O número de artigos sobre este tema tem crescido rapidamente nos últimos anos e um grande número de microssatélites já foi descrito especificamente para *L. vannamei* (CRUZ *et al.* 2002, MEEHAN *et al.* 2003). Estes marcadores podem servir para acessar a variabilidade genética em populações naturais ou cativas, em estudos de mapeamento genético de múltiplas espécies e identificação e discriminação de genótipos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Valles-Jimenez *et al* (2005) analisaram através de cinco loci de microssatélites a variação genética e estrutura populacional de cinco populações nativas de *L. vannamei* em quatro populações selvagens do leste do Pacífico detectando um alto nível de diversidade genética. Em programas de criação duas gerações de *L. vannamei* cultivadas tiveram sua diversidade genética monitorada por microssatélites onde se observou que estas populações não possuíam uma perda significativa de variabilidade. Entretanto quando comparada com populações selvagens esses dados indicaram uma sensível redução na variabilidade já presente no estoque reprodutor (CRUZ *et al.*, 2004). Além do *L. vannamei* os microssatélites têm sido utilizados com sucesso em estudos genéticos relacionados a outras espécies de peneídeos de importância comercial por todo o mundo, como *Penaeus monodon*, *Marsupenaeus japonicus* (TASSANAKAJON, *et al.*, 1998; MOORE, *et al.*, 1999, MAGALHÃES, *et al.*, 2007).

3.3.2 DNA mitocondrial

Recomenda-se que para análises de genética de populações utilize-se mais de um tipo de marcador molecular com intuito de melhorar o entendimento dos padrões de variação genética e processos evolutivos (VALLES-JIMENEZ, *et al.*, 2006). Uma classe de marcadores amplamente utilizada em estudos genéticos de organismos marinhos, incluindo os crustáceos, é o conjunto de genes do DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA vem sendo utilizado em estudo de populações tanto naturais como cultivadas (CHU *et al.*, 2003, TSOI *et al.*, 2005; FRANCISCO e GALETTI, 2005; McMILLEN-JACKSON e BERT, 2003.).

Nos metazoários, o mtDNA é uma molécula de cadeia dupla, extracromossômica altamente condensado, não apresentando crossing-over, íntrons e nem sistemas de reparo (Borges-Osório, 2001). Este DNA se encontra no interior das mitocôndrias as quais são organelas responsáveis pela respiração celular, possuindo um importante papel no metabolismo. Nela ocorre a fosforilação oxidativa essencial para a produção de ATP assim como outras funções bioquímicas na célula. As mitocôndrias possuem material genético independente do nuclear, devido a isso, acredita-se que essas organelas foram na realidade um organismo bacteriano fagocitado por uma célula eucariota a partir de então vivendo em simbiose com seu hospedeiro. Entretanto sua função se tornou vital para a célula e vice e versa, onde sem a qual há morte celular e morte da própria mitocôndria (LEWIN, 2000).

O genoma mitocondrial se diferencia do nuclear pelo tamanho e distribuição, sendo formado por cerca de 16.000 pares de bases. Contém 37 genes. Destes, 13 são genes que codificam proteínas que auxiliam no metabolismo energético da mitocôndria, sendo 3 da citocromo oxidase COI - III, 7 da NaDH desidrogenase (ND1-6 e ND4L), 2 de síntese de ATP (ATPase 6 e 8), e do complexo do citocromo b (Cyt b), 2 RNAs ribossômicos (RNAr 12S e 16S), 22 RNAs transportador (LEWIN, 2000). Além destes genes, há uma região rica em A+T, a região controle, não codificadora e que está relacionada com o início da replicação do DNAm. Esta região, é altamente variável em relação ao conteúdo de bases e tamanho, ao contrário dos genes que são

conservados como os do rRNA essa região é conhecida como D-Loop nos vertebrados (Displacement Loop) (WOLSTENHOLME, 1992).

A taxa de mutação do mtDNA é quase 20 vezes mais alta do que a do nuclear, provavelmente devido à grande produção de radicais livres de oxigênio (mutagênicos) nas mitocôndrias e a sua limitada capacidade de reparo (LEWIN, 2000). Sua herança materna e ausência de recombinação o tornam um marcador apropriado para o acompanhamento da história evolutiva e para análise de estrutura genética (HARRISON, 1989, MEYER, 1994).

Os Genes mitocondriais 16S rRNA e citocromo oxidase I COI têm sido usados principalmente para estudos filogenéticos a nível de espécie em crustáceos (TONG *et al.*, 2000, HAYE, *et al.*, 2002). Contudo, a utilização destes genes em estudos de população genética é limitada (CHU, *et al.*, 2003). O mtDNA tem sido usado como marcador genético em espécies de camarão principalmente por revelarem um alto grau de variabilidade inter (PALUMBI e BENZIE, 1991) e intra-específica (GARCIA-MACHADO, *et al.* 2001), devido a sua alta taxa de mutação. Estudos recentes têm revelado que a utilização da região controle mitocondrial tem proporcionado maiores sítios de caracteres informativos para diferenciação populacional, quando comparado com os marcadores 16S e COI (CHU, *et al.*, 2003 e TSOI *et al.*, 2005). A taxa de substituição nucleotídica dessa região chega a ser duas a cinco vezes maiores do que a dos genes que codificam proteína (MEYER, 1994).

Apesar da ampla utilização da região controle no estudo de invertebrados (Avisé 1994), somente recentemente sua potencialidade começou a ser explorada para o estudo de populações de camarões peneídeos (CHU, *et al.* 2003). Na costa brasileira, regiões mitocondriais foram usadas na identificação de uma nova espécie de camarão rosa, previamente identificada como *F. subtilis*, a qual ocorre entre Fortaleza e Cabo Frio (GUSMÃO, *et al.* 2000; MAGGIONI, *et al.* 2001). Além disso, genomas mitocondriais completos já foram produzidos para *Penaeus monodon* (WILSON, *et al.* 2000) e *Marsupenaeus japonicus* (YAMAUCHI, *et al.* 2004). A região controle já foi seqüenciada nas espécies *F. notialis* e *F. duorarum* (GARCIA-MACHADO, *et al.*, 1996; GRABOWSKI e STUCK, 1998). Cui *et al* (2007) encontraram uma pequena diferenciação genética em duas populações de *Penaeus chinensis*

uma da costa norte da China e outra da costa oeste da península coreana através da região controle mitocondrial.

4. Materiais e Métodos

4.1 Amostragem

As amostras de reprodutores de *Litopenaeus vannamei* foram coletadas em laboratórios de maturação de duas fazendas localizadas no estado do Ceará nos dias 11 de novembro de 2005 e 12 de setembro de 2006. Em cada laboratório foi realizada a sexagem de 50 animais na proporção sexual de 1:1 (macho e fêmea).

Para resguardar a identidade dos laboratórios comerciais, chamaremos genericamente de laboratório 1 e 2. No laboratório 1, foi identificado à presença de cinco lotes separados por tanques. Cada lote possuindo em torno de sete a oito tanques de maturação, onde o lote mais antigo amostrado tinha em torno de 10 meses de idade. No laboratório 2, observaram-se 16 tanques de maturação, estando os indivíduos em uma proporção de 70 machos e 65 fêmeas. Os reprodutores amostrados foram retirados de seis tanques de maturação capturados aleatoriamente, sendo obedecida apenas a proporção sexual.

Foi removido de cada um dos reprodutores um par de pleópodos, método que permitiu obtenção de uma quantidade razoável de tecido muscular, possibilitando aquisição de material genético suficiente para estudos moleculares, sem comprometer a sanidade do animal. Após essa coleta, os tecidos foram estocados em tubos *ependorf* contendo etanol 95% para a preservação das amostras até o momento da extração, e transportados para o laboratório Núcleo de Genômica e Bioinformática (NUGEN) da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

4.2 Ensaios Laboratoriais

Após chegar ao NUGEN / UECE, as amostras foram acondicionadas em freezer -30 ° C. Antes de se iniciar a extração, as amostras foram lavadas com água ultra-pura e depois foram imersas em Tris-HCl 10% por 10 min para

retirar o excesso de álcool existente na amostra. Após esse procedimento deu-se início a extração de DNA.

4.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de cada espécime seguindo o protocolo padrão de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico, modificado de Sambrook *et al.*, (1989). Foi utilizado de cada pleópodo aproximadamente um fragmento de 1 mg de tecido muscular.

Para cada amostra foram utilizados 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 2M pH 7.5, EDTA 0,5M NaCl 5M 10% SDS) e 10 µL de proteinase K (10 µg/ml) para digestão do tecido. Essas amostras foram maceradas e depois incubadas em banho térmico a 60°C por 3 horas, com agitações leves a cada 30 min. Em seguida, o DNA foi purificado com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado por 5 min e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo, em que se adicionou clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e seguiu para centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido novamente para um microtubo e o DNA total foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado e 50 µL de acetato de amônio 7.5M, e incubado no freezer por 30 min. Para a remoção final do excesso de etanol, o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol a 70% e centrifugado a 10.000 g por 10 min. O DNA foi ressuscitado em 50 µL TE (Tampão de eluição) *Biosolve* 10X concentrado e colocado em banho térmico a 60°C por 10 min para facilitar a ressuspensão, posteriormente as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C. A qualidade e concentração do DNA foram verificadas através da eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador UV.

4.2.2 Amplificação dos microssatélites

A amplificação das regiões de microssatélites foi realizada através de Reação em Cadeia de Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” ou PCR). Foram utilizados primers previamente descritos na literatura a saber: TUMXL V5.27, TUMXL V5.38, TUMXL V8.2, TUMXL V8.32, TUMXL V8.193, TUMXL

V8.256 (MEEHAN, *et al.* 2003); Pvan 1758, Pvan 1815, Pvan 0013, Pvan 1003 (CRUZ *et al.* 2002). Os primers *forward* foram marcados com fluoróforos e produzidos pela Invitrogen (Tab. 4).

Tabela 4: Tabela de microssatélites apresentando: repetições, primer *forward* e *reverse*, tamanho esperado, temperatura de anelamento correspondente a este trabalho. Microssatélites Pvan segundo Cruz *et al.*, (2002) e TUMXLv segundo Meehan *et al.*, (2003).

