

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* BOONE, 1931 EM FAZENDAS
DE PRODUÇÃO DA REGIÃO DE CANAVIEIRAS (BA)

MARCELO MAGALHÃES SILVA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2007

MARCELO MAGALHÃES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* BOONE, 1931 EM FAZENDAS
DE PRODUÇÃO DA REGIÃO DE CANAVIEIRAS (BA)**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2007

S586

Silva, Marcelo Magalhães.

Caracterização da variabilidade genética do camarão *Litopenaeus vannamei* boone, 1931 em fazendas de produção da região de Canavieiras (BA)/ Marcelo Magalhães Silva. - Ilhéus, BA: UESC, 2007. xviii, 74f. : il. ; anexos

Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui bibliografia.

1. Genética animal. 2. Camarão – Melhoramento genético. 3. Aquicultura. I. Título.

CDD 591.35

MARCELO MAGALHÃES SILVA

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO CAMARÃO
Litopenaeus vannamei BOONE, 1931 EM FAZENDAS DE PRODUÇÃO DA
REGIÃO DE CANAVIEIRAS (BA)

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular

APROVADA: 07 de março de 2007

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Domingues de Freitas
(UFSCAR)

Prof^a. Dr^a. Janisete Gomes da Silva-Miller
(UESC)

Prof^a. Dr^a. Fernanda Amato Gaiotto
(UESC – Orientadora)

Aos meus pais Aelson e Silzete,
Ao meu irmão Alan,
À minha querida Jacke. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que com seu imenso amor e infinita misericórdia me privilegiou com mais essa graça.

Aos meus pais, por concederem a minha vida e lutarem para que eu chegasse onde eles nunca tiveram oportunidade de estar.

Ao meu irmão, pela amizade e pelos belos momentos desfrutados em nossa infância.

À minha amada Jacke, pelo cuidado, amor, compreensão e é claro também pelas correções de português. Ombro amigo na tristeza e um belo sorriso na alegria.

À UESC, que através do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular me oportunizou um crescimento intelectual.

Às minhas queridas orientadoras, Fernanda Gaiotto e Romari Martinez, pela simples lição de vida que são. Muito obrigado por despertarem em mim o pensamento científico e marcarem para sempre e de forma positiva essa etapa da minha carreira.

A todos os docentes do Departamento de Ciências Biológicas, em especial aos Profs. Dário Ahnert, Marco Costa, Marco Costa e Ioná Araújo.

Aos professores Gustavo Braga, Tânia Bath e seus orientandos Sócrates, Wanessa e Neyva, pela ajuda nas coletas e importante troca de informações relacionadas a outras áreas desse projeto.

Ao grupo de pesquisa em genética do camarão da UFSCAR, nas pessoas do Drº. Pedro Galetti e da Drª Patrícia Freitas, pela disponibilização de manuais e informações. Isto que é de fato saber fazer ciência para todos!

À Luciana e Andréa, secretária e ex-secretária do PPGGBM, pela atenção e competência que lhe são peculiares.

À CAPES, pela bolsa e à FAPESB, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Grupo de Apoio à Prevenção à AIDS (GAPA-BA), onde eu tive oportunidade de trabalhar anteriormente e conhecer pessoas espetaculares.

A professora e amiga Idjane Oliveira, pelo o incentivo e apoio me dado durante a graduação, contribuindo de forma significativa para minha formação profissional.

À todos os meus colegas e colaboradores em especial à Claudine, Fernanda Souza, Fernanda Cupertino, Juliana, Paloma, Vinícius, Ricardo, Deyna, Cássio, Samuel, Dany, Joci, Jeiza, Robson, Stênio, Heliana, Brás, Nádja, Vanderly, Carlos Eduardo, Fabrício e Cristiano, pelo auxílio no laboratório, pela ajuda teórica e também pelos períodos de descontração.

Neste momento tão especial, gostaria de externar a minha gratidão a todos que ajudaram direta ou indiretamente na concretização deste sonho. A todos vocês, o meu muito OBRIGADO.

Certeza

De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

Fernando Pessoa

“É preferível arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que não gozam muito e nem sofrem muito, porque vivem na penumbra obscura e cinzenta dos que não conhecem nem a vitória nem a derrota.”

Autor desconhecido

ÍNDICE

EXTRATO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Carcinocultura.....	04
2.1.1. Contexto mundial.....	05
2.1.2. Carcinocultura brasileira	06
2.2. <i>Litopenaeus vannamei</i>	06
2.2.1. Classificação.....	06
2.2.2. Morfologia.....	09
2.2.3. Habitat.....	11
2.2.4. Ciclo de vida.....	12
2.3. Melhoramento genético.....	13
2.3.1. Métodos de melhoramento.....	13

2.3.2. Melhoramento genético do camarão de cultivo.....	14
2.3.3. Seleção de genitores.....	15
2.4. Marcadores moleculares.....	16
2.4.1. RAPD.. ..	16
2.4.2. Microssatélites.....	18
2.5. Estudos de variabilidade genética em peneídeos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Material biológico.....	22
3.2. Otimização do protocolo de extração de DNA total.....	23
3.2.1. Protocolo de Doyle e Doyle (1987) modificado.....	23
3.2.2. Protocolo de Aljanabi e Martinez (1997) modificado.....	24
3.2.3. Protocolo de Walsh et al. (1991).....	25
3.2.4. Protocolo de Sambrook et al. (1989) modificado.....	25
3.3. Quantificação do DNA	26
3.4. Marcadores RAPD.....	27
3.4.1. Padronização das condições de amplificação	27
3.4.2. Seleção de <i>primers</i>	27
3.4.3. Análise dos dados	29
3.4.4. Número mínimo de marcadores para estimativas de Φ_{ST}	30
3.5. Marcadores microssatélites.....	31
3.5.1. Seleção de <i>primers</i>	31
3.5.2. Condições de amplificação (reação de PCR).....	31
3.5.3. Programas de amplificação no termociclador.....	32
3.5.4. Estabelecimento da temperatura de anelamento.....	33
3.5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida 4%.....	34
3.5.6. Análise dos dados.....	35
4. RESULTADOS.....	37

4.1. Extração de DNA total.....	37
4.2. Seleção de <i>primers</i> RAPD.....	39
4.3. Diversidade genética e agrupamentos com base nos marcadores RAPD.....	41
4.3.1. Diversidade genética	41
4.3.2. Agrupamento.....	42
4.4. Comportamento das estimativas de Φ_{ST}	44
4.5. Caracterização dos locos microssatélites para <i>L. vanamei</i>	47
4.6. Estrutura genética utilizando marcadores microssatélites.....	49
5. DISCUSSÃO.....	52
5.1. Extração de DNA total.....	52
5.2. Seleção de <i>primers</i> RAPD.....	54
5.3. Diversidade genética com base nos marcadores RAPD.....	55
5.4. Comportamento das estimativas de Φ_{ST}	56
5.5. Agrupamento com base nos marcadores RAPD.....	57
5.6. Caracterização dos locos microssatélites para <i>L. vanamei</i>	58
6.7. Estrutura genética utilizando marcadores microssatélites.....	59
7. CONCLUSÕES.....	63
8. REFERÊNCIAS	65
ANEXOS.....	73

EXTRATO

MAGALHÃES, Marcelo Silva, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2007. **Caracterização da variabilidade genética do camarão *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 em fazendas de produção da região de Canavieiras (BA)**. Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientador: Romari Alejandra Martinez Montaña. Colaborador: Dário Ahnert.

O *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931, também conhecido como camarão branco do Pacífico é a principal espécie de camarão marinho cultivada no hemisfério ocidental. Nos anos 90, a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) passou a recomendar a não importação de animais reprodutores para evitar a disseminação de doenças. Em função disso, o número de genitores utilizados para a renovação dos estoques foi reduzido, ocasionando redução da variabilidade genética, performance de crescimento e resistência a doenças dos animais. Neste trabalho, objetivou-se realizar a caracterização do perfil genético dos estoques comerciais de *L. vannamei* em fazendas de Canavieiras, a maior região produtora de camarões da Bahia, utilizando marcadores RAPD e microssatélites. Foi analisado um total de 96 animais oriundos de três diferentes empresas fornecedoras de pós-larvas. Os vinte *primers* decâmeros de seqüência arbitrária selecionados geram 59 marcadores RAPD polimórficos que foram analisados utilizando diferentes metodologias por meio dos programas TFGA, AMOVA e

HICKORY. Um considerável nível de endogamia entre os estoques ficou evidenciado pelo TFPGA (0,181). A estatística análoga ao F_{ST} obtida pelo AMOVA denominada Φ_{ST} foi de 0,186. Os coeficientes de endogamia inter (θ^B) e intrapopulacional (f) fornecidos pelo HICKORY foram iguais à 0,0026 e 0,7292 respectivamente, indicando a existência de uma elevada taxa de endogamia em função do cruzamento entre indivíduos geneticamente similares, o que contrastou com as demais metodologias utilizadas até então. Para a comparação dos resultados obtidos pelo RAPD, cinco pares de *primers* microssatélites foram empregados para a obtenção de 6 locos polimórficos. O valor de F_{ST} encontrado a partir de dados codominantes evidenciou uma estruturação genética entre os plantéis estudados, apresentando um valor médio de 0,2648, concordando, de modo geral, com os dados gerados pelo AMOVA e TFPGA através de marcadores dominantes. Os valores de F_{IS} obtidos com os marcadores microssatélites mostraram não existir endogamia dentro dos plantéis pelo cruzamento preferencial entre indivíduos consangüíneos. Visando o estabelecimento de um número mínimo de marcadores dominantes estatisticamente capazes de permitir inferências sobre a estrutura populacional dessa espécie, foram realizados cálculos de coeficiente de variação (CV) para os valores de Φ_{ST} utilizando quantidades de marcadores variando entre 3 e 59. Foi verificado por essas análises que a partir de 48 locos, a variação entre os valores de Φ_{ST} é menor que 4%, sendo, portanto, o número ideal de locos necessários para tais análises de genética populacional. Os resultados obtidos pelo presente estudo são de fundamental importância para a sustentabilidade da carcinocultura em Canavieiras, pois o monitoramento da variabilidade genética poderá evitar perdas na produção, além de auxiliar os produtores na escolha das mais adequadas empresas fornecedoras de pós-larvas.