Locus de Microssatélite	Repetições	Primers Forward e Reverse (5'–3')	Tamanho esperado(pb)	Temperatura de Anelamento*
Pvan 0013	...(TA) ₆ ... (AT) ₄	F: TGCTCTGGTAACGACAAACG R: AGACCTGTGGCGAAGTGC	282-284	50
Pvan 1003	...(GT) ₉ ... (AT) ₂ (GT) ₆	F: ATATTTTCATGCGTTCCGAGG R: GACTATCTCACGCGCCTCTC	145-149	52
Pvan 1758	...(T) ₁₀ (TC) ₇ ... (T) ₄ (TC)	F: TATGCTCGTTCCCTTTGCTT R: TTGAAGGAAAAGTGTGGGG	163-189	52
Pvan 1815	...(T) ₇ (CT) ₂ (CTTT) ₄ ...(CT) ₆	F: GATCATTGCCCCCTTTTT R: ATCTACGGTTTCGAGAGCAGA	126-141	52
Pvan 8.193	...(AT) ₃ ...	F: GATGTACACAACGTACTTCG R: GAGATGATAAGAGAACGAAAG	169	52
TUMXL V8.256	...(AAT) ₄ ...	F: GGACTCACACTTCTGGTTC R: GGCTGCACCTTGTAAGTC	166	52
TUMXLv5.27	...(TC) ₄ ...(CT) ₄ ...(TC) ₃ ...(CT) ₃ ...(TC) ₆ ...	F: CAGACCCTAAAATCTCCGTGC R: TGGAAAGGTCAGAGGTCACG	175	50
TUMXLv5.38	(TC) ₆ ...(CT) ₄ ...(TC) ₂ ...	F: CCTTTATGACTTCCCCCGAC R: CCGTACAGAAACGGAACGTC	215	60
TUMXLv8.2	...(AT) ₃ ...(AT) ₃ ...(AT) ₃ ...(AT) ₃ ...(AT) ₃ ...(AC) ₃ ...(AT) ₃	F: CCTCTGTCCATTTCAGCAG R: GGTGAGATATGATTCGAGTRCGG	244	50
TUMXLv8.32	...(CA) ₃ ...(TA) ₄ ...	F: TTACCGCTAAGAGCGAATG R: TGTCCTTTTCGTACCAGTCAAG	220	50

As reações de PCR foi realizada num termociclador modelo Primus 96 Plus (MWG-Biotech). A otimização para amplificação adequada seguiu as seguintes condições: desnaturação a 94° C por 4 min; 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 min, temperatura de anelamento entre 50° C e 60° C, por 1 min, dependendo do *primer* utilizado, extensão a 72° C por 1 min; extensão final a 72° C por 1h, para padronização da adição de “A” terminal em cada amostra. Ao término da PCR os amplicons foram armazenados a -20° C.

As PCRs foram conduzidas em volume final de 10 µl, contendo 200 µM de cada dNTP, tampão apropriado (Tris-HCl ph 8,4 10 mM, KCl 50 mM,) 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada *primer*, 1 U de Taq Polimerase e de 10 a 50ng de DNA genômico.

Os amplicons foram submetidos à eletroforese em géis de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo e observados em transluminador UV. O registro dos géis foi feito através de fotodocumentação digital pelo software ImageAide v. 3.06 (Synoptics Ltd. Spectronics Corporation), em que foi

possível verificar a qualidade das amplificações obtidas, uma única banda, intensa, bem definida e com tamanho correspondente ao esperado.

4.2.3 Quantificação os amplicons (produtos de PCR)

A etapa de quantificação foi realizada após a amplificação de amplicons, através de eletroforese em gel de agarose 1%, e estimada a partir do programa de quantificação *Image aide* que compara a intensidade e o tamanho da banda do marcador 1Kb plus da Invitrogen com as bandas das amostras. Em seguida, as amostras foram diluídas 15:1 para se obter a concentração adequada para a genotipagem dos amplicons, levando em consideração o tamanho dos fragmentos amplificados, a fim de se obter genótipos mais precisos.

4.2.4 Genotipagem

A reação de genotipagem consistiu da adição de GS350 (marcador fluorescente) à amostra já diluída na concentração ideal e formamida, que desnatura a molécula de DNA auxiliando a sua leitura pelo seqüenciador.

As amostras foram genotipadas por eletroforese multiplex em seqüenciador automático *Applied Biosystems* 3100, do Núcleo de Genômica e Bioinformática da Universidade Estadual do Ceará, utilizando os *softwares* para análise GeneMapper 3.7 e GeneScan 3.7 da *Applied Biosystems* que produzem uma estimativa precisa do tamanho dos alelos identificados.

4.2.5 Análises Estatísticas dos genótipos

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995), em que parâmetros tais como heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), diferenciação genética por locus (F_{st}) e F_{is} . Os alelos efetivos e PICs foram obtidos. A significância do teste de desequilíbrio de ligação foi corrigida pelo método de Bonferroni (RICE, 1989).

4.2.6 Amplificação da região controle mitocondrial

Para a amplificação da região controle mitocondrial desenhou-se os *primers* a partir do Program PRIMER 3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) com a seguinte seqüência CR-f ATGAAAGAAAYAAGCYAGGATAAAACT, CR-rc ATAATCCTTTTTTCAGGCACTTCA. As condições de PCR consistiram dos seguintes passos: desnaturação a 94° C por 4 min; 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento 52° C, por 1 min, e extensão de 72° C por 1 min; extensão final a 72° C por 10 min. Ao término da PCR, os amplicons foram armazenados a -20° C.

As PCRs foram conduzidas em volume de 10 µl, contendo 200 µM de cada dNTP, tampão 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,4, KCl 50 mM,) 1,5 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada primer, 1U de Taq Polimerase e de 10 a 50 µg de DNA genômico. Em seguida, os produtos de amplificação foram submetidos a uma purificação com álcool etílico, seguido de adição de 80 µL de Etanol absoluto em cada poço da placa, seguido de centrifugação a 4°C, 4000 rpm, durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, e então se adicionou 60 µL de Etanol 70% em cada poço. A placa foi submetida a uma centrifugação a 4°C, 4000rpm, durante 10 min. O sobrenadante foi novamente descartado, e deixou-se a placa secando a 40°C no termociclador, durante 10 min. As amostras depois de secas no banho térmico foram ressuspendidas em 10 µL de tampão TE.

Após purificação, os amplicons foram corridos em géis de agarose a 1% contendo brometo de etídeo e observados em transluminador UV. Seguindo-se o procedimento de quantificação pelo programa *Image Aid*.

4.2.7 Seqüenciamento

O DNA quantificado foi preparado para a reação de seqüenciamento, que consiste na utilização de um primer (*Foward* ou *Reverse*), e de terminais fluorescentes ddNTPs (ABI Prism® Big DyeTM terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit Version 3.0, Applied Biosystems), numa reação final de 10 µL, com 25 ciclos que consistiam em desnaturação a 95°C por 20seg, anelamento a 50°C por 10 seg. e extensão a 60°C por 4min, conforme recomendação do fabricante.

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram purificadas com isopropanol/etanol, para retirar os terminais não incorporados, seguindo-se protocolo recomendado pelo fabricante que consiste de: precipitação de cada amostra com 80 µl de etanol a 80%, repouso por 15 min a temperatura ambiente protegido da luz, e centrifugação a 4° C a 4000 rpm por 45 min. e lavagem com etanol 70% com centrifugação a 4° C a 4000 rpm por 15min. Secaram-se as amostras em termociclador a 95°C por 30 seg. Após a purificação as amostras foram, então ressuspendidas em 10 µL de formamida e desnaturadas por um processo que consistiu de 2 min a 95°C no termociclador, depois incubadas em gelo por 1min., promovendo o choque térmico e a completa desnaturação. Em seguida, as amostras foram levadas ao seqüenciador automático de DNA ABI 3100[®] (Applied Biosystems®).

4.2.8 Análise estatística das seqüências

As seqüências com melhor qualidade foram submetidas a um BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (NCBI, 2004) a fim de confirmar a identidade de cada seqüência. O BLASTn (ALSCHUL, *et al*, 1990) é um programa que consiste em um conjunto de algoritmos heurísticos que faz uma busca local, no banco de dados referenciado, de alinhamento de seqüências homólogas que compartilham regiões isoladas de similaridade.

As análises ocorreram através do programa Bioedit v7.0.9 (HALL, 1999) onde cada seqüência foi conferida visualmente concatenando-se as seqüências dos primers *forward* e *reverse* de cada amostra e seu respectivo alinhamento. As amostras estudadas foram comparadas com outros indivíduos de *L. vannamei* de estudos anteriores (VALLES-JIMENEZ, 2006).

5. Resultados

5.1 Genotipagem de microssatélites

5.1.1 Análise de variabilidade genética e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A variabilidade dos dois laboratórios de maturação de *L. vannamei* para os dez loci de microssatélites está apresentada na tabela 5. O número de alelos por locus para todas as populações variou de 3 a 10,5. A heterozigosidade média observada foi de 0,30 a 0,82, e a heterozigosidade esperada variou de 0,46 a 0,84. Dentro da população o número de alelos e o número efetivo de alelos foram de 3 a 12 e 1,65 a 7,29 respectivamente. Neste conjunto de primers podemos dividi-los em dois grupos um com menor número de alelos (TUMXLv 8.2, TUMXLv 8193, TUMXLv 1003) e outro com um maior número de alelos (TUMXLv 5.27, TUMXLv 5.38, TUMXLv 8.32, TUMXLv 8256, Pvan 0013, Pvan1758, Pvan 1815). A maioria dos microssatélites obteve um grande número de alelos. Os loci TUMXLv 8256, Pvan 1815, Pvan 1758, Pvan 0013, TUMXLv 5.38 e TUMXLv5.27, apresentaram maior variabilidade de alelos (Fig. 5-14).

As análises de desequilíbrio de ligação, mesmo quando corrigidas pelo método de Bonferroni não mostraram associação. Assim pode-se concluir que todos os marcadores examinados encontram-se em cromossomos diferentes

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) encontrado para os todos os loci analisados teve resultados acima de 0,30 (Tab. 5).

Os valores de p encontrados para os loci TUMXLv 8.2, TUMXLv 8.32, Pvan 0013, Pvan1758, Pvan 1815, TUMXLv 8256 para o laboratório 1 e os loci TUMXLv 8.32, TUMXLv 8193, Pvan 0013, Pvan1758, TUMXLv 1003, TUMXLv 1003 para o laboratório 2 apresentaram um afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg tendo os valores de p altamente significativos. Enquanto os loci TUMXLv 5.27, TUMXLv 5.38, TUMXLv 8193, TUMXLv 1003, para o laboratório 1 e os loci TUMXLv 5.27, TUMXLv 5.38, TUMXLv 8.2, Pvan 1815 para o laboratório 2 apresentaram valores de p não significativos indicando que eles estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tab.6).

5.1.2 Análise de frequência e valores de Fis e Fst

O tamanho da distribuição de frequência alélica dos 10 loci de microssatélites variou entre os dois laboratórios (Fig.5-14). Sete loci (TUMLv 8256, Pvan 1003, Pvan 1815, Pvan 1758, TUMXLv 8193, TUMXLv 8.32, TUMXLv 8.2) apresentaram o mesmo alelo mais comum nos dois laboratórios. Os loci TUMXLv 8193 e Pvan 1003 apresentaram os mesmos alelos enquanto os outros loci apresentaram alelos únicos para os dois laboratórios.

Os valores de Fis positivos demonstraram uma redução na média de heterozigotos dentro dos laboratórios podendo ser devido à cruzamento entre indivíduos aparentados. Os índices de Fis foram de 0,19921 para o laboratório 1 e 0,15312 para o laboratório 2. O loci Pvan 1003 apresentou-se negativo para os dois laboratórios (Tab. 7).

Os valores de Fst não apresentaram diferença significativa para os 10 microssatélites utilizados para os dois laboratórios. Demonstrando pouca diferença entre as duas populações.

Tabela 5: Variabilidade Genética da espécie *L. vannamei* para 10 loci de microssatélites em dois laboratórios de maturação do estado do Ceará. A indica o número de alelos; Ae número de alelos efetivos; Ho heterozigotidade observada; He heterozigotidade esperada; PIC o conteúdo de informação polimórfica.

	Locus									
	TUMLv5.27	TUMLv 8.2	TUMLv5.38	TUMLv8.32	TUMLv8.193	Pvan0013	Pvan1758	Pvan1815	Pvan1003	TUMLv8.256
	Laboratório 1									
Tamanho da Amostra	44	47	37	38	41	45	48	49	49	50
A	11	4	10	4	3	8	9	11	4	5
Ae	6,64	2,84	5,33	2,58	2,06	4,05	4,67	5,4	1,73	3,03
Ho	0,84	0,38	0,78	0,34	0,41	0,57	0,62	0,65	0,42	0,56
He	0,86	0,65	0,82	0,62	0,52	0,76	0,79	0,82	0,42	0,67
PIC	0,83	0,57	0,78	0,55	0,43	0,72	0,75	0,79	0,38	0,64
	Laboratório 2									
Tamanho da amostra	35	31	45	44	34	44	48	48	46	49
A	10	4	12	7	3	11	10	10	4	7
Ae	5,65	2,36	7,29	2,58	1,65	5,07	7,25	6,3	2,33	2,66
Ho	0,8	0,45	0,8	0,43	0,2	0,54	0,64	0,75	0,93	0,44
He	0,83	0,58	0,87	0,61	0,4	0,81	0,87	0,85	0,57	0,63
PIC	0,8	0,51	0,84	0,54	0,35	0,77	0,84	0,82	0,48	0,59
	Média									
Tamanho da amostra	39,5	24	41	41	37,5	44,5	48	48,5	47,5	49,5
A	10,5	4	11	5,5	3	9,5	9,5	10,5	4	6
Ae	6,14	2,6	6,31	2,58	1,85	4,56	5,96	5,85	2,03	2,84
Ho	0,82	0,41	0,79	0,38	0,3	0,55	0,63	0,7	0,67	0,5
He	0,84	0,61	0,84	0,61	0,46	0,78	0,83	0,83	0,49	0,65
PIC	0,81	0,54	0,81	0,54	0,39	0,74	0,79	0,8	0,43	0,61

Tabela 6: Valores de p para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os 10 loci nos dois laboratórios analisados

Locus	valores de p	
	Laboratório 1	Laboratório 2
TUMLv 5.27	0.3398	0.8279
TUMLv 8.2	0.0017	0.2196
TUMLv 5.38	0.2416	0.0651
TUMLv 8.32	0.0001	0.0135
TUMLv 8.193	0.2030	0.0007
Pvan 0013	0.0000	0.0000
Pvan 1758	0.0150	0.0000
Pvan 1815	0.0205	0.1890
Pvan 1003	0.8708	0.0000
TUMLv 8256	0.0089	0.0000

Histograma de Frequência do locus 5.27

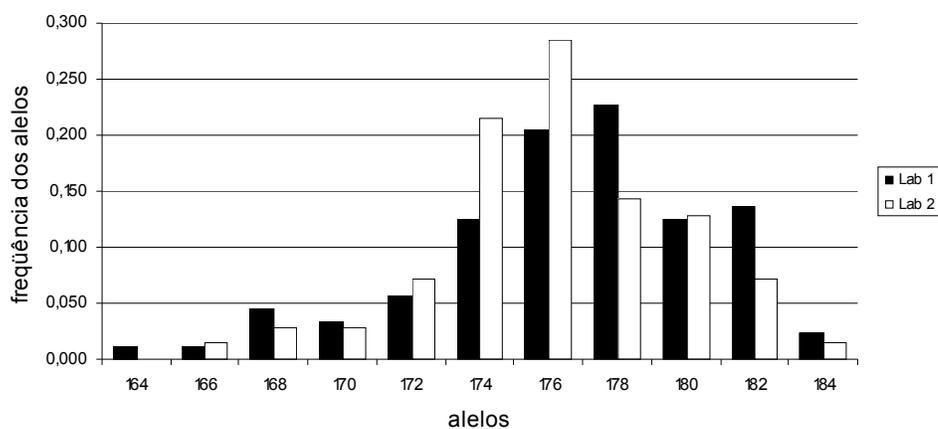


Figura 05. Histograma de frequências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco TUMXLv5.27 (Meehan *et al.*, 2003). Probabilidade de diferenciação pelo teste de Fisher, baseado em cadeia Markov com 1.000 réplicas e 10.000 interações por réplica, não significativo ($P=0,695$).

Histograma de Freqüência do locus 8.2

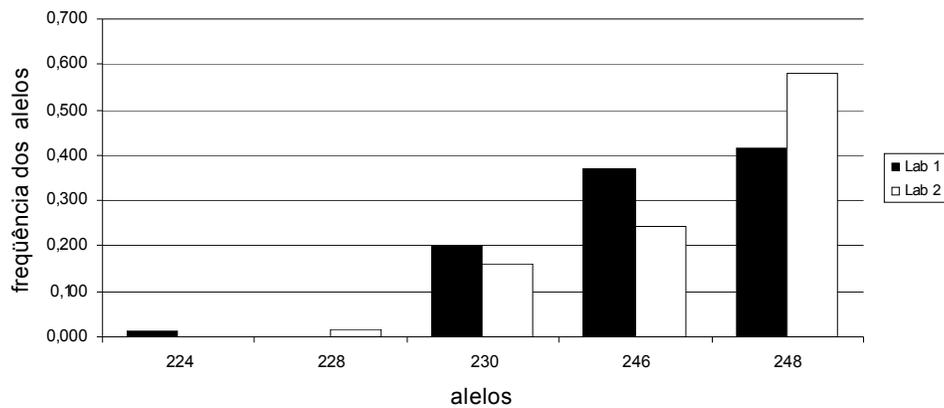


Figura 6. Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco TUMXLv8.2 (Meehan *et al.*, 2003). Probabilidade de diferenciação pelo teste de Fisher, baseado em cadeia Markov com 1.000 réplicas e 10.000 interações por réplica, não significativo ($P=0,101$).

Histograma de Freqüência do locus 5.38

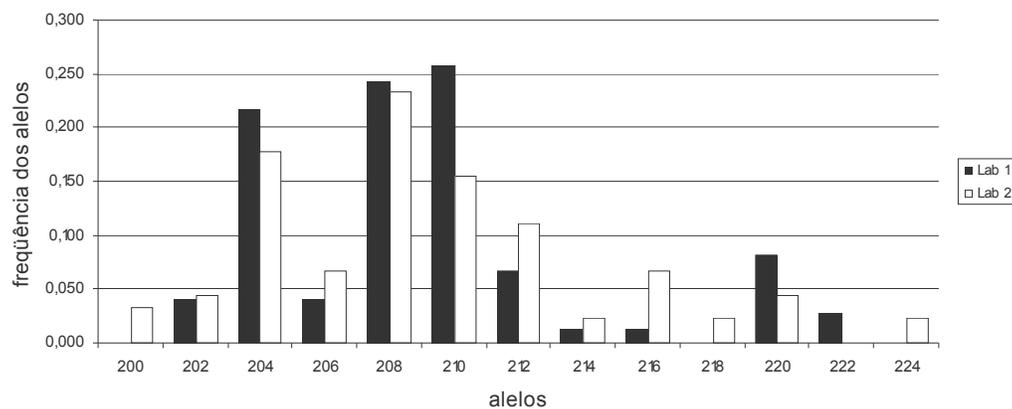


Figura 7. Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco TUMXLv5.38 (Meehan *et al.*, 2003). Probabilidade de diferenciação pelo teste de Fisher, baseado em cadeia Markov com 1.000 réplicas e 10.000 interações por réplica, não significativo ($P=0,241$).

Histograma de Frequência do locus 8.32

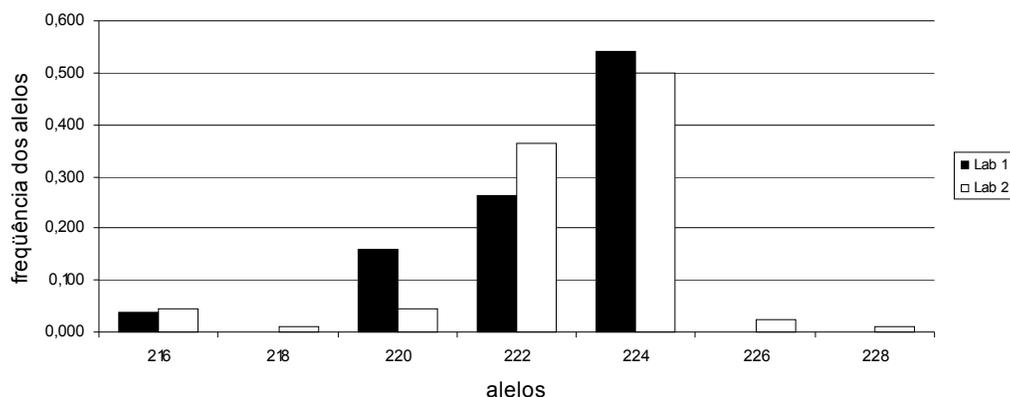


Figura 8. Histograma de frequências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco TUMXLv8.32 (Meehan *et al.*, 2003). Probabilidade de diferenciação pelo teste de Fisher, baseado em cadeia Markov com 1.000 réplicas e 10.000 interações por réplica, não significativo ($P=0,073$).

Histograma de Frequência do locus 8.193

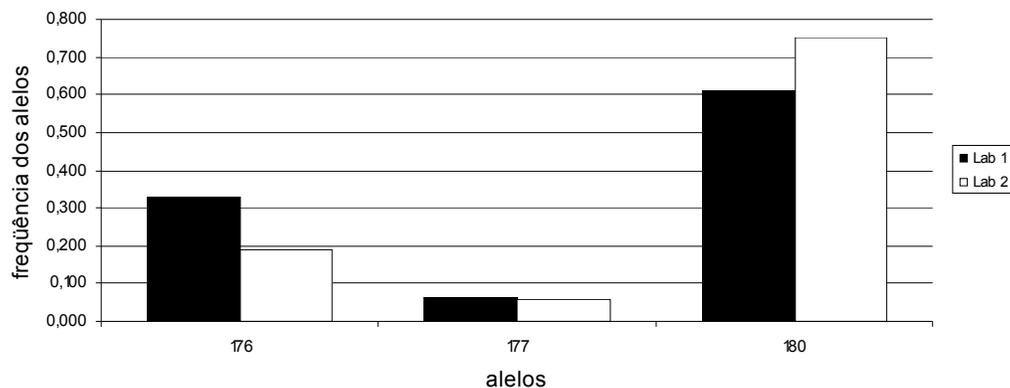


Figura 9. Histograma de frequências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco Pvan 8.193 (Cruz *et al.*, 2002). Probabilidade de diferenciação pelo teste de Fisher, baseado em cadeia Markov com 1.000 réplicas e 10.000 interações por réplica, não significativo ($P=0,163$).