Palavras-chave: Genética Molecular, Variabilidade Genética, *Litopenaeus vannamei*, Aquicultura.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Marcelo Silva, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, March (2007). Genetic variability in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 in production farms of Canavieiras, Bahia. Adviser: Fernanda Amato Gaiotto. Co-adviser: Romari Alejandra Martinez Montaña. Collaborator: Dário Ahnert.

The pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931, is the main species of sea shrimp cultivated in the western hemisphere. In the last decade, the Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) forbade the importation of reproductive stocks to prevent potential dissemination of infectious diseases. Due to this, the number of parents used in animal improvement programs was dramatically reduced, causing genetic variability reduction, less growth performance and less disease resistance. The goal of the present work was to determine the genetic profile of captive populations of *L. vannamei* in production farms of Canavieiras, considered the major shrimp producing region in the State of Bahia, using molecular tools such as RAPDS and microsatellites. For this, ninety-six animals, from three different suppliers of post-larvae were analyzed. Twenty decamere primers of arbitrary sequence were selected, generating 59 polymorphic RAPD markers that were analyzed using different approaches with the programs

TFPGA, AMOVA and HICKORY. Wright statistics, calculated using the program TFGPA showed a F_{ST} of 0,181, suspecting high inbreeding. AMOVA statistic (analogous to the F_{ST}) Φ_{ST} was 0,186. Inter (θ^B) and intrapopulational (f) inbreeding using the HICKORY program were 0,0026 and 0,7292 respectively, suggesting a high endogamy generated by crossing between genetically similar individuals, contrasting with the previous results. In order to obtain further information, five pairs of microsatellite *primers* were used to produce 6 polymorphic loci. F_{ST} values through codominant data evidenced populational genetic structure with an average value of 0,2648, supporting both AMOVA and TFGPA previous results. F_{IS} values showed no endogamy within the stocks due to inbreeding. Variation coefficients were calculated to establish a minimal number of dominant markers statistically supportive of population structure data for this species through the Φ_{ST} . A variable number of markers between 3 and 59 were tested, proving that 48 loci reports less than 4% Φ_{ST} variation, constituting an ideal number of markers for population genetic studies. Results from the present research are of fundamental importance for the shrimp industry sustainability in Canavieiras, because the maintenance of genetic variability will reduce potential economic losses in the future, apart from helping farmers to select the most adequate suppliers for post-larvae stocks.

Key-words: Molecular Genetics, Genetics Variability, *Litopenaeus vannamei*, Aquaculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais países produtores de camarão de cultivo em 2002 e 2003.....	05
Figura 2. <i>Litopenaeus vannamei</i>	08
Figura 3. Vista lateral de um camarão <i>L. vannamei</i> macho.....	09
Figura 4. Principais órgãos internos do <i>L. vannamei</i>	10
Figura 5. Mapa do sul da Bahia, destacando-se a região de Canavieiras (BA).....	22
Figura 6. Padrão eletroforético do DNA genômico extraído pelo protocolo de Sambrook et al. (1989) modificado.....	38

Figura 7. Padrão de bandas RAPD amplificados a partir de 32 indivíduos de um estoque comercial de <i>L. vannamei</i> utilizando o primer OPA10.....	40
Figura 8. Dendrograma da similaridade genética obtida entre os três estoques comerciais de <i>L. vannamei</i> , definido pelo método de agrupamento UPGMA baseado nas similaridades genéticas de Jaccard, calculadas a partir dos dados RAPD.....	43
Figura 9. Variação das estimativas Φ_{ST} utilizando diferentes números de marcadores RAPD.....	44
Figura 10. Coeficiente de variação (CV) dos valores de Φ_{ST} utilizando diferentes números de marcadores RAPD.....	45
Figura 11. Gráficos dos coeficientes de variação (CV) dos valores de Φ_{ST}	46
Figura 12. Géis de poliacrilamida 4% corado em nitrato de prata contendo fragmentos microssatélites dos locos Pvan0013 (A) e Pvan1758 (B) de 32 indivíduos de um estoque comercial de <i>Litopenaeus vannamei</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Morfologia funcional do camarão.....	11
Tabela 2. <i>Primers</i> RAPD testados para <i>L. vannamei</i>	28
Tabela 3. Principais modificações do protocolo de Sambrook et al., (1989).....	38
Tabela 4. Caracterização dos <i>primers</i> RAPD utilizados em estoques comerciais de <i>L. vannamei</i> na região de Canavieiras.....	39
Tabela 5. Resultado da Análise Molecular de Variância (AMOVA) baseada em três estoques comerciais de <i>L. vannamei</i> na região de Canavieiras (BA).....	41
Tabela 6. Caracterização de seis locos microssatélites polimórficos em <i>L. vannamei</i> . T_a , temperatura de anelamento; N_A , número de alelos; H_O , heterozigosidade observada; H_E , heterozigosidade esperada; $H_{E_{Máx}}$, heterozigosidade esperada máxima	48

Tabela 7. Eficiência de detecção da diversidade gênica máxima ($H_{E_{Máx}}$) para os seis locos microssatélites polimórficos em <i>L. vannanei</i>	49
Tabela 8. Estimativa da heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_o) e índice de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) em três plantéis de <i>L. vannamei</i>	51

1. INTRODUÇÃO

A carcinocultura marinha é uma importante atividade para a balança comercial brasileira. Sua produção entre os anos de 2001 e 2003 passou de 40.000 para mais de 90.000 toneladas/ano, o que representa 5,7% da produção mundial (ABCC, 2004). Atualmente, existem mais de 900 fazendas que cultivam camarões em todo o Brasil e a região nordeste tem destaque nesse cenário, pelo fato de possuir extensa faixa litorânea e condições climáticas favoráveis durante todo o ano. Os estados da região sul, apesar das condições adversas, também apresentam significativos índices de produção de camarões marinhos (ABCC, 2004).

O estado da Bahia é o terceiro maior produtor de camarão em cativeiro do país, tendo crescentes demandas internas e externas. A área utilizada para essa atividade no estado em 2003 foi de 1,7 mil hectares, com expectativas de duplicação nos próximos anos (ABCC, 2004). A região de Canavieiras possui um número significativo de fazendas de cultivo de camarões, sendo a principal região baiana nessa atividade.

O *Litopenaeus vannamei*, conhecido como camarão branco do Pacífico, é atualmente a principal espécie cultivada em toda a América Latina em função da sua boa adaptação às condições de cultivo em baixa salinidade e elevados índices zootécnicos como elevadas taxas de crescimento e conversão alimentar (WAINBERG; CÂMARA, 1998). Esse camarão foi introduzido no Brasil nos anos

80, e é considerado um dos principais responsáveis pelo grande avanço da indústria carcinocultora no país.

No final da década de 90, em virtude da elevada introdução de espécies exóticas marinhas no Brasil, foram criadas uma série de normas para a importação de tais espécies visando à redução dos possíveis impactos dessa prática sobre o ambiente. Também nesse mesmo período, com a disseminação mundial de doenças bacterianas e virais afetando o camarão, a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) passou a recomendar a não importação de animais reprodutores (FREITAS, 2003). Diante desse contexto, a renovação dos estoques passou a ser realizada entre os plantéis já existentes em determinadas regiões, o que implica diretamente na redução do conjunto gênico utilizado para a reprodução, afetando conseqüentemente o nível de variabilidade genética dos estoques de camarões cultivados (FREITAS; GALETTI, 2002).

Com os avanços da biologia molecular nos últimos anos em função do advento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), diversos marcadores moleculares baseados nessa técnica têm sido empregados para avaliar a estrutura genética em populações de camarões peneídeos (TASSANAKAJON et al, 1997; BOOKER et al, 2000; KLINBUNGA et al, 2001; GONÇALVES et al, 2005). Estudos realizados em diferentes espécies de camarões têm mostrado que o monitoramento do nível de variabilidade genética dos estoques auxilia de forma especial na orientação do manejo aplicado (FREITAS, 2003). Os programas de melhoramento genético podem ser facilitados pela utilização de marcadores moleculares que possibilitem distinguir animais com melhores características sanitárias e biométricas, possibilitando a diminuição dos custos de produção e proporcionando um aumento da produtividade (BEUZEN et al, 2000).

Esse trabalho contribui significativamente para a carcinocultura na região de Canavieiras, pois embora existam alguns estudos em nível nacional referentes à variabilidade genética do *L. vannamei*, este é o primeiro a caracterizar geneticamente, por meio de marcadores moleculares, os estoques de camarões em fazendas da região mais importante da Bahia para o setor.

O presente estudo teve por principal objetivo a caracterização da variabilidade genética dos estoques comerciais de camarões da espécie *L. vannamei* cultivados em fazendas da região de Canavieiras (BA) com base em

marcadores moleculares, visando auxiliar na elaboração de estratégias de renovação desses estoques e contribuindo com o fortalecimento da atividade nessa localidade. Visando atingir essa meta principal, foram propostos os seguintes objetivos específicos: estabelecimento de um protocolo de extração de DNA que proporcione rendimento e qualidade satisfatória ao presente estudo; amplificação por PCR de pelo menos 50 locos RAPD e seis locos microssatélites reportados em literatura especializada; comparação dos coeficientes de endogamia gerados por diferentes metodologias a partir da utilização de dados dominantes com as estatísticas F de Wright obtidas por marcadores codominantes e estabelecimento de um número mínimo de marcadores dominantes capazes de fornecer informações estatisticamente confiáveis sobre estrutura genética populacional dessa espécie, com base na verificação do Φ_{ST} calculado com diferentes números de marcadores RAPD.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Carcinocultura

O cultivo de organismos em ambiente aquático em alguma fase do seu ciclo de vida é denominado aqüicultura. Diversas espécies animais têm sido cultivadas dessa maneira tais como peixes, moluscos, crustáceos e outros (MELLO, 2002). Dentre os setores que compõem a cadeia produtiva da aqüicultura e da pesca, destaca-se a maricultura que tem por objetivo o cultivo de animais marinhos e, entre estes, os camarões marinhos.

Segundo Arana (1999), a carcinocultura teve seu início no sudoeste da Ásia no século XV. Contudo, apenas a partir de 1930, foram realizados os primeiros experimentos para a produção da desova da espécie *Marsupenaeus japonicus* em laboratório. Na década de 70, com o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo, a produção comercial das espécies de camarões teve grande impulso, sendo suas conseqüências refletidas até os dias atuais.