Histograma de Frequência do locus 0013

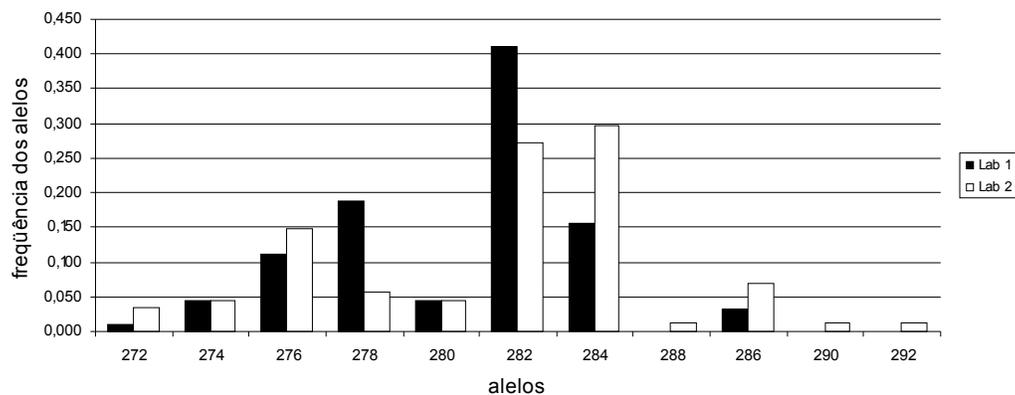


Figura 10. Histograma de frequências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco Pvan 0013 (Cruz *et al.*, 2002). Probabilidade de diferenciação pelo teste de Fisher, baseado em cadeia Markov com 1.000 réplicas e 10.000 interações por réplica, significativo ($P=0,023$).

Histograma de Frequência do locus 1758

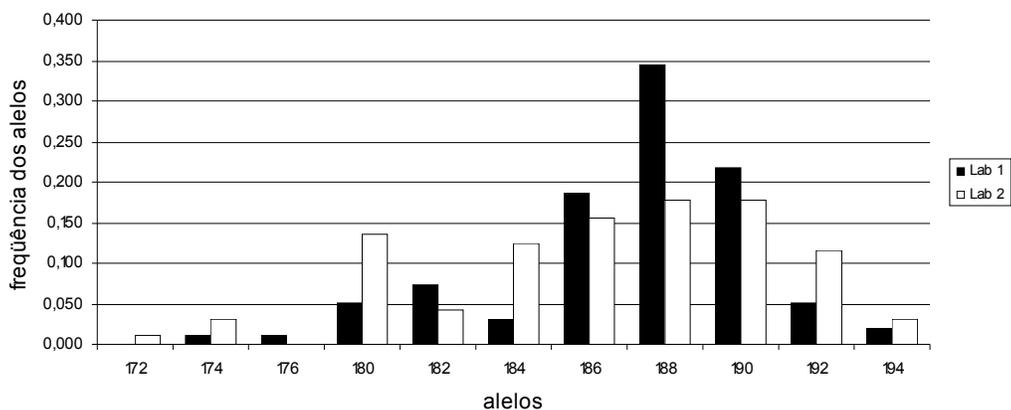


Figura 11. Histograma de frequências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco Pvan 1758 (Cruz *et al.*, 2002). Probabilidade de diferenciação pelo teste de Fisher, baseado em cadeia Markov com 1.000 réplicas e 10.000 interações por réplica, altamente significativa ($P=0,0125$).

Histograma de Frequência do locus 1815

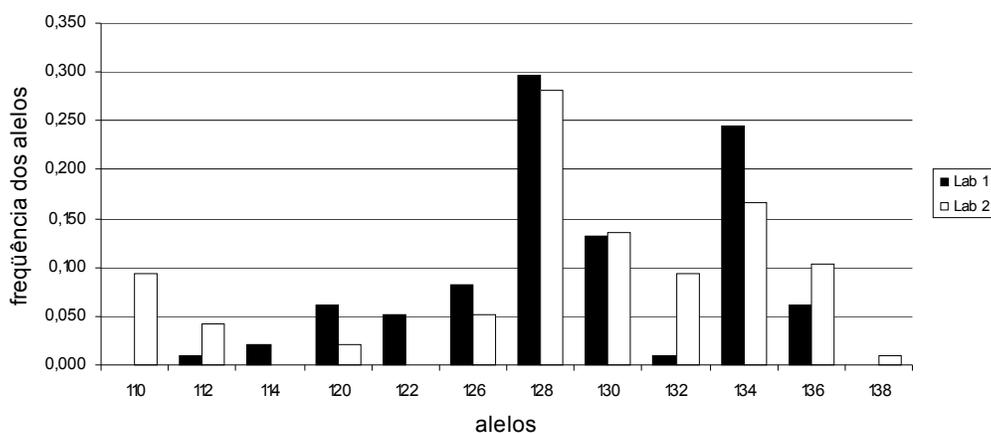


Figura 12. Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco Pvan 1815 (Cruz *et al.*, 2002). Probabilidade de diferenciação pelo teste de Fisher, baseado em cadeia Markov com 1.000 réplicas e 10.000 interações por réplica, altamente significativa ($P < 0,01$).

Histograma de Frequência do locus 1003

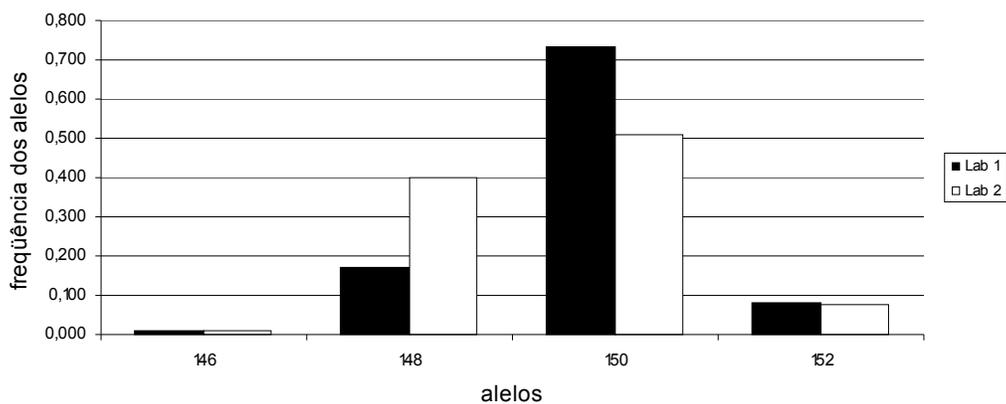


Figura 13. Histograma de freqüências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco Pvan 1003 (Cruz *et al.*, 2002). Probabilidade de diferenciação pelo teste de Fisher, baseado em cadeia Markov com 1.000 réplicas e 10.000 interações por réplica, altamente significativa ($P < 0,01$).

Histograma de Frequência do locus 8256

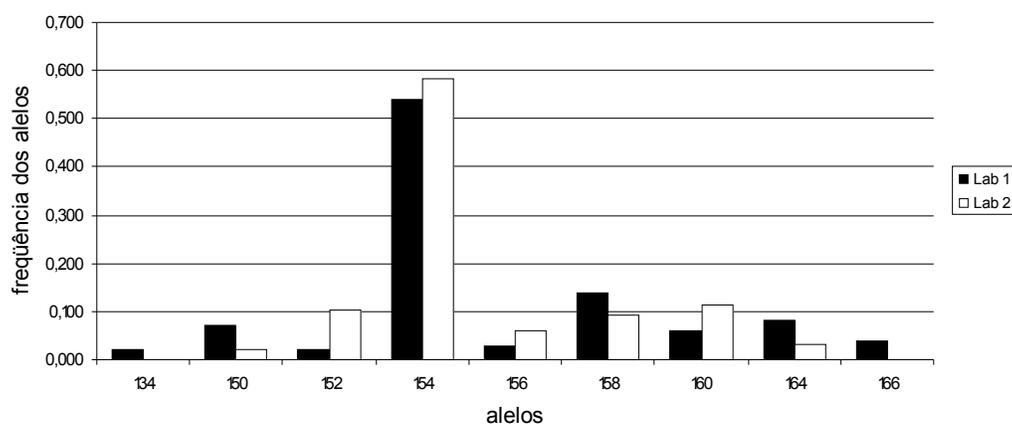


Figura 14. Histograma de frequências alélicas por laboratório de maturação (Lab 1, Lab 2), para o loco TUMXL V8.256 (Meehan *et al.*, 2003). Probabilidade de diferenciação pelo teste de Fisher, baseado em cadeia Markov com 1.000 réplicas e 10.000 interações por réplica, altamente significativa ($P < 0,01$).

Tabela 7: Índices de Fis

Locus	Fis	
	laboratório A	laboratório B
TUMLv 5.27	0,0215	0,0421
TUMLv 8.2	0,4181	0,2343
TUMLv 5.38	0,0492	0,0831
TUMLv 8.32	0,4528	0,3059
TUMLv 8.193	0,2084	0,4934
Pvan 0013	0,2439	0,331
Pvan 1758	0,2154	0,2606
Pvan 1815	0,2101	0,119
Pvan 1003	-0,002	-0,6295
TUMLv 8256	0,1747	0,2913
Total	0,19921	0,15312

5.2 Resultados seqüenciamento

5.2.1 Amplificação e quantificação das amostras da região controle mitocondrial

A amplificação foi feita a partir do DNA genômico total da espécie *L. vannamei* pelo uso da PCR através dos primers F e R, que flanqueiam a região controle mitocondrial.

Ao fim da PCR as amplificações de 30 amostras de cada laboratório, foram purificadas e submetidas a gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo usando como marcador 1Kb plus da Invitrogen, para se visualizar a qualidade do produto adquirido. Os amplicons evidenciaram fragmentos correspondentes a 1,1Kb da região controle mitocondrial (Fig.15).