O processo de produção na carcinocultura é dividido em duas fases: a larvicultura, que compreende a produção de pós-larvas em laboratório; e a engorda, que consiste no crescimento dos animais até a obtenção de índices comercializáveis. Ainda, em algumas propriedades, existe o processo de melhoramento, onde são selecionados animais para a reprodução, baseando-se em índices zootécnicos e na sanidade apresentada (FRANCISCO, 2003).

2.1.1. Contexto mundial

A carcinocultura é uma atividade em franca expansão mundial. Sua produção em 1982 foi de 84.000 toneladas (t); em 1994 passou para 733.000 t; e em 2003 atingiu o valor de 1.630.000 t (ABCC, 2004). Atualmente, dois continentes dominam a produção mundial de camarão. O continente asiático, é responsável por 75% da produção, enquanto a América Latina pelos 25% restantes (LUCCHESE, 2003). Nesse contexto, merecem destaque países como China (370.000 t) e Tailândia (280.000t) na Ásia e o Brasil (90.190 t), que apesar dos problemas enfrentados com enfermidades superou em 2003 o Equador, passando a ser líder em produção de camarões na América Latina (Figura 1).

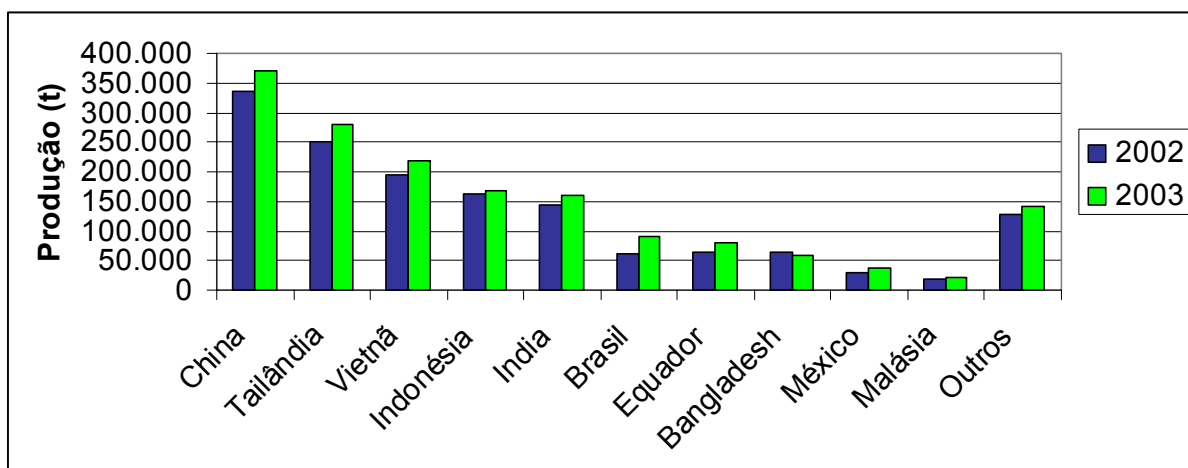


Figura 1. Principais países produtores de camarão de cultivo em 2002 e 2003.
Fonte: (ABCC, 2004).

Com movimentação de 6,1 bilhões de dólares por ano, o cultivo de camarão tem representado 12% de toda a indústria agrícola mundial, sendo os maiores importadores os Estados Unidos, com média anual de 315.000 t, seguidos pelo Japão, importando em média 270.000 t, e países da União Européia com cerca de 300.000 t (LUCCHESE, 2003).

2.1.2. Carcinocultura brasileira

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2001), o histórico da carcinocultura brasileira foi dividido basicamente em três fases:

A primeira etapa teve início nos anos 70, quando o país deu os primeiros passos na atividade, mas somente nos anos 80, o cultivo de camarões começou a ter um cunho empresarial com a introdução da espécie exótica *M. japonicus*. Contudo, devido à ausência de investimentos em pesquisas e inaptidão da espécie às baixas condições de salinidade, a carcinocultura entrou em declínio.

A segunda etapa foi iniciada em meados dos anos 80 e início da década de 90 com a introdução e cultivo da espécie exótica *L. vannamei*. Atualmente, essa é a principal espécie cultivada no país, sendo responsável por 95% de toda a produção de camarões. A introdução desse peneídeo promoveu um grande avanço para a indústria carcinocultora, proporcionando a modernização da atividade através do surgimento de laboratórios de produção de pós-larvas e introdução de novas técnicas de nutrição e manejo (WAINBERG; CAMARA, 1998).

A terceira etapa é vivida na atualidade após o desenvolvimento da tecnologia de reprodução e engorda, alcance da auto-suficiência na produção de pós-larvas, disponibilidade de rações especializadas e o despertar dos produtores para a qualidade do produto final. Essa combinação de fatores tem favorecido o Brasil em direção ao mercado externo, gerando divisas para o país.

2.2. *Litopenaeus vannamei*

2.2.1. Classificação

A espécie *Litopenaeus vannamei* (Figura 2) pertence ao Reino Animalia e é taxonomicamente classificada segundo esquema a seguir:

Filo	Arthropoda
Sub-filo	Crustacea Pennant, 1777
Classe	Malacostraca Latreille, 1806
Subclasse	Eumalacostraca Grobben, 1892
Superordem	Eucarida Calman, 1904
Ordem	Decapoda Latreille, 1803
Subordem	Dendrobranchiata Bate, 1888
Superfamília	Penaeoidea Rafinesque, 1815
Família	Penaeidae Rafinesque, 1815
Gênero	<i>Litopenaeus</i> Pérez Farfante e Kensley, 1997
Espécie	<i>Litopenaeus vannamei</i> Boone, 1931



Figura 2. *Litopenaeus vannamei*

2.2.2. Morfologia

Os artrópodes em geral são cobertos por uma estrutura calcificada denominada exoesqueleto que é constituído por quitina, proteínas e carbonato de cálcio. O corpo dos camarões é dividido em duas regiões distintas compostas pelo cefalotórax e pelo abdômen (BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2001).

O cefalotórax, localizado na porção anterior do corpo do camarão, é uma estrutura formada pela fusão entre cabeça e tórax na qual se encontram as seguintes estruturas de grande importância funcional para o animal: (i) a carapaça cuja função é recobrir e proteger as brânquias e órgão vitais; (ii) os olhos pedunculados, responsáveis pela visão; e (iii) o rostro, estrutura pontiaguda com função de proteger o animal contra os predadores (Figura 3). Também no cefalotórax encontram-se vísceras importantes tais como o cérebro, coração, hepatopâncreas, estômago e as gônadas (Figura 4).

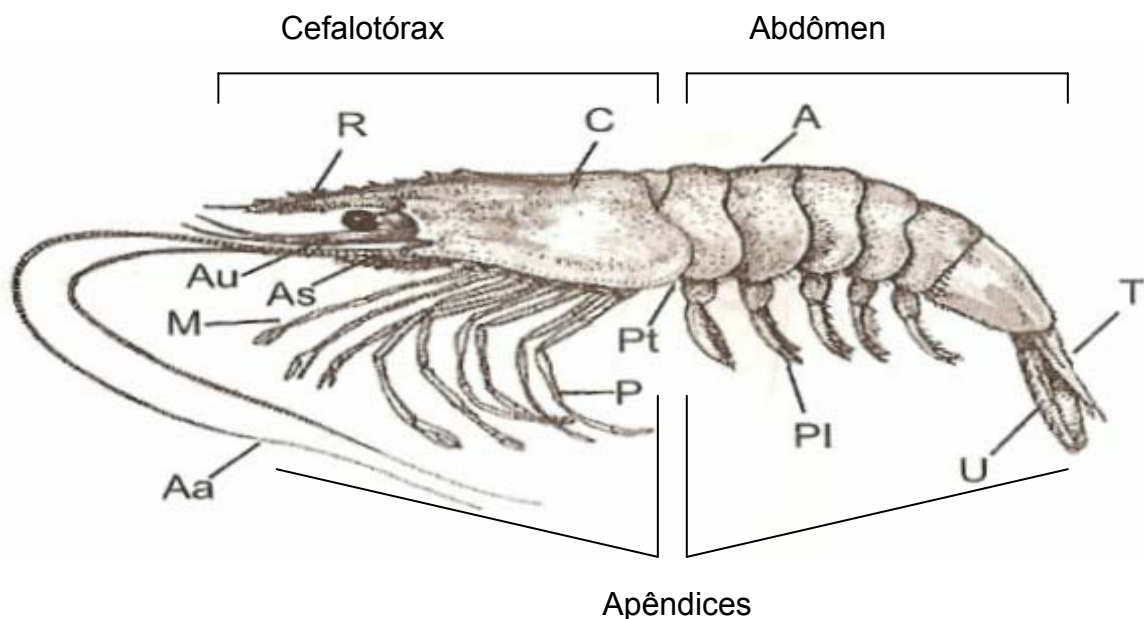


Figura 3. Vista lateral de um camarão *L. vannamei* macho. A, abdômen; Aa, antena; As, escama antenal; Au, antênula; C, carapaça; M, terceiro maxilípide; P, pereiópodo; Pl, pleópodo; Pt, petasma; R, rostro; T, telson; U, urópodo.

Fonte: (BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2001).

O abdômen, localizado na parte posterior do corpo do animal, contém a maior parte da musculatura dos peneídeos, bem como o ânus e um cordão do sistema nervoso (ANDREATTA; BELTRAME, 2004) (Figura 4).

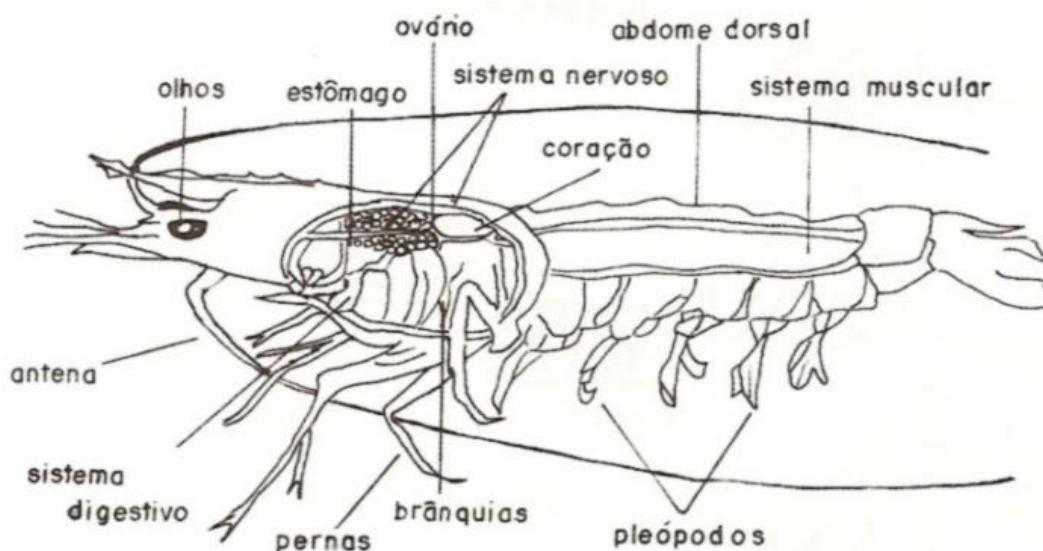


Figura 4. Principais órgãos internos do *L. vannamei*.
Fonte: (ANDREATTA; BELTRAME, 2004).

Os apêndices são estruturas com diversas funções tais como alimentação, locomoção, escavação, limpeza e captação de estímulos externos. As antenas e antênulas, localizadas na cabeça, possuem basicamente funções sensoriais. As maxilas, maxílulas e mandíbulas, também localizadas na cabeça, estão relacionadas a funções alimentares tais como corte, manipulação e trituração de alimentos. No tórax estão localizadas estruturas como os maxilípedes que têm tanto funções sensoriais (tato e paladar) quanto alimentares (manipulação dos alimentos). Ainda no tórax, encontram-se os cinco pares de patas ambulacrais ou pereiódopos que desempenham a função de locomoção sobre superfícies, sendo que o primeiro par de pereiódopos possui forma de pinça e denomina-se quelípodo.

Os pleópodos (*pleo*= natação, *podos*= patas) localizam-se na região abdominal dos peneídeos e são utilizados para nadar. No somito terminal (6° somito) da região abdominal está associado o telson que possui a função de direcionamento do camarão durante a natação (BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2001) (Figura 3).

A tabela 1 mostra os principais apêndices dos camarões e suas respectivas funções.

Tabela 1. Morfologia funcional do camarão

Apêndices	Função Principal
Antênlulas	Sensorial (quimiorrecepção, tátil, equilíbrio)
Antenas	Sensibilidade tátil (detecção do predador)
Mandíbula e lábio mandibular	Sensibilidade tátil, captura de alimentos
Maxílula	Manipulação de alimentos
Maxila e escafnatitos	Manipulação de alimentos, limpeza branquial, movimentação da água sobre as brânquias
Maxílpede	Tato, paladar e manipulação de alimentos
Pereiódopo	Locomoção (caminhar sobre superfícies sólidas)
Pleópodo	Locomoção (natação)
Urópodo e telson	Direcionamento da locomoção durante a natação

Fonte: (BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2001).

2.2.3. Habitat

O *Litopenaeus vannamei* é encontrado naturalmente em alto mar, no Pacífico leste, desde Sonora no México, até Tumbes no norte do Peru. Essa espécie tem sido amplamente cultivada em todo o hemisfério ocidental, apresentando ótimo desempenho sob o ponto de vista produtivo (BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2001).

2.2.4. Ciclo de vida

Durante a fase reprodutiva, as fêmeas eliminam cerca de 100.000 a 500.000 ovos em alto mar e os machos, durante a cópula, liberam espermatozóides que fecundarão esses ovos em um processo de fecundação externa. Doze horas após a fecundação nascem os náuplios, que passam posteriormente por cinco sub-estágios (N1 a N5) (PRIMAVERA, 1984).

No estágio naupliar, as larvas se nutrem apenas por meio das reservas de vitelo. Em função de um fototaxismo positivo, esses náuplios migram para a superfície do mar utilizando suas antenas e encontram nessa região fitoplâncton abundante que lhe servirá de alimento no próximo estágio de vida. Em uma temperatura de 26°C, o estágio de náuplio dura cerca de 36 horas (ANDREATTA; BELTRAME, 2004).

Após sofrerem uma série de mudanças em sua forma e comportamento, os náuplios atingem o estágio de protozoéia. Nessa fase as larvas passam por três sub-estágios (Z1 a Z3) e começam a capturar o próprio alimento em função do esgotamento da sua reserva energética, tornando-se ao final desse estágio, que dura cerca de 48 horas, mais carnívoros (ALFONSO; COELHO, 1997).

Durante a fase de mysis, as larvas passam por uma nova série de mudanças morfológicas e comportamentais e a carapaça passa a recobrir todo o tórax do animal. Essa fase dura aproximadamente três dias, as larvas têm três sub-estágios (M1 a M3) e a alimentação do mysis passa a ser principalmente o zooplâncton sendo o fitoplâncton consumido em menor quantidade (ANDREATTA; BELTRAME, 2004). O processo de metamorfose termina quando os animais passam do estágio de mysis III para pós-larva.

Anatômica e fisiologicamente, as pós-larvas são muito semelhantes a um camarão adulto, diferindo apenas em alguns detalhes. Após deixarem o estágio de pós-larvas, os camarões passam a ser juvenis e nessa última fase os animais são exatamente iguais aos adultos não atingindo apenas a maturação gonadal (BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2001).

2.3. Melhoramento genético

Alguns registros mostram que há 10 mil anos os primórdios da civilização humana já se preocupavam com a seleção de plantas e animais para a sua sobrevivência (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; RAMALHO et al., 2001). Baseando-se em observações, o inglês Robert Bakewell (1725-1795) iniciou os trabalhos de melhoramento animal responsáveis pela formação e evolução das raças de bovinos, ovinos e eqüinos. Porém, somente em 1900, com a redescoberta simultânea dos trabalhos de Mendel pelos pesquisadores De Vries, Correns e Tschermak, o melhoramento animal surgiu como ciência (STURTEVANT, 1965).

No último século, o crescimento populacional humano tem exercido uma forte pressão sobre o setor agropecuário; além disso, a migração dos trabalhadores rurais em direção aos centros urbanos tem agravado esse quadro. Nesse cenário, a genética tem se colocado como uma das ciências capazes de contribuir para o aumento da produção de alimentos (RAMALHO et al., 2001).

2.3.1. Métodos de melhoramento

Os métodos de melhoramento para uma determinada espécie animal sofrem variações em diferentes regiões. Essas mudanças se dão em função das diferentes características biológicas de cada animal e da disponibilidade tecnológica em cada localidade (LERNER; DONALD, 1969).

Independente do método utilizado, alguns princípios devem ser levados em consideração antes de se iniciar um programa de melhoramento:

- 1- Manutenção da variabilidade genética: possibilita ao criador exercer seu poder de seleção.
- 2- Planejamento dos objetivos: dependendo das metas estabelecidas, os resultados poderão ser obtidos a curto, médio e longo prazo e esse planejamento facilita em algumas decisões. O programa de melhoramento deve ter uma

estrutura flexível, podendo permitir ajustes de acordo com as mudanças do mercado consumidor.

3- Minimização de custos: o programa de melhoramento deve ser escolhido com base no menor custo/benefício por unidade ganha.

Dentre os diversos métodos de melhoramento merecem destaque: (i) seleção massal ou individual, onde a escolha dos genitores é baseada apenas em características fenotípicas; (ii) método genealógico ou *pedigree* que tem seu princípio fundamentado na progênie segregante sendo, portanto, essa seleção baseada no genótipo; (iii) seleção recorrente, que é um sistema com intuito de elevar a frequência de alelos desejáveis para uma dada característica quantitativa através de diversos ciclos repetitivos de cruzamento, tentando minimizar a redução da variabilidade genética da população e (iv) métodos de retrocruzamento que geralmente são utilizados para a transferência de características com alta herdabilidade controladas por um ou poucos genes e envolve uma série de cruzamentos da progênie de duas linhagens selecionadas com um dos progenitores (BORÉM, 1997).

Segundo Doyle (2002), a seleção massal tem sido o método de melhoramento mais utilizado na aquicultura devido à sua simplicidade, apesar de nem sempre apresentar resultados satisfatórios. De Donato et al. (2005), trabalhando com camarão *L. vannamei*, utilizaram seleção massal para realizar o melhoramento genético dessa espécie, obtendo ao final de 11 gerações, elevação nos índices zootécnicos.

2.3.2. Melhoramento genético do camarão de cultivo

O cultivo do *L. vannamei* tem sido amplamente difundido nos países do ocidente. Por meio da seleção de genótipos com melhores índices de crescimento e maior resistência às doenças, os produtores têm se beneficiado, obtendo ao final, matrizes com elevada eficiência de produção (CEDEÑO, 1998). A menor dependência de linhagens selvagens e maior utilização de animais selecionados têm contribuído para a sustentabilidade da atividade.

De acordo com Preston e Clifford (2002), atualmente, as prioridades das fazendas que realizam melhoramento genético em peneídeos são: desenvolver linhagens de camarão resistentes aos vírus de maior incidência nos camarões; prevenir a introdução de patógenos de animais domésticos; aumentar o número de linhagens domesticadas; melhorar o crescimento e a uniformidade dos camarões; pesquisar parâmetros ideais para seleção; analisar a variabilidade genética mediante marcadores moleculares e desenvolver linhagens selecionadas de camarão resistentes a condições ambientais extremas (baixa salinidade, renovação de água zero, entre outros).

2.3.3. Seleção de genitores

A escolha correta dos reprodutores é uma etapa bastante importante no processo de produção de pós-larvas, sendo que a escolha inapropriada desses animais pode se tornar um fator crítico e limitante para o sucesso desse processo, além de acarretar uma imensa perda de tempo em um programa de melhoramento genético (LERNER; DONALD, 1969).

Na seleção dos reprodutores em camarão, é muito importante realizar uma triagem inicial em relação aos patógenos. Outro fator relevante é a diversidade genética da população fundadora, em que a utilização de uma pequena parte desta pode ocasionar efeitos indesejáveis, como aumento do risco de depressão endogâmica, além de limitar as opções de reprodução seletiva (SHIKANO et al., 2001).