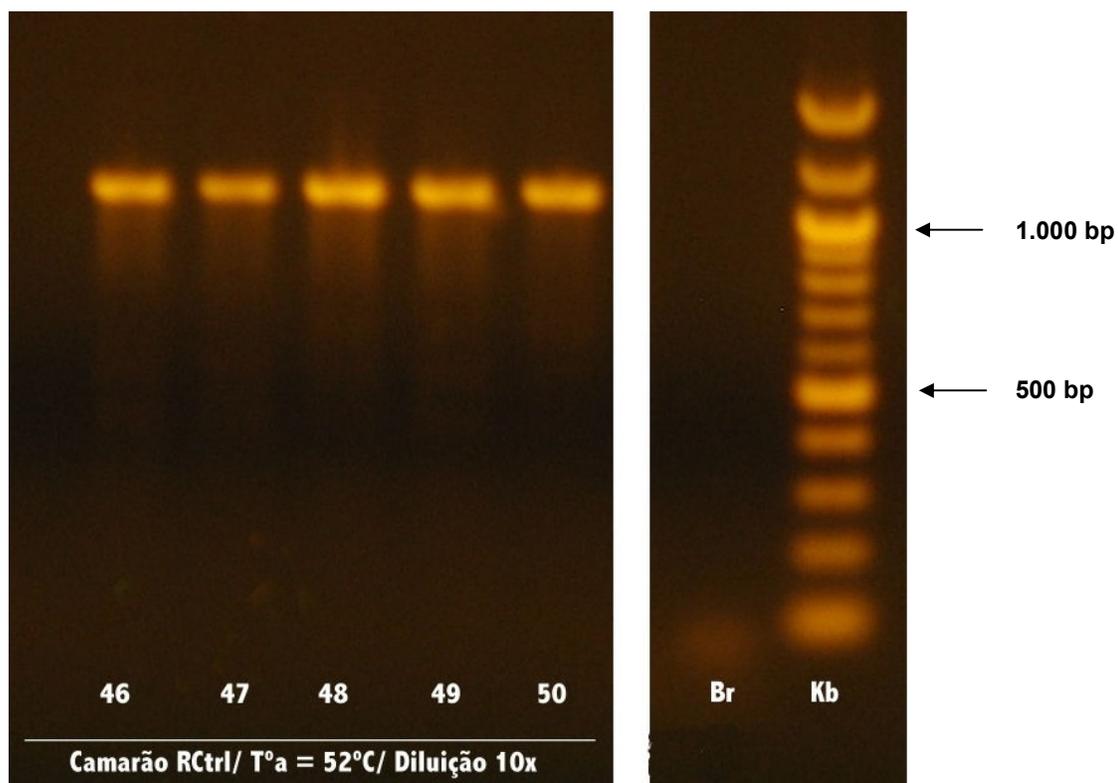


Figura 15: Exemplo de Amplicons da Região Controle Mitocondrial de *L. vannamei* purificados, visualizados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, com marcador 1Kb plus da Invitrogen, em transluminador UV, (46 - 50) = amplicons; Br = controle negativo; Kb = marcador.

Após a purificação, quantificaram-se todos os amplicons de cada laboratório e diluiu-os deixando em torno de 4ng de DNA, com o intuito de se obter melhores seqüências.

5.2.2 Análise das seqüências da região controle mitocondrial

Foram selecionadas 15 amostras com seqüências de qualidade do laboratório 2 nas duas direções, as seqüências para o primer F variaram 373 a 661 sítios nucleotídicos, enquanto as seqüências para o primer R foram de 295 a 606 sítios nucleotídicos.

Através do programa Bioedit, foram obtidos 13 contigs, conseguindo seqüências entre 866 e 904 nucleotídeos, o que corresponde aproximadamente a 90% de toda a região controle de *L. vannamei*. Esses contigs foram submetidos a buscas com a ferramenta Blast, onde conseguiram alta homologia com seqüências previamente publicadas para *L. vannamei* (VALLES-JIMENEZ, 2006; MUHLIA-ALMAZAN, 2007). Homologias para a região controle de outras espécies de camarão marinho foram baixas (*Fenneropenaeus chinensis*, Evalue = 6e-84; *Farfantepenaeus duorarum*, Evalue = 4e-68).

A composição média das seqüências foi de A=35,57% C=10,23% G=7,93% T=46,27%. As 13 amostras foram analisadas levando em consideração parâmetros de Matriz de distância não corrigida e matriz de distância de kimura 2P (2:1 transversões:transições). As matrizes feitas para cada contig, foram bastante similares sendo que os indivíduos Ac 23 e Ac44 foram os que se apresentaram mais distantes na matriz não corrigida tendo 5,71% de diferença enquanto na matriz de Kimura 2p os indivíduos menos aparentados foram Ac 44 com Ac 23 os quais tiveram também 5,71% de diferença. Essa alta similaridade entre as matrizes pode ser devido à existência nestas seqüências de uma maior quantidade de transições que transversões (Tab. 8).

Tabela 8: Abaixo da diagonal se encontra os valores da distância genética não corrigida e acima valores da distância de Kimura 2P

	Ac50	Ac43	Ac42	Ac38	Ac46	Ac30	Ac14	Ac48	Ac23	Ac24	Ac49	Ac44	Ac22
Ac50	-	0.0379	0.0247	0.0224	0.0247	0.0407	0.0457	0.0369	0.0235	0.0140	0.0430	0.0497	0.0407
Ac43	0.0379	-	0.0451	0.0415	0.0451	0.0469	0.0520	0.0047	0.0403	0.0391	0.0454	0.0534	0.0480
Ac42	0.0247	0.0451	-	0.0035	0.0046	0.0442	0.0493	0.0454	0.0319	0.0187	0.0429	0.0569	0.0430
Ac38	0.0224	0.0415	0.0035	-	0.0082	0.0432	0.0482	0.0429	0.0295	0.0199	0.0418	0.0534	0.0407
Ac46	0.0247	0.0451	0.0046	0.0082	-	0.0455	0.0506	0.0454	0.0319	0.0175	0.0417	0.0558	0.0418
Ac30	0.0407	0.0469	0.0442	0.0432	0.0455	-	0.0070	0.0459	0.0468	0.0430	0.0273	0.0154	0.0273
Ac14	0.0457	0.0520	0.0493	0.0482	0.0506	0.0070	-	0.0509	0.0518	0.0480	0.0248	0.0129	0.0259
Ac48	0.0369	0.0047	0.0454	0.0429	0.0454	0.0459	0.0509	-	0.0393	0.0380	0.0456	0.0537	0.0482
Ac23	0.0235	0.0403	0.0319	0.0295	0.0319	0.0468	0.0518	0.0393	-	0.0259	0.0454	0.0571	0.0431
Ac24	0.0140	0.0391	0.0187	0.0199	0.0175	0.0430	0.0480	0.0380	0.0259	-	0.0416	0.0532	0.0405
Ac49	0.0430	0.0454	0.0429	0.0418	0.0417	0.0273	0.0248	0.0456	0.0454	0.0416	-	0.0284	0.0164
Ac44	0.0497	0.0534	0.0569	0.0534	0.0558	0.0154	0.0129	0.0537	0.0571	0.0532	0.0284	-	0.0272
Ac22	0.0407	0.0480	0.0430	0.0407	0.0418	0.0273	0.0259	0.0482	0.0431	0.0405	0.0164	0.0272	-

Um agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean) foi construído através do programa Neighbor com base nas matrizes de distância não corrigida, observando-se uma formação de dois grupos. (Fig. 16).

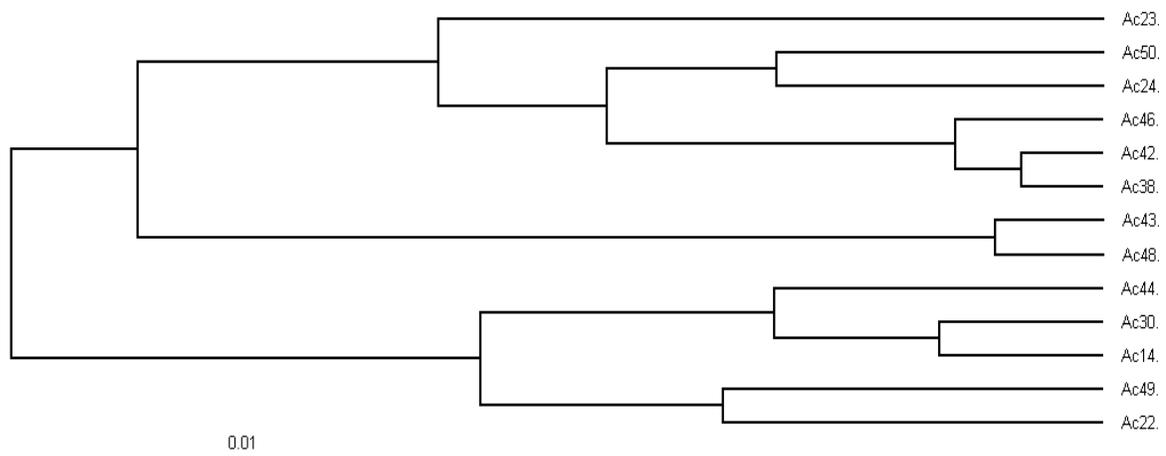


Figura 16: Dendrograma UPGMA construído a partir de distâncias não corrigidas entre seqüências parciais da região controle mitocondrial de *L. vannamei* provenientes de um mesmo plantel.

Um dendrograma baseado na matriz de distância Kimura 2P foi gerado também através do programa Tree View, apresentando-se de forma bem similar ao das distâncias não corrigidas (Fig. 17).

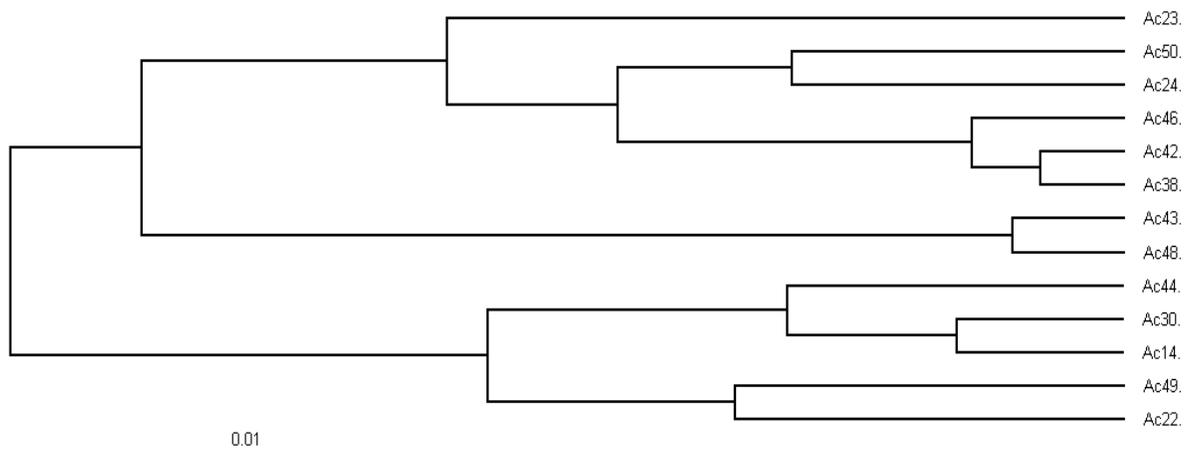


Figura 17: Dendrograma UPGMA construído a partir da matriz de Kimura 2P entre seqüências parciais da região controle mitocondrial de *L. vannamei* provenientes de um mesmo plantel

Para se observar a relação entre os indivíduos de populações diferentes introduzimos seis seqüências da região controle mitocondrial da mesma espécie de *L. vannamei* obtidas a partir do GenBank no estudo para visualizar a relação existente entre as populações selvagens e as populações de cativeiro. A matriz de distância Kimura 2P entre estas seqüências foi gerada (Tab. 9). Dendrograma obtido desta matriz notou-se uma homogeneidade entre as amostras (Fig 18).

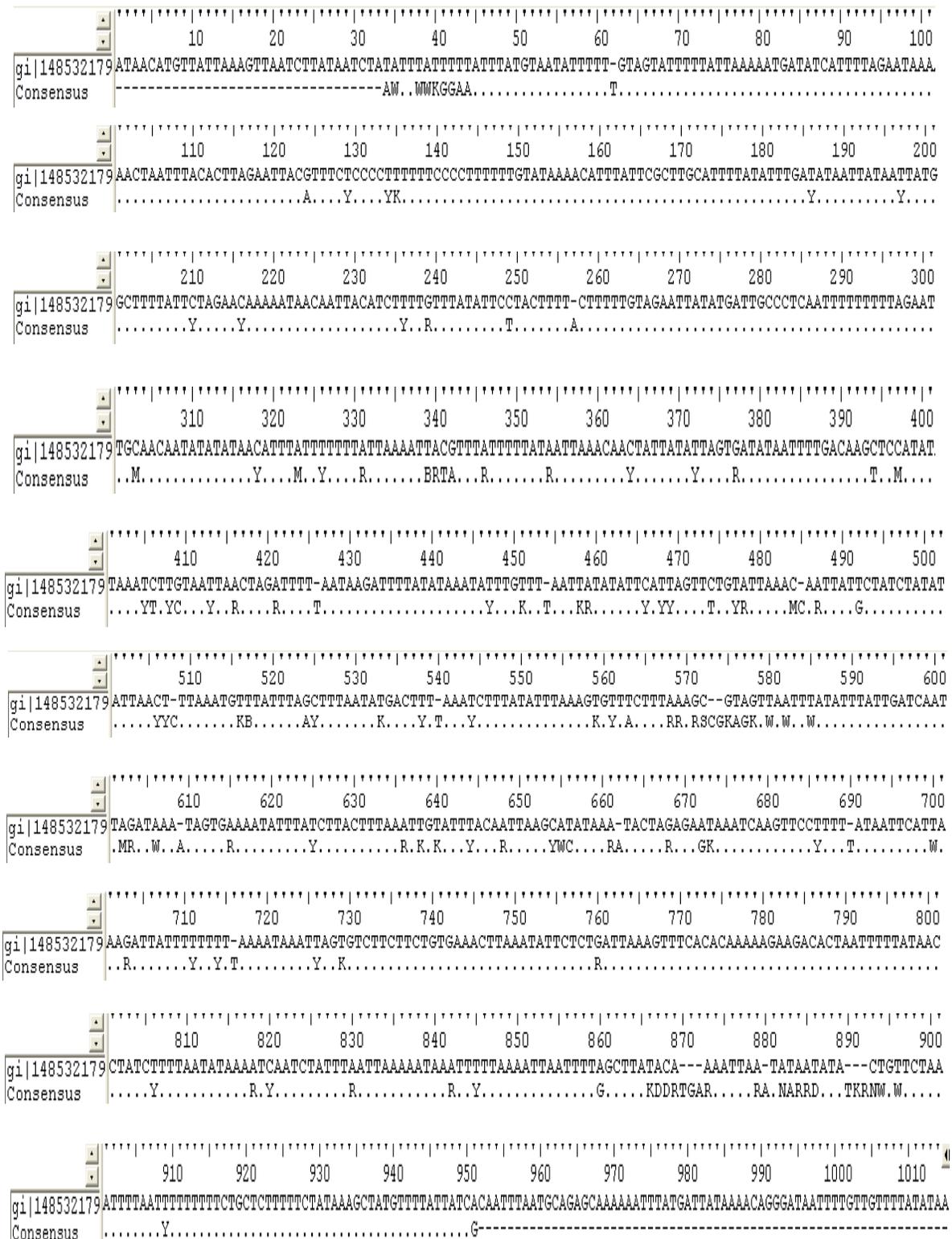


Figura 19: Alinhamento da sequência consenso do grupo de sequências parciais e região controle mitocondrial de *L. vannamei* completo obtida pelo GenBank: W – T ou

A; K – G ou T; Y – T ou C; R – A ou G; M – C ou A; B – T ou C; S – G ou C; D – T ou G; N – A, G, T.

6. Discussão

6.1 Análise da variabilidade dos microssatélites

Espécies criadas em cativeiro apresentam uma baixa variabilidade genética devido ao tipo de tratamento que estão expostas. Diferente das populações naturais que normalmente possuem esses valores altos (BENZIE, 2000). Tem se observado uma grande intensidade de estudos relacionados à variabilidade de camarões peneídeos principalmente da região do Pacífico (BENZIE, 2000; WOLFUS et al., 1997, VALLES-JIMENEZ *et al.*, 2005; CRUZ et al., 2004), por serem espécies de grande importância econômica.

Devido à proibição da entrada de reprodutores da espécie *L. vannamei* no Brasil, os estoques reprodutores passaram a ser povoados por animais vindos de diferentes centros reprodutores nacionais, a partir de então informações a nível genético destes estoques passou a ser de fundamental importância para a sua sustentabilidade.

O número de alelos encontrados neste estudo (3 a 12) para os dez loci de microssatélites foi menor que o encontrado por Valles-jimenez et al., (2005) na mesma espécie em populações naturais, utilizando apenas 5 loci, o mesmo ocorrendo com populações cultivadas de *L. vannamei* analisadas com 5 locis de microssatélites encontrando uma variação alélica de 2 a 14 alelos (CRUZ et al., 2002). Em *Penaeus monodon* os microssatélites examinados revelaram entre 19 e 30 alelos em 5 loci na Tailândia (TASSANAKAJON et al., 1998). Já Wolfus et al., (1997) apresentaram uma variação alélica de 4 a 23 alelos, para um único loci. A diferença na proporção alélica apresentada neste estudo quando comparado a estudos realizados em populações naturais decorre do manejo praticado em cultivo, o que intensifica esta diminuição. Mesmo com esses resultados foi observado que os microssatélites ainda apresentam uma variabilidade maior que a apresentada por aloenzimas (BENZIE, 2000). Ambos os laboratórios apresentaram polimorfismo para todos os loci utilizados.

Os níveis de heterozigosidade média apresentados (0,30 a 0,82) foram maiores que os encontrados em populações naturais com valores entre 0,164 e

0,535 (VALLES-JIMENEZ, *et al.*, 2005), revelando uma boa diversidade genética destas populações. Mas quando comparado a outras espécies, esse nível de heterozigotos se torna menor comprovando que a espécie *L.vannamei* apresenta níveis de heterozigosidade menor que outras espécies de peneídeos (BENZIE, 2000). Em adição, foi observado que o número de alelos efetivos foi menor que o número de alelos atuais na população como relatado em análise de populações cultivadas e naturais da mesma espécie (WOLFUS *et al.*, 1997 VALLES-JIMENEZ, *et al.*, 2005). Com isso pode-se observar que estimativas de variabilidade genética, analisadas através de heterozigosidade apresentam limitações, pois devem se levar em consideração também o número e distribuição dos alelos (BEARDMORE *et al.*, 1997).

Os valores de Fis diferentes de zero indicaram uma queda na média de variabilidade genética destes laboratórios com valores médios de 0,19921 para o laboratório 1 e 0,15312 para o laboratório 2. Esses valores são menores do que o mencionado para populações naturais onde Valles-Jimenez *et al.*, (2005) encontraram valores de Fis significativamente maiores que zero, tanto individualmente como em todas as populações. Esses resultados de Fis podem ser respondidos como resultado de cruzamento de indivíduos aparentados nestas populações. O resultado negativo apresentado para o loci 1003 demonstrou um bom nível de variabilidade nessa região de microssatélite, enquanto que este mesmo loci apresentou valor de Fis de 0,426 em populações naturais (VALLES-JIMENEZ *et al.*, 2005).

Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram detectados na maioria dos loci nas duas populações, apresentando valores de p menores que 0,05. Este fenômeno ocorre devido ao tratamento em que estes indivíduos são expostos, não atendendo as condições necessárias ao equilíbrio. Uma explicação desse desvio de Hardy-Weinberg pode ser a presença de níveis de endogamia nos plantéis. Este fenômeno pode ser observado em outras espécies de Peneídeos como *P. monodon* Para o qual se encontraram desvios de Hardy-Weinberg apresentando déficit de heterozigotos para 3 loci de microssatélites em 4 populações (XU *et al.*, 2001). Assim como em populações naturais Valles-Jimenez *et al.*,(2005) também encontraram um desvio de HWE

em *L. vannamei* ao longo do Pacífico podendo ser devido a existência de cruzamentos entre coortes.

Níveis de *Fst* para populações naturais têm indicado que cada localização de populações naturais estudadas por Valles-Jimenez *et al.*, (2005) devem ser tratadas como populações separadas. Já os índices de *Fst* obtidos neste estudo revelaram que as duas populações analisadas não apresentam diferenças significantes entre si. O material genético destas duas populações são muito similares, talvez pelos reprodutores possuírem a mesma origem, não havendo a introdução de material genético diferente.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as populações cultivadas de *L. vannamei* mesmo apresentando um alto grau de variabilidade precisam ser tratadas com atenção em sua manutenção, pois esses níveis favoráveis de diversidade são fundamentais para o sucesso desta atividade. Com essa variabilidade encontrada nos plantéis cearenses estudados observa-se a necessidade de um controle destes reprodutores, para se poder manter uma diversidade genética natural da espécie evitando perdas totais no caso de doenças, mudanças drásticas de ambiente e manejo. O monitoramento genético dos plantéis comerciais brasileiros através do uso de marcadores moleculares deve ser ampliado o controle genético dos estoques e elaboração de práticas de manejo reprodutivo mais adequadas à produção.

6.2 Região controle do DNA mitocondrial

O mtDNA possui uma alta diversidade genética típica em peneideos assim como em crustáceos decápodes (BALDWIN *et al.*, 1998; McMILLEN-JACKSON e BERT, 2003). Esse alto nível de variabilidade é devido a alta taxa de mutação do mtDNA em relação ao genoma nuclear. Baldwin *et al.*, (1998) obtiveram um alto grau de diversidade genética em espécies de Peneideos, sugerindo uma elevada taxa de evolução no mtDNA destes indivíduos. Estudos com o gene 16S mitocondrial têm demonstrado o seu poder de diversidade interespecífica, por apresentar baixa taxa de mutação, sendo, portanto mais conservado (MAGGIONI *et al.*, 2001). Para análises intraespecíficas esse gene deixa a desejar, não apresentando diversidade significativa dentro de uma mesma espécie (FRANCISO e GALETTI 2005). Em contraste ao relatado para

este gene, o gene COI, apresenta divergência genética suficiente para análises intraespecíficas, sendo mais informativa que o gene 16S (BENZIE, 2000).