Dois principais critérios são utilizados para a escolha dos genitores: (i) comportamento *per se*, onde se acredita que o cruzamento entre dois bons fenótipos resulta em um desempenho bom da progênie e (ii) histórico do genitor, que enfatiza a importância da capacidade de combinação entre dois genitores, gerando uma prole com desempenho elevado (BORÉM, 1997). A seleção *per se* de genitores é relativamente eficiente para características de alta herdabilidade e atualmente muito utilizada, visando elevar a taxa de crescimento em espécies aquáticas (CEDEÑO et al., 1998).

Para realizar a seleção de genitores em um lote com camarões da mesma idade, deve-se levar em consideração algumas características morfológicas tais como tamanho do animal, integridade das antenas e ampolas espermáticas. O hepatopâncreas deve apresentar coloração característica, a musculatura abdominal deve ser translúcida e os olhos limpos de manchas (BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2001).

Em algumas fazendas onde é realizado o melhoramento genético, uma pequena parte dos animais que chegam aos viveiros de engorda é levada para a fase de avaliação durante 90 dias e os que possuem melhores desempenhos são aclimatados em um fotoperíodo invertido para alcançarem a maturação. Machos e fêmeas são colocados em tanques de maturação onde vão ocorrer a desova e a reprodução. Um importante processo para a aceleração da fase de maturação na fêmea é a ablação, que consiste na retirada do pendúculo ocular, o que terá influência direta na maturação das glândulas sexuais (FRANCISCO, 2003). Algumas horas após a desova, os náuplios eclodem e são transportados para o setor de larvicultura onde são postos em berçários passando pelas fases de zoea, misis e pós-larvas e então os animais são enviados aos tanques de engorda onde permanecem por aproximadamente 90 dias até atingirem o peso ideal para a comercialização (ARANA, 1999).

2.4. Marcadores moleculares

2.4.1. Marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

O advento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) nos anos 80 proporcionou um espetacular avanço da biologia molecular no tocante ao conhecimento de diversos processos biológicos, levando ao desenvolvimento de técnicas mais eficazes no diagnóstico médico, na inferência sobre estrutura genética populacional e no melhoramento genético de espécies de plantas e animais. Contudo, para a amplificação dos fragmentos de regiões específicas do genoma é

necessário um conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a região de interesse, sendo essa a principal limitação dessa tecnologia. Visando solucionar essa questão, grupos de pesquisa, simultânea e independentemente, desenvolveram uma metodologia baseada na utilização de *primers* curtos com seqüência arbitrária para dirigir a reação de PCR, eliminando assim, a necessidade do conhecimento prévio da seqüência alvo. Essa metodologia foi denominada por Welsh e McClland (1990) como AP-PCR (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*), uma vez que utilizava *primers* de seqüência arbitrária como iniciadores da amplificação em locais específicos do genoma estudado. O grupo do Williams et al. (1990), denominou essa mesma técnica como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), sendo este o termo mais conhecido para designar essa metodologia entre a comunidade científica.

Os marcadores RAPD podem ser empregados na obtenção de *fingerprints*, ou seja, caracterização genômica de indivíduos, variedades e populações, tanto animais, quanto vegetais; análise da diversidade em populações naturais e de melhoramento; construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e localização de genes de interesse econômico (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Por estarem dispersos por todo o genoma, os marcadores RAPD garantem uma ampla amostragem genética do organismo a ser estudado (WILLIAMS et al., 1990). O fato de basearem-se na técnica da PCR confere aos marcadores RAPD uma série de vantagens em relação a outros tipos de marcadores tais como: i) rapidez na obtenção de dados genéticos da espécie a ser estudada, uma vez que não há necessidade da utilização de sondas e conhecimento de informações sobre o genoma de interesse; ii) menor custo em função da visualização direta dos fragmentos amplificados em gel, dispensando etapas como a autoradiografia; iii) boa confiabilidade, uma vez que já foi demonstrada a reprodutibilidade da técnica entre diferentes laboratórios (SKOV, 1998; OLIVEIRA, 2005) e iv) necessidade de baixa quantidade de DNA inicial (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informações genéticas em função do seu comportamento dominante, além de questionamentos sobre sua reprodutibilidade (KARP et al., 1996).

2.4.2. Marcadores microssatélites

No começo dos anos 80, pesquisadores detectaram a existência de uma classe de seqüências repetitivas distribuídas aleatoriamente ao longo de todo o genoma dos organismos eucariotos. Essas seqüências compostas de 1 a 6 pares de bases repetidas em tandem, foram denominadas por Litt e Luty (1989) como microssatélites. Ao longo do tempo termos tais como SSR (*Simple Sequence Repeats*), STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites*), STR (*Simple Tandem Repeats*) e SSRP (*Simple Sequence Repeat Polymorphisms*) também foram empregados para descrever essa classe de repetições (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores microssatélites podem ser classificados como perfeitos, imperfeitos e complexos, de acordo com o tipo de seqüência repetitiva (WEBER, 1990). Esses marcadores também podem ser utilizados para acessar variabilidade genética em populações naturais ou cativas, em estudos de mapeamento genético de múltiplas espécies e identificação e discriminação de genótipos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As vantagens encontradas nessa classe de marcadores em relação às outras são: i) comportamento codominante, podendo-se distinguir os indivíduos heterozigotos em uma população; ii) alto grau de informação de polimorfismo (PIC) por loco gênico; iii) distribuição aleatória por todo o genoma podendo estar associado a regiões expressas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FREITAS, 2005a; PÉREZ et al, 2005); iv) alta conservação entre espécies relacionadas, que tem permitido a transferência destes marcadores entre espécies utilizando *primers* heterólogos (XU et al., 1999).

Estudos sobre relações genéticas utilizando microssatélites têm fornecido informações úteis sobre a evolução, desenvolvimento do conjunto gênico e magnitude da diferenciação genética de raças animais (MATEUS et al., 2004). As maiores limitações quanto à utilização de tais marcadores estão relacionadas aos custos para o seu desenvolvimento. Para a obtenção de *primers* adequados, são necessários passos de caracterização de diferentes “motivos” que se repetem ao longo do genoma, construção de bibliotecas, seqüenciamento do DNA e triagem

dos *primers* construídos, visando identificar locos mais informativos. O conhecimento aprofundado sobre biologia molecular, a disponibilidade de equipamentos e suplementos sofisticados são também limitantes para o desenvolvimento destes marcadores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

2.5. Estudos de variabilidade genética em peneídeos

A utilização de diversos marcadores moleculares para realizar inferências sobre a estrutura genética populacional em estoques de camarão tem promovido uma revolução na carcinocultura moderna (GARCIA; ALCIVAR-WARREN, 1996). A identificação de marcadores genéticos estáveis, além de estimar os níveis de variação, pode auxiliar o melhoramento genético por meio do rastreamento de animais com características geneticamente superiores (BEUZEN et al., 2000).

A perda de variabilidade genética tem se tornado um dos maiores entraves em programas de melhoramento genético animal e isto se deve ao surgimento de problemas como a redução da performance e do crescimento dos animais e aumento à susceptibilidade a doenças causadas por patógenos virais, bacterianos e fúngicos (POVH et al., 2005; CRUZ et al., 2004; WOLFUS et al., 1997). Fatores ambientais também causam um enorme efeito em populações com elevados níveis de melhoramento, em função da perda de adaptação a diferentes condições do meio (CEDEÑO, 1998).

A análise enzimática por meio da visualização dos diferentes padrões de migração de isoenzimas após eletroforese em linhagens de *M. japonicus* mostrou uma relação entre a perda da variabilidade genética e a redução do tamanho médio dos camarões (SBORDONI et al, 1986). Contudo, alguns pesquisadores consideram que a utilização de marcadores enzimáticos tem falhado na busca por polimorfismo na maioria das espécies de peneídeos, sendo os marcadores moleculares de DNA os mais recomendados para rastreamento de diferenças genéticas, tanto em populações naturais, quanto cativas (CRUZ et al., 2002).

Diversos estudos com peneídeos vêm utilizando marcadores moleculares com o objetivo de monitorar a variabilidade genética desses camarões.

No *L. vannamei*, uma avaliação da diversidade genética entre e dentro de duas linhagens, realizada por meio de marcadores fAFLP (*fluorescence amplified fragment length polymorphism*), indicou a existência de uma elevada homogeneidade genética entre as linhagens estudadas (GONÇALVES et al., 2005). A utilização de marcadores VNTR (*variable number of tandem repeats*) nessa mesma espécie de camarão foi capaz de demonstrar a existência de uma elevada similaridade genética de um plantel de origem venezuelana (F₁₇) em relação a outro de origem panamenha (F₃) (FREITAS; GALETTI, 2002). Freitas (2003), também analisando a similaridade genética de cinco linhagens endocruzadas de *L. vannamei* utilizando marcadores RAPD, verificou que ao longo de gerações nascidas em cativeiros, o valor médio de similaridade tendeu a elevar-se, podendo, portanto, atingir números próximos a um antes de chegar na 19ª geração. Estudos baseados no seqüenciamento dos genes citocromo oxidase (COI) e RNAr 16S de DNA mitocondrial, visando o estabelecimento de relações genéticas em cinco linhagens de reprodutores de *L. vannamei* indicaram a existência de uma baixa distância genética entre esses animais (FRANCISCO; GALETTI, 2005). Já em trabalhos com a linhagem *specific pathogen free* (SPF) em populações de camarões dessa mesma espécie, os níveis de crescimento e suscetibilidade a doenças mostraram uma aparente correlação com baixos níveis de variação genética observados por microssatélites (WOLFUS et al., 1997).

Em *Penaeus monodon*, análises com RAPD indicaram a presença de populações geneticamente diferenciadas em duas das principais regiões pesqueiras da Tailândia (TASSANAKAJON et al., 1997). Também em populações dessa espécie e na mesma região, o estudo de polimorfismos do DNAm por meio de PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) associado a dados de marcadores RAPD, foi capaz de mostrar o nível de heterogeneidade genética entre animais (KLINBUNGA et al., 2001). Trabalhos com populações de *P. monodon* no oeste da Austrália utilizando três locos microssatélites mostraram uma forte diferenciação genética entre estas por meio das estatísticas F_{ST} (BROOKER et al., 2000). Utilizando também marcadores microssatélites, foi realizada uma análise de variabilidade genética de populações naturais de *L. schmitti* no Brasil, onde foi encontrada uma elevada diversidade genética entre os animais de oito regiões diferentes (MAGGIONI et al., 2003).