A grande diversidade genética encontrada na região controle mitocondrial se dá devido a alta taxa de mutação do mtDNA. Em nosso trabalho podemos observar que ao tentar analisar a homologia de nossas seqüências de *L. vannamei* com seqüências da mesma região do mtDNA de outras espécies, obtivemos homologias extremamente baixas. Não sendo possível um alinhamento confiável entre elas. Estudos têm demonstrado que a região controle mitocondrial é um marcador altamente informativo em análises de estrutura de populações (TSOI et al., 2005).

A região controle mitocondrial é uma região rica em adenina e timina, o que tem sido amplamente observado tanto em invertebrados como vertebrados (LEWIN, 2000, CHU et al., 2003). Tal fato pode ser comprovado através da predominância de A e T encontrado na composição nucleotídica das seqüências analisadas, as quais possuem cerca de 74% de suas seqüências constituídas de A+T. Por possuírem ligações duplas entre A e T, deve facilitar a replicação do DNA mitocondrial. Um fragmento de aproximadamente 1.1Kb contendo a região controle completa do mtDNA foi amplificada. Valles-Jimenez et al., (2006) também obtiveram amplicons em torno de 1,1 Kb em populações naturais de *L. vannamei* enquanto Chu *et al.*, (2003) relata fragmentos de 573 a 610pb em outras espécies de Peneídeos.

Foi seqüenciada uma extensão de 918 pb de excelente qualidade, correspondendo a 90% da região controle mitocondrial da espécie *L. vannamei* quando comparado nossa seqüência consenso com a seqüência completa desta mesma região em uma população natural deste peneídeo (MUHLIA-ALMAZAN *et al.*, 2007) a qual possui em torno 1010 pb.

Taxas de substituição apresentadas pela região controle mitocondrial permitiram detectar diferenças em populações da mesma espécie (McMILLEN-JACKSON e BERT, 2003; TSOI et al., 2005). A matriz de distancia não corrigida e a matriz de kimura dois parâmetros (K2P) dos contigs de cada individuo, não apresentaram diferenças significantes entre si, isso se deve ao nível de substituições dessas seqüências apresentarem maior quantidade de transições que transversões. O nível de transição encontrado foi de 7,52%,

enquanto o nível de transversão foi de 3,81%. Perfazendo um total de aproximadamente 10% de substituições entre as seqüências. Quando adicionada populações naturais da mesma espécie o nível de substituição entre as seqüências passou para aproximadamente 16% sendo que destas 11,13% foram transições e 4,80% eram de transversões, demonstrando um leve aumento na diferenciação entre populações de uma mesma espécie. Devido a esta maior parte de transições que transversões nota-se que as duas árvores obtidas são muito similares.

O dendrograma construído a partir da matriz Kimura 2P entre as seqüências deste estudo e as seqüências do GeneBank, demonstrou um bom nível de variabilidade da região controle mitocondrial, observando-se que as seqüências AY45710.1 (Sinaloa - ME) e AY845713.1 (Panamá) estão levemente mais distantes, enquanto as seqüências AY845711.1 (Guerrero - ME), AY845715.1 (Panamá), AY845712.1 (Guatemala - ME), AY845714.1 (Guerrero - ME) se encontram mais misturadas com as nossas seqüências. Diferente do que foi abordado por Valles-Jimenes et al., (2006), que considerou essas populações como diferentes entre si, no nosso trabalho pode-se notar uma boa homologia entre todas as seqüências, isso pode ser devido a sua metodologia ter sido através de análises de RFLP.

A falta de conhecimento genético para um manejo adequado dos plantéis tem sido um grande problema enfrentado por diferentes fazendas de cultivo de camarão no Brasil. Um conhecimento do nível de heterozigosidade entre e dentro dos estoques, permite um planejamento apropriado dos cruzamentos diminuindo os efeitos deletérios do endocruzamento, resultando na preservação dos mesmos (ALLEGRUCCI *et al.*, 1998).

A Região controle mitocondrial das espécies naturais tem se mostrado um potencial marcador para o uso de genética na aqüicultura, através de medidas efetivas de manejo destes estoques. (VALLES-JIMENEZ *et al.*, 2006). O presente trabalho forneceu subsídios para o delineamento de novos métodos de manejo visando à manutenção e aumento da variabilidade genética destes plantéis.

7. Conclusões

- Nos dois tipos de marcadores genéticos utilizados observou-se uma boa variabilidade genética nos dois laboratórios de maturação.
- A divergência e a composição nucleotídica obtidas neste estudo estão compatíveis com os resultados previamente descritos para região controle mitocondrial, para a espécie em questão.
- A leve diferença observada entre as seqüências obtidas, pode ser devido à variabilidade genética existente dentro do plantel.
- As informações obtidas através do uso de marcadores como a região controle mitocondrial, é indicado no emprego em aqüicultura para análise da variabilidade genética em espécies de *L. vannamei*, assim como para programas de melhoramento no manejo dos reprodutores mantidos em carcinicultura.
- Através dos resultados obtidos na análise de microssatélites sugere-se que os reprodutores dos dois laboratórios de maturação tenham sido originados de um mesmo plantel.
- O coeficiente de endocruzamento foi baixo, o que sugere uma boa variabilidade dentro dos plantéis.
- Os loci de microssatélites utilizados demonstraram-se viáveis ao estudo da estrutura genética nos laboratórios cearenses analisados. A utilização desta técnica constitui uma ferramenta válida para a utilização dos carcinicultores no estudo de diversidade genética de programas de criação.

8. Referência

- ALBERTONI, E. F.; PALMA-SILVA, C.; ESTEVES, F. A. **Crescimento e Fator de Condição na Fase Juvenil de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille) e *F. paulensis* (Pérez-Farfante) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) em uma Lagoa Costeira Tropical do Rio de Janeiro, Brasil.** Revista Brasileira de Zoologia, 2003. 20[3]: 409-418.
- ALLENDORF, F. W.; RYMAN, N. **Genetic Management of Hatchery Stocks.** In: **Population Genetics and Fishery Management.** In: Ryman, N; Utter, F (eds). Seattle, University of Washington Press, 1987. pp 141–159.
- ALLEGRUCCI, I. G.; *et al.* **Length variation in mtDNA control region in hatchery stocks of European sea bass subjected to acclimation experiments.** Genetic Selection Evolution , 1998. v. 30, p 275-288.
- ALTSCHUL, S. F.; *et al.* **Basic local Alignment search tool.** Journal of Molecular Biology, 1990. 215: 403-410.
- ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. **Cultivo de Camarões Marinhos in Poli, C. R., et al Aqüicultura: Experiência brasileira.** Florianópolis: multitarefa, 2004. p.199-220.
- ARANA, L. V. **Aqüicultura e o Desenvolvimento Sustentável: Subsídios para a Formulação de Políticas de Desenvolvimento da Aqüicultura Brasileira.** Florianópolis. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999. p.310.
- ARGUE, B. J.; ALCIVAR-WARREN, A. **Genetics and Breeding Applied to the Penaeid Shrimp Farming Industry.** In: Controlled and biosecure production systems. Preliminary proceedings of a special session integration of shrimp and chicken models. Sydney, Austrália. Word Aquaculture Society, 1999.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution.** Chapman & Hall, New York, 1994. pp. 511.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Evolução da Produção de Camarão (1996-2005).** [], 2007.

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Projeto Executivo para Apoio Político ao Desenvolvimento do Camarão Marinho Cultivado, Recife, 2004.** p. 11.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Censo da Carcinicultura Nacional 2004.** Resumo dos dados.
- BALDWIN, J.D.; *et al.* **Molecular Phylogeny and Biogeography of the Marine Shrimp *Penaeus*.** *Molecular Phylogeny Evolution*, 1998. 10:399-407.
- BARBIERI JR., R.C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos: Reprodução, Maturação e Larvicultura.** Viçosa. Aprenda Fácil, 2001. v. 01, 255p.
- BEARDMORE, J. A., MAIR, G. C., LEWIS, R. I. **Biodiversity in Aquatic Systems in Relation to Aquaculture.** *Aquaculture Research* 28:829-839, 1997.
- BENZIE, J. A. H. **Genetic Improvement of Prawns.** *Proceedings of the Australian Congress on Genetic Applied to Livestock Production.* Armidale, Australia, 1998.
- BENZIE, J. A. H. **Population Genetic Structure in Penaeid Prawns.** *Aquaculture Research*, 2000. 31: 95-119.
- BORGES-OSORIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética Humana.** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.
- BOTSTEIN, D.; *et al.* **Construction of a Genetic Linkage Map in Man using Restriction Fragment length Polymorphisms.** *Journal Animal Genetic*, 1980. 32:314–331.
- CHU, K. H; LI, C.P; TAM Y. K; LAVERY S. **Application of Mitochondrial Control Region in Population Genetic Studies of the Shrimp *Penaeus*.** *Molecular Ecology Notes*, 2003. 3: 120–122.

- CRUZ, P.; et al; **Isolation and Characterization of Microsatellites in Pacific White Shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei***. Molecular Ecology Notes, 2002. 2(3): 239-241.
- CRUZ, P.; et al. **Genetic Variability Assessed by Microsatellites in a Breeding Program of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)**. Marine Biotechnology, 2004. 6 (2) 157-164.
- CUI, Z.; et al. **Lack of Genetic Differentiation in the Shrimp *Penaeus Chinensis* in the Northwestern Pacific**. Biochem Genet, 2007. 45. 579–588.
- Cuzon, G.;et al. **Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds**. Aquaculture, Amsterdam, 2004. 235: 513 – 551.
- DALL, et al. **The Biology of Penaeidae**. Advances in Marine Biology, Vol. 27 (J. H. S. Blaxter and A. J. Southward, series eds.). Academic Press, London, 1990. 489 pp.
- DINIZ, M. C. **Variabilidade do Gene Mitocondrial Coi de dois Plantéis Reprodutores do Camarão *Litopenaeus Vannamei* do Nordeste Brasileiro**. Monografia (Curso de Ciências Biológicas). Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2005.
- FAST, A. W.; LESTER, L. J.; eds. **Marine Shrimp culture: Principles and Practices Developments in Aquaculture and Fisheries Science**. 1992. V.23, 1-862.
- FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, E. D. **Introdução ao uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética**. EMBRAPA-CENARGEM, 1995, Documento 20, p. 220.
- FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, 1998, p. 220.
- FLEGEL, T. W.. **The Right to Refuse Revision in the Genus *Penaeus***. Aquaculture. 2007, e 264, 2–8.