Pesquisas com o *Litopenaeus stylirostris* conhecido como camarão azul do Pacífico mostraram, por meio de marcadores RAPD, a ocorrência da estruturação de populações naturais do golfo da Califórnia no México, situadas a distâncias relativamente curtas (AUBERT; LIGHTNER, 2000), contrastando com a maioria das espécies de peneídeos que na natureza não apresentam estruturação e são panmíticas (LESTER; PANTE, 1992).

Os diversos trabalhos realizados com marcadores moleculares, em especial, RAPD e microssatélites, vêm mostrando a eficácia destes como excelentes ferramentas no estudo populacional de diversas espécies de peneídeos, auxiliando na conservação de recursos genéticos e no acompanhamento dos processos de renovação dos estoques. Assim, estes estudos vêm fortalecendo a expansão da carcinocultura, que é uma das atividades em maior crescimento no Brasil e no mundo (XU et al., 2001; BIERNE et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

As amostras utilizadas no presente estudo foram coletadas nas fazendas Ocean e Maricanes Maricultura, situadas na região de Canavieiras (Figura 5).

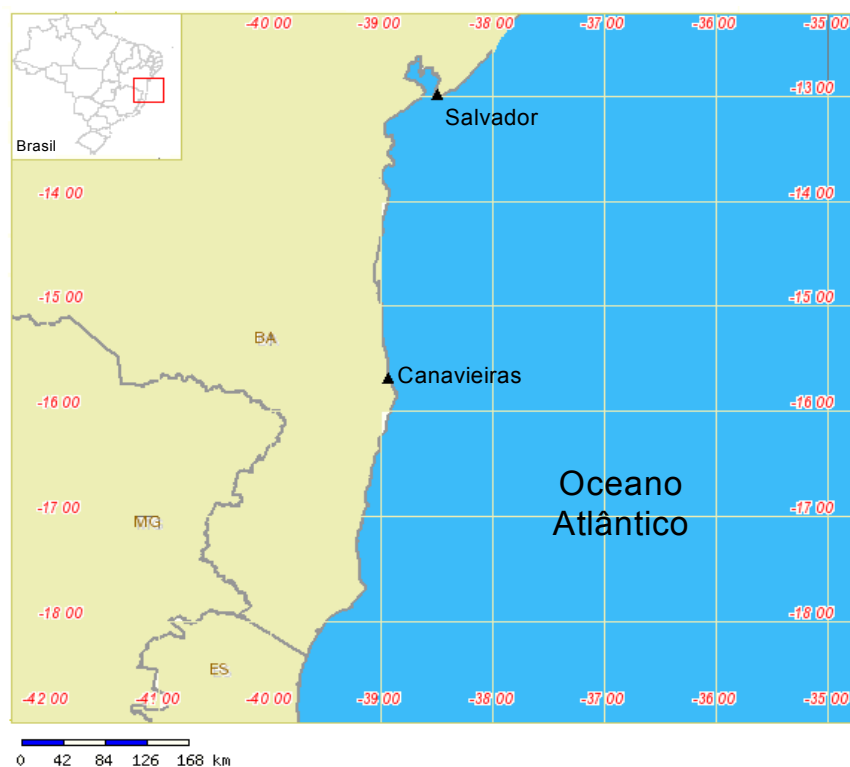


Figura 5. Mapa do sul da Bahia, destacando-se a da região de Canavieiras (BA).

Nessas propriedades que são exclusivamente de engorda, foi coletado um total de 96 animais de estoques comerciais das seguintes empresas fornecedoras de pós-larvas: Empresa KT ($N=32$), Empresa AL ($N=32$) e Empresa EB ($N=32$). As amostras da primeira empresa fornecedora de pós-larvas foram coletadas na fazenda Ocean, enquanto que as amostras das duas últimas foram coletadas na fazenda Maricanes Maricultura. Após a coleta, os animais foram transportados em caixas de isopor contendo gelo até o laboratório de Marcadores Moleculares da UESC, onde foram retiradas amostras de tecido muscular e guardadas em *freezer* a -20°C em tubos de 2,0mL contendo 700 μL de etanol absoluto.

3.2. Otimização do protocolo de extração de DNA total

Visando a obtenção de um melhor rendimento de DNA em termos de quantidade e qualidade, associado à menor manipulação de produtos tóxicos, foram testados os seguintes protocolos de extração:

3.2.1. Protocolo de Doyle e Doyle (1987) modificado:

Cerca de 200mg de tecido muscular foram macerados em um gral utilizando nitrogênio líquido. Posteriormente, o material macerado foi transferido para um tubo de 1,5mL ao qual foram adicionados 500 μL de solução de lise (Tris-HCl 1mol.L^{-1} pH8,0; EDTA $0,5\text{mol.L}^{-1}$ pH8,0; SDS 1,0%; NaCl 5mol.L^{-1} e H_2O MilliQ) e 50 μL de proteinase K (10mg/mL). Após homogeneização, o tubo foi transferido para o banho-maria a 65°C onde permaneceu *overnight*. Findado esse período, foram acrescentados ao tubo contendo amostra 350 μL de solução de CTAB (CTAB 2,0%; NaCl $1,4\text{mol.L}^{-1}$; EDTA 20mmol.L^{-1} ; Tris-Cl 100mmol.L^{-1} pH8,0; Polyvinylpyrrolidone 1,0% e 2-mercaptoetanol 0,2%) sendo levado novamente ao banho-maria a 65°C por 45 minutos. Ao final dessa etapa, o tubo foi retirado do banho-maria e deixado em cima da bancada por 5 minutos para resfriamento e em

seguida, adicionou-se 300µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Agitou-se a amostra por 5 minutos (invertendo-a cerca de 100 vezes) centrifugando em seguida durante 10 minutos a 12.000 rpm. A seguir, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo autoclavado e a este foram acrescentados 400µL de isopropanol gelado, sendo deixado então em *freezer* -20°C por 30 minutos. Após esse tempo, centrifugou-se a amostra a 10.000 rpm durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. O *pellet* formado foi então lavado com etanol 70% duas vezes e depois uma vez em etanol absoluto deixando-o imerso durante 5 minutos entre os períodos de centrifugação (10 minutos a 12.000 rpm). Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ficou secando *overnight* em temperatura ambiente. A resuspensão do *pellet* foi realizada em 50µL de TE (Tris-Cl 10mmol.L⁻¹ e EDTA 1mmol.L⁻¹) com RNase (10µg/mL) e incubado a 37°C durante 60 minutos. Ao final de todo o procedimento, a amostra foi estocada em *freezer* -20°C.

3.2.2. Protocolo de Aljanabi e Martinez (1997) modificado:

A amostra de tecido muscular (200mg) foi macerada em gral utilizando nitrogênio líquido, sendo transferida em seguida para um tubo de 2,0mL onde se adicionou 400µL de solução salina (NaCl 0,4mol.L⁻¹; Tris-HCl 10mmol.L⁻¹ pH8,0 e EDTA 0,2mmol.L⁻¹ pH8,0), 16µL de proteinase K (10mg/mL) e 80µL de SDS 10%. Após homogeneização, o tubo foi transferido para o banho-maria a 65°C permanecendo neste *overnight*. Findado esse período, adicionou-se ao tubo contendo a amostra 360µL de solução de NaCl 5mol.L⁻¹ agitando-o em seguida no vortex por 30 segundos. Logo após, o tubo foi centrifugado por 30 minutos a 10.000 rpm e então retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para um novo tubo autoclavado e a este, foi adicionado um volume igual de isopropanol, levando em seguida ao *freezer* -20°C onde ficou em repouso por 60 minutos. Após essa etapa, centrifugou-se a amostra por 20 min a 10.000 rpm e a seguir foi descartado o sobrenadante. O *pellet* formado foi lavado em etanol 70%, centrifugando em seguida por 5 min a 10.000 rpm. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e

o *pellet* ficou secando em temperatura ambiente *overnight*. A resuspensão do *pellet* foi realizada em 50 μ L de TE (Tris-Cl 10mmol.L⁻¹ e EDTA 1mmol.L⁻¹) com RNase (10 μ g/mL) e incubado a 37°C durante 60 minutos.

3.2.3. Protocolo de Walsh et al. (1991):

A mostra de tecido muscular (200mg) foi macerada em um gral utilizando nitrogênio líquido e transferida para um tubo de 1,5mL estéril. Acrescentou-se ao tubo 200 μ L de Chelex® e 20 μ L de proteinase K (10mg/mL) e incubou-se em banho-maria durante 4 horas. Em seguida, agitou-se a amostra em alta velocidade em um vortex por cerca de 10 segundos. O material foi levado para centrifugação por 20 segundos a 13.000 rpm e logo após ter selado os tubos com *parafilm*, estes foram colocados em água fervente durante 8 minutos. Depois dessa etapa, os tubos foram agitados em vortex por 10 segundos e centrifugados por 3 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi retirado para um novo tubo estéril e armazenado em *freezer* -20°C para posterior quantificação.