- FREITAS, D.P, GALETTI, JR, M.P. **PCR-based VNTR core Sequence Analysis for Inferring Genetic Diversity in the Shrimp *Litopenaeus vannamei***. Genetics and Molecular Biology, 2002. 25, 4, 431-434.
- FREITAS, P. D.; **Estudo de Diversidade Genética em Estoque Reprodutores de Camarão *Litopenaeus vannamei* Cultivados no Brasil**. Tese de doutor (Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2003. f.120.
- FREITAS, P. D.; GALETTI JR, P. M. **PCR-based VNTR core Sequence Analysis Inferring on Genetic Diversity of Cultured Prawn *Litopenaeus vannamei***. Genetics Molecular Biology, 2002, v. 25, n.4, p.431-434.
- FRANCISCO, A. K.; GALETTI Jr, P. M. **Genetic Distance Between Broodstocks of the Marine Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA Analyses**. Genetics and Molecular Biology. Printed in Brazil. 2005. 28, 2, 258-261.
- GARCIA, D. K., DHAR, A. K., ALCIVAR-WARREN, A. **Molecular Analysis of a RAPD Marker (B20) reveals two Microsatellites and Differential mRNA Expression in *Penaeus vannamei***. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1996, 5 (1), 71-83.
- GARCIA-MACHADO, E.; *et al.* **Partial Sequence of the Shrimp *Penaeus Notialis* Mitochondrial Genome**. R. Acad. Sci. , 1996. p 319, p. 473-486.
- GARCÍA-MACHADO, E.; *et al.* **Allozyme and Mitochondrial DNA Variation in Cuban Populations of the Shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea : Decapoda)**. Marine Biology, 2001, 138: 701-707.
- GRABOWSKI, M.; STUCK, K. C. **Structure and Intraspecific Variability of the Control Region mtDNA in the Pink Shrimp, *Farfantepenaeus duorarum* (Decapoda, Penaeidae)**. In: Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress, Leiden: Koninklijke Briil NV, 1998. p. 332-344.

- GUSMÃO, J. F.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. **A New Species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) Revealed by Allozyme and Cytochrome Oxidase in Analyses.** Marine Biology, 2000, 137: 435-446.
- HALL, T. **BioEdit version 5.0.6** .North Carolina State University, Departmentt of microbiology ,1999.
- HARRISON, R. G. **Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology.** 1989, Tree 1:6–11
- HAYE, P. A, TAM, Y. K, KORNFIELD, I. **Molecular Phylogenetics of Mole Crabs (Hippidae: *Emerita*).** Journal of Crustacean Biology. 2002, 22, 903-915.
- HICKMAN JR, C. P.; ROBERTS, L. S. **Integrated Principles of Zoology.** 2001.11th ed.
- HILLIS, D.M., MORITZ, C., MABLE, B.K. **Molecular Systematics.** Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1996. 2nd ed. pp. 655.
- HULATA, G.; **Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies.** Genetics, 2001. 111, 155-173.
- JEFFREYS, A. J; WILSON, V. **Thein Hypervariable 'Minisatellite' Regions in Human DNA.** Nature, 1985. 314: 67-73.
- LAWRENCE, A. L.; MCVEY, J. P.; HUNER, J. V. **Penaeid Shrimp Culture. In: Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States.** 1985. p. 127 -153.
- LEWIN, B.. **Genes VII.** Oxford University Press and Cell Press. New York, 2000.
- LITT, M; LUTY, J. A. **A Hypervariable Microsatellite Revealed by in Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene.** Journal Human. Genet, 1989. 44:397-401.
- LIU, Z. J.; CORDES, J. F. **DNA Marker Technologies and their Applications in Aquaculture Genetics.** Aquaculture, 2004. 238: 1-37.

- MAGALHÃES, M.; MARTINEZ, R. A.; GAIOTTO, F. A. **Diversidade genética de *Litopenaeus vannamei* Cultivado na Bahia** Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, agosto, 2007. v. 42, n.8, p.1131-1136.
- MAGGIONI, R.; *et al.* **Molecular Phylogeny of Western Atlantic Farfantepenaeus and *Litopenaeus* Shrimp Based on Mitochondrial 16S Partial Sequences.** Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001. 18 (1): 66-73
- MARQUES, L. C.; *et al.* **Efeito de Altas Salinidades sobre o Cultivo de Camarão da Espécie *Litopenaeus vannamei*. (Boone, 1931) em Condições de Laboratório.** In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca. Recife. Anais. Recife: AEP-BR. 1999. p. 581-588.
- MARTINS, P. C. C. **Cultivo de Camarão marinho.** Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil, 2006. p. 121- 135.
- MATIOLI, S. RR.; BUENE, M. R. P. **Métodos Baseados em PCR para Análise de Polimorfismos de Ácidos Nucléicos.** Biologia Molecular e Evolução. Editora Holos, 2004. Capítulo 15.
- McMILLEN-JACKSON A. L.; BERT, T. M. **Disparate Patterns of Population Genetic Structure and Population History in two Sympatric Penaeid Shrimp Species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the Eastern United States.** Molecular Ecology, 2003. 12, 2895–2905
- MEEHAN, D.; *et al.* **High Frequency and Large Number of Polymorphic Microsatellites in Cultured Shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea:Decapoda].** Marine Biotechnology. 2003. 5 (4): 311 - 330
- MEYER, A. **DNA Technology and Phylogeny of Fish.** In: Beaumont AR (ed) **Genetics and Evolution of Aquatic Organisms.** Chapman & Hall, London. 1994. pp 219–249.
- MOORE, S.S.; *et al.* **The development and Application of Genetic Markers for the Kuruma Prawn *Penaeus Japonicus*.** Aquaculture. 1999. 173: 19-32.

- MUHLIA-ALMAZAN, A., PEREGRINO-URIARTE, A. B.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. **The Mitochondrial Genome of the Pacific white Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Complete Sequence Analysis and Description.** Aquatic Molecular Biology. Journal Unpublished Submitted, 2007. México.
- NUNES, A. J. P. **O Cultivo do Camarão *Litopenaeus vannamei* em Águas Oligohalinas.** Panorama Aqüicultura, Jul-Ago, 2001.
- O' BRIEN, S.J. **Molecular genome mapping: lessons and prospects.** Cur. Opin. Genet. Dev. 1991. 1, 105 – 111.
- PALUMBI, S. R.; BENZIE, J. **Large Mithochondrial Differences Between Morphologically Similar Penaeid Shrimp.** Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1991, 1(1): 27-34.
- PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. F. **Penaeid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera.** Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 1997, 175: 1-233.
- PEREZ, J. E; ROMERO, O. Z. **Genetic Improvement in Crustacean.** Estudo Oceanolo., v. 10, p. 131-137, 1991.
- PRESTON, N.P; CLIFFORD III, H. C. **Melhoramento genético do camarão.** Revista da ABCC. 2002. p. 30-32.
- PRIMAVERA, J. H. **A Reviw of Maturation and Reproduction in Closed *Thelycum penarids*.** In: First International Conference on the Culture of *Penaeid* Prawns/Shrimp. Philippiones: Iioilo.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. **GENEPOP (version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism.** Journal Heredity, 1995, 86, V. 3, p. 248-249.
- RICE, W. R. **Analyzing Tabbles of Statistical Tests.** Evolution, 1989. 43: 223-225.

- ROCHA, I. P.; RODRIGUES, J.; AMORIM, L. **A Carcinicultura Brasileira em 2003**. Revista da ABCC, 2004. 6(1): 30-36.
- ROCHA, I. P. **Carcinicultura Brasileira: Desenvolvimento Tecnológico, Sustentabilidade Ambiental e Compromisso Social**. Revista da ABCC. Ed. Setembro, 2007. 11p.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. **Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers**. Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, 2000, pp. 365-386.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 4ª Ed. Roca. p.1179.
- RYMAN, N.; UTTER, F. (eds.) **Population Genetics and Fishery Management**. University of Washington Press, Seattle, 1987. 420 pp.
- SAMBROOK; J, FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 1989. 2nd ed.
- SBORDONI, V.; *et al.* **Bottleneck effects and the depression of genetic variability in batchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda)**. Aquaculture, 1986. 57:239-251.
- SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites**. In: **Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach**. Hoelzel AR ed. IRL Press, Oxford, 1998. 2nd ed. p. 237-261.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin versão 2.000: A Software for Population Genetics Data Analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
- TASSANAKAJON, A.; *et al.* **Isolation and characterization of Microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon***. Molecul Marine Biol Biotechnology, 1998. 7: 55-61.

- TAUTZ, D.; RENZ, M. **Simple Sequences are Ubiquitous Repetitive Components of Eukaryotic Genomes**. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(10): 4127-4138.
- TONG, J. G.; CHAN, T. Y.; CHU, K. H. **A Preliminary Phylogenetic Analysis of *Metapenaeopsis* (Decapoda: Penaeidae) Based on Mitochondrial DNA Sequences of Selected Species from the Indo-West Pacific**. *Journal of Crustacean Biology*, 2000. 20, 543-551.
- TSOI, K. H.; WANG, Z. Y.; CHU, K. H. **Genetic Divergence Between two Morphologically Similar Varieties of the Kuruma Shrimp *Penaeus japonicus***. *Marine Biology*, 2005. 147:367.
- 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 Biotechnol*, 2004. 6:475–484
- 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*, 2005. V 6: 475–484.
- VALLES-JIMENEZ, R., GAFFNEY, P.M. PEREZ-ENRIQUEZ, R. **RFLP Analysis of the mtDNA Control Region in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Populations from the Eastern Pacific**. *Marine Biology*, 2006. 148:867.
- VOS, P.; *et al.* **AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting**. *Nucleic Acids Resouch*, 1995, V:23, 4407– 4414.
- XU, Z.; *et al.* **A Genetic Diversity of Wild and Cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using Microsatellites**. *Aquaculture*, 2001. 199: 13-40.
- WAINBERG, A. A.; CAMARA, M. R. **Brazilian shrimp Farming... it's growing, but, is it sustainable?** In: *World Aquaculture*. *Brazilian Journal of Genetics*, 1998. v 20, n. 3, p. 421-423.

- WEBER, J. L. **Informativeness of Human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n Polymorphisms.** Genomics, 1990. 7: 524-530.
- WILLIAMS, J. G.; *et al.* **DNA polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers.** Nucleic Acids Resouce, 1990. 18: 6531-6535.
- WILSON, K.; *et al.* **The Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of the Crustacean *Penaeus monodon*: are Malacostracan crustaceans More Closely Related to Insects than to Branchiopods?.** Molecular Biology and Evolution, 2000. 17(6): 863-874.
- WOLFUS, G. M, GARCIA, D. K.; ALCIVAR-WARREN, A. **Application of the Microsatellite Technique for Analysing Genetic Diversity in Shrimp Breeding Programs.** Aquaculture, 1997. 152: 35-47.
- WOLSTENHOLME, D. R.; JEAN, K. W. **Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution.** Int. Revista Cytol., 1992. v. 141, p. 173-216.
- YAMAUCHI, M. M.; *et al.* **PCR-based Approach for Sequencing Mitochondrial Genomes of Decapod, Crustaceans, with a Practical Example from Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*).** Marine Biotechnology, 2004. 6(5): 419-429.
- ZANOLO, R. **Enfermidades na aquicultura: perspectivas e importância do uso de produtos veterinários registrados para a atividade.** Revista da ABCC, 2006. Ano 8 N. 2.