3.2.4. Protocolo de Sambrook et al. (1989) modificado:

Para a realização desse protocolo, cerca de 200mg de tecido muscular foram macerados em gral utilizando 500 μ L tampão de lise (Tris-HCl 1mol.L⁻¹ pH8,0; EDTA 0,5mol.L⁻¹ pH8,0; SDS 1,0%; NaCl 5mol.L⁻¹ e H₂O MilliQ) aquecido a 65°C. O material com textura pastosa foi então transferido para um tubo de 2,0mL e a este acrescentado mais 500 μ L de tampão de lise e imediatamente incubado em banho-maria, a 65°C durante 1 hora. Passado esse tempo, adicionou-se ao tubo 50 μ L de proteinase K (10mg/mL) e este permaneceu em incubação a 60°C por mais 3 horas. Em seguida, as amostras foram retiradas do banho-maria e resfriadas em temperatura ambiente para a adição de 700 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Homogeneizou-se as amostras por 30

minutos e em seguida centrifugou-se a 7.000 rpm por 15 minutos, transferindo o sobrenadante formado para um novo tubo estéril. A este novo tubo, adicionou-se 1mol.L^{-1} de NaCl e $700\mu\text{L}$ de etanol absoluto homogeneizando-o por alguns minutos e levando-o ao *freezer* -20°C durante 1 hora. Ao final desse tempo, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 10.000 rpm descartando em seguida o sobrenadante. O *pellet* foi lavado duas vezes em etanol 70% e mais uma vez em etanol absoluto deixando este imerso durante cinco minutos entre as lavagens. O material foi centrifugado durante 10 minutos a 10000 rpm entre cada lavagem. Ao final da última lavagem, foi descartado o sobrenadante e o *pellet* ficou secando em temperatura ambiente *overnight*. A resuspensão do *pellet* foi realizada em $50\mu\text{L}$ de TE (Tris-Cl 10mmol.L^{-1} e EDTA 1mmol.L^{-1}) com RNase ($10\mu\text{g/mL}$) e incubado a 37°C durante 60 minutos. Ao final do processo, o tubo contendo a amostra foi estocado a -20°C para posterior quantificação.

3.3. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio ($2,5 \times 10^{-4}\text{mg/mL}$). Em cada poço do gel foi colocado $2\mu\text{L}$ de amostra de DNA, $5\mu\text{L}$ de H_2O MilliQ e $2\mu\text{L}$ de tampão de corrida (sacarose $1,6\text{mol.L}^{-1}$ e azul de bromofenol $1,6\text{mmol.L}^{-1}$ e H_2O MilliQ). A visualização e quantificação propriamente dita foi realizada por meio do sistema de fotodocumentação EDAS 290 da Kodak utilizando como padrão DNA de fago λ nas concentrações de 50, 100 e $200\text{ng}/\mu\text{L}$.

3.4. Marcadores RAPD

3.4.1. Padronização das condições de amplificação

A amplificação do material genético via RAPD foi realizada em termociclador GeneAmp®PCR System 9700 (PerkinElmer) com um volume final de reação de 13,0µL composta por: 1,30 µL de tampão 10X (Tris 1mol.L⁻¹ pH8,3; MgCl₂ 1mol.L⁻¹, KCl 50 mmol.L⁻¹), 1,04 µL de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à 2,5mmol.L⁻¹, 1,04 µL de BSA (albumina bovina) à 2,5mg/mL, 3,00 µL de *primer* decâmero RAPD à 5,0ng/µL, 3,42 de H₂O miliQ, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL) e 3,0µL de DNA genômico (1,25ng/µL). O programa de reação no termociclador foi constituído por 4 min a 94°C para desnaturação da dupla fita de DNA, seguido de 45 ciclos de 1 minuto à 92°C; 1,5 minuto à 37°C e 2 minutos à 72°C. A extensão final foi feita à 72°C durante 3 minutos. Cerca de 50 µL de óleo mineral foi colocado na reação evitando assim a evaporação e redução do volume final da mesma. Ao produto de amplificação foi colocado 3µL de tampão de corrida (sacarose 1,6mol.L⁻¹ e azul de bromofenol 1,6mmol.L⁻¹ e H₂O MilliQ) e então levado a eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio (2,5x10⁻⁴mg/mL). A corrida eletroforética durou em média 4 horas a 120 volts numa cuba horizontal contendo tampão TBE 1X (Tris-base 8,9 mmol.L⁻¹, ácido bórico 88 mmol.L⁻¹, EDTA 10mmol.L⁻¹), e em seguida o gel foi visualizado em luz UV usando o sistema de fotodocumentação EDAS 290 da Kodak.

3.4.2. Seleção de *primers*

Foram testados 39 *primers* RAPD utilizados previamente em estudos com essa espécie (FREITAS, 2005b), dos quais alguns foram selecionados utilizando-se como critério de escolha a quantidade e a qualidade de bandas polimórficas apresentadas (Tabela 2).

Tabela 2. *Primers* RAPD testados para *L. vannamei*

Primer	Seqüência 5' - 3'
OPA02*	TGCCGAGCTG
OPA03*	AGTCAGCCAC
OPA04*	AATCGGGCTG
OPA05	AGGGGTCTTG
OPA06	GGTCCCTGAC
OPA07*	GAAACGGGTG
OPA08	GTGACGTAGG
OPA09*	GGGTAACGCC
OPA10*	GTGATCGCAG
OPA12	TCGGCGATAG
OPA13	CAGCACCCAC
OPA14*	TCTGTGCTCG
OPA15	TTCCGAACCC
OPA16	AGCCAGCGAA
OPA17	GACCGCTTGT
OPA18*	AGGTGACCGT
OPA19	CAAACGTCCC
OPA20*	GTTGCGATCC
OPP01*	GTAGCACTCC
OPP02	TCGGCACGCA
OPP03	CTGATACGCC
OPP04	GTGTCTCAGG
OPP05*	CCCCGGTAAC
OPP06	GTGGGCTGAC
OPP07	GTCCATGCCA
OPP08*	ACATCGCCCA
OPP09*	GTGGTCCGCA
OPP10	TCCCGCCTAC

Primer	Seqüência 5' - 3'
OPP11*	AACGCGTCGG
OPP12	AAGGGCGAGT
OPP13*	GGAGTGCCTC
OPP14*	CCAGCCGAAC
OPP15	GGAAGCCAAC
OPP16*	CCAAGCTGCC
OPP17*	TGACCCGCCT
OPP18	GGCTTGGCCT
OPP19*	GGGAAGGACA
OPP20	GACCCTAGTC

(*) *Primers* que apresentaram bandas polimórficas utilizadas para a análise genética do *L. vannamei*.

3.4.3. Análise dos dados

O tamanho das bandas amplificadas foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas) e matrizes binárias foram construídas de acordo com a presença de fragmento amplificado representado por “1”, ou ausência de fragmento amplificado representado por “0” para cada indivíduo. Os dados obtidos com os marcadores RAPD foram analisados por diferentes metodologias utilizando os programas TFPGA v1.3 (MILLER, 1997), AMOVA v1.5 (EXCOFFIER et al., 1992) e HICKORY v1.0.4 (HOLSINGER et al., 2002), avaliando-se assim, a estrutura genética desses estoques.

O TFPGA é um programa que faz análises de estrutura genética populacional utilizando dados oriundos tanto de marcadores codominantes, quanto dominantes. Porém, quando usado com esse último tipo de marcador, assume equilíbrio Hardy-Weinberg nas populações ($f=0$) para calcular as freqüências alélicas (MILLER, 1997). O AMOVA, por sua vez, é um programa que utiliza uma distância Euclideana para descrever distâncias entre haplótipos em uma análise molecular de variância, fornecendo assim, uma estatística denominada Φ_{ST}

(EXCOFFIER et al., 1992), análoga ao F_{ST} de Wright (1951). Um novo método, alternativo aos já conhecidos, baseado em estatística Bayesiana, foi também testado através do programa HICKORY versão 1.0.4 (HOLSINGER et al., 2002). Esse aplicativo não assume nenhum conhecimento a respeito do grau de endogamia intrapopulacional e dessa forma não se submete, em teoria, aos problemas analíticos encontrados nos métodos tradicionais utilizados para analisar dados obtidos com marcadores dominantes.

As análises de diversidade genética foram feitas através de comparações do coeficiente de similaridade de Jaccard (S_j) que foram estimados com o auxílio do programa computacional Past (HAMMER et al., 2001) e um dendrograma foi construído com a opção *cluster analysis*, com base no método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic averages*). A consistência entre os valores da matriz de similaridade e o dendrograma gerado foi avaliada pelo coeficiente de correlação cofenética de Mantel, obtido através do programa NTSYS v1.7 (ROHLF, 1992).

3.4.4. Número mínimo de marcadores para estimativas de Φ_{ST}

Visando estabelecer um número mínimo de marcadores dominantes estatisticamente capazes de permitir inferências sobre a estrutura populacional dessa espécie, foram realizadas estimativas de Φ_{ST} utilizando quantidades de marcadores RAPD que variaram de 3 a 59. Os dados obtidos nesse trabalho foram reamostrados em um procedimento denominado de *bootstrap* (TELLES et al., 2001). Para a realização de tal procedimento, foram reamostrados consecutivamente, com reposição, diferentes números de locos RAPD (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57 e 59) a partir das matrizes binárias. Em seguida, foram recalculados os valores de Φ_{ST} para cada conjunto de dados utilizando o programa AMOVA v1.5 (EXCOFFIER et al., 1992). Um gráfico de linhas foi desenhado para a melhor observação do comportamento dessas estimativas de Φ_{ST} de acordo com o número de locos utilizados.

Para verificar a dispersão dos valores de Φ_{ST} em relação à média, foi feito o cálculo do coeficiente de variação (CV) (TRIOLA, 2005) de acordo com a quantidade de marcadores analisados utilizando a seguinte equação:

$$CV = \frac{\delta}{\bar{x}}$$

Onde;

δ = desvio padrão dos valores de Φ_{ST}

\bar{x} = média aritmética dos valores de Φ_{ST}

3.5. Marcadores microssatélites

3.5.1. Seleção de *primers*

Seis *primers* microssatélites desenvolvidos para *L. vannamei* foram utilizados nesse estudo, sendo eles: Pvan0013, Pvan0040, Pvan1003, Pvan1758, Pvan1851 e MIR-B202FB. Destes, os cinco primeiros foram descritos por Cruz et al. (2002) e o último relatado por Wolfus et al. (1997).

3.5.2. Condições de amplificação (Reação de PCR)

Para a amplificação via PCR dos locos microssatélites, utilizou-se reações com volume final de 25 μ L compostas por diferentes concentrações de reagentes, segundo descrito em literatura para os diferentes tipos de *primers* (CRUZ et al., 2002; WOLFUS et al., 1997), conforme mostrado a seguir:

- *Primers* Pvan0013, Pvan0040, Pvan1003, Pvan1758 e Pvan1851- composição da reação: 2,5 µL de tampão 10X (Tris 1mol.L⁻¹ pH8,3; MgCl₂ 1mol.L⁻¹, KCl 50 mmol.L⁻¹); 2,5 µL de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à 2,5mmol.L⁻¹; 2,5µL de BSA (albumina bovina) à 2,5mg/mL; 1,5µL de MgCl₂ (25mmol.L⁻¹); 8,3µL de *primer* SSR (0,9µmol.L⁻¹); 2,5µL de H₂O MilliQ; 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5u/µL) e 5,0µL de DNA genômico (10ng/µL).
- *Primer* MIR-B202FB- composição da reação: 2,5 µL de tampão 10X (Tris 1mol.L⁻¹ pH8,3; MgCl₂ 1mol.L⁻¹, KCl 50 mmol.L⁻¹); 2,5 µL de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à 2,5mmol.L⁻¹; 2,2µL de BSA (albumina bovina) à 2,5mg/mL; 2,0µL de MgCl₂ (25mmol.L⁻¹); 10,3µL de *primer* SSR (0,9µmol.L⁻¹); 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5u/µL) e 5,0µL de DNA genômico (10ng/µL).

3.5.3. Programas de amplificação no termociclador

Dois tipos de ciclo de amplificação de microssatélites foram utilizados de acordo com a descrição a seguir:

- *Primers* Pvan0013, Pvan0040, Pvan1003, Pvan1758 e Pvan1851: 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min à temperatura de anelamento específica de cada *primer*, 1 min a 72°C e extensão final de 5 min a 72°C.
- *Primer* MIR-B202FB: 3 min a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min à temperatura de anelamento específica desse *primer*, 2 min a 72°C e extensão final de 5 min a 72°C.

3.5.4. Estabelecimento da temperatura de anelamento

Quanto à temperatura de anelamento (T_a) ideal, uma série de experimentos foi realizada para o ajuste da melhor temperatura para cada par de *primers*, adequando-se, dessa forma, as reações de amplificação de acordo com as condições desse trabalho. Uma PCR foi realizada utilizando um gradiente de temperatura de anelamento para cada *primer* conforme esquema abaixo.

* *Primers* Pvan 0013, Pvan 1758 e Pvan 1851

Temperatura de anelamento (T_a) descrita (CRUZ et al., 2002): 55°C

Gradiente de temperatura de anelamento (T_a) testado:

Reação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T_a (°C)	55	55,2	55,7	56,6	57,8	59,1	60,5	61,8	63,1	64,2	65,0	65,5

* *Primer* Pvan 0040

Temperatura de anelamento (T_a) descrita (CRUZ et al., 2002): 45°C

Gradiente de temperatura de anelamento (T_a) testado:

Reação	1	2	3	4	5	6
T_a (°C)	45,0	45,7	46,6	47,7	49,0	53,0

* *Primer* Pvan 1003

Temperatura de anelamento (T_a) descrita (CRUZ et al., 2002): 56°C

Gradiente de temperatura de anelamento (T_a) testado:

Reação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T_a (°C)	55	55,2	55,7	56,6	57,8	59,1	60,5	61,8	63,1	64,2	65,0	65,5

* *Primer* MIR-B202FB

Temperatura de anelamento (T_a) descrita (WOLFUS et al., 1997): 52°C

Gradiente de temperatura de anelamento (T_a) testado:

Reação	1	2	3	4	5	6
T_a (°C)	52,0	52,7	53,6	54,7	56,0	57,4

Após a PCR, os produtos de amplificação foram visualizados em gel de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata (0,02%) em luz branca e fotodocumentados utilizando o sistema EDAS 290 da Kodak.

Estabelecida a temperatura de anelamento ideal para cada *primer* baseando-se na ausência de bandas inespecíficas e intensidade da banda microssatélite, as amostras dos três estoques comerciais a serem estudados foram amplificadas no termociclador GeneAmp®PCR System 9700 (PerkinElmer).

3.5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida 4%

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi precedida por uma pré-corrída do gel em cuba vertical contendo tampão TBE 1X (Tris-base 8,9 mmol.L⁻¹, ácido bórico 88 mmol.L⁻¹, EDTA 10 mmol.L⁻¹) durante 45 minutos a uma potência de 45 Watts (W), alcançando ao final uma temperatura de 50°C. Alguns minutos antes do término da pré-corrída, foi adicionado em cada poço da placa de PCR 5µL de tampão de carregamento para SSR (Ficcol Sign tipo 400, azul de bromofenol e xileno cianol) e as amostras (inclusive o marcador de peso molecular 10pb) foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos antes do carregamento no gel. Foi aplicado em cada poço do gel 4µL do produto de amplificação e de 5µL do marcador de peso molecular 10pb (invitrogen) nas extremidades do gel. A corrida

eletroforética durou cerca de 90 minutos, a 45 W. Após esse período, o gel foi corado em nitrato de prata.

Para a realização da coloração do gel em prata, foi seguido o protocolo de Creste et al., 2001 (ANEXO A). Após a coloração foi feita a fotodocumentação com o sistema EDAS 290 da Kodak em luz branca.

3.5.6. Análise dos dados

Os alelos foram discriminados através de observação direta no gel e as estimativas relacionadas à genética descritiva tais como: heterozigosidade observada (H_o), diversidade gênica ou heterozigosidade esperada (H_E), número de alelos por loco (N_A) e número total de alelos foram estimados utilizando o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001). O método mais difundido e utilizado para a descrição hierárquica de dados genéticos oriundos de múltiplas populações tem sido as estatísticas F descritas por Wright (1951). Segundo essas estatísticas, a endogamia total de uma população é composta por: i) endogamia intrapopulacional (F_{IS}), causada pelo cruzamento entre indivíduos consangüíneos e ii) endogamia interpopulacional (F_{ST}), provocada pela estruturação das populações. As estimativas F_{ST} são comumente usadas em análises interpopulacionais para a avaliação de estruturação e fluxo gênico (GAIOTTO et al., 2003; PEARSE; CRANDALL, 2004), enquanto que as estatísticas F_{IS} são empregadas para a análise de sistemas de cruzamento e nível de acasalamento dentro de populações (GAIOTTO et al., 2003).

O valor da diversidade gênica máxima ($H_{E_{Máx}}$) possível para cada marcador foi calculado de acordo com o número de alelos apresentados pelos mesmos (WEIR, 1996) conforme a seguinte equação:

$$H_{E_{Máx}} = \frac{N_A - 1}{N_A}$$

Onde;

N_A = Número de alelos

4. RESULTADOS

4.1. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Dentre os diversos protocolos de extração utilizados visando um maior rendimento em quantidade e melhor qualidade de DNA, a metodologia descrita por Sambrook et al. (1989) foi a única capaz de fornecer material genético em quantidade adequada para esse estudo. Entretanto, o DNA extraído por este protocolo apresentou-se altamente degradado, podendo interferir negativamente na amplificação via PCR e subseqüentes análises de variabilidade genética (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Para tentar solucionar esse problema, foram realizadas algumas modificações no protocolo de extração descrito por Sambrook et al. (1989), sendo as principais descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Principais modificações do protocolo de Sambrook et al. (1989)

ETAPA DO PROTOCOLO ORIGINAL	MODIFICAÇÃO	RESULTADO ESPERADO
Maceração do tecido em N ₂ líquido	Maceração do tecido diretamente no tampão de extração a 65°C	Menor degradação do DNA
Permanência do material em etanol absoluto gelado por alguns minutos	Permanência do material em etanol gelado absoluto durante 2 horas	Precipitação de maior quantidade de DNA
Única lavagem em etanol 70%	Duas lavagens em etanol 70% e uma lavagem em etanol absoluto	Menor quantidade final de resíduos

Após a implementação das modificações supracitadas no protocolo de extração, obteve-se DNA em quantidade e qualidade satisfatória para realização das reações de PCR e posteriores análises genéticas, conforme mostrado na Figura 6.

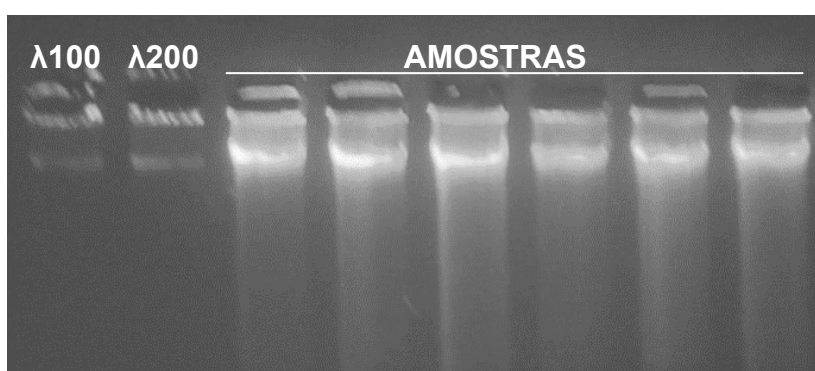


Figura 6. Padrão eletroforético do DNA genômico extraído pelo protocolo de Sambrook et al. (1989) modificado. λ100 e λ200 correspondem a 100 e 200ng de DNA do fago Lambda. As amostras correspondem a 2μL do material obtido ao final da extração.

4.2. Seleção de *primers* RAPD

Dos 39 *primers* RAPD testados, um total de 20 foram selecionados (Tabela 4). O número de bandas polimórficas variou segundo cada *primer*, sendo que o OPA09 teve o maior número de locos analisados (cinco) e os *primers* OPP01, OPP17 e OPP19 apresentaram apenas uma banda polimórfica. Ao final, obteve-se um total de 59 marcadores polimórficos para as análises (2,95 bandas/*primer* em média).

Quanto ao tamanho dos fragmentos, estes apresentaram uma ampla variação, desde 150 a 2100 pares de bases. A Figura 7 mostra o padrão de fragmentos amplificados via PCR de 32 indivíduos de um estoque comercial de *L. vannamei* utilizando o *primer* RAPD OPA10.

Tabela 4. Caracterização dos *primers* RAPD utilizados em estoques comerciais de *L. vannamei* na região de Canavieiras

Primer	Seqüência	n° de marcadores polimórficos	Amplitude de tamanho dos fragmentos (pb)
OPA02	TGCCGAGCTG	2	150-600
OPA03	AGTCAGCCAC	2	650-800
OPA04	AATCGGGCTG	4	200-1050
OPA07	GAAACGGGTG	3	450-1600
OPA09	GGGTAACGCC	5	320-1600
OPA10	GTGATCGCAG	3	350-750
OPA11	CAATCGCCGT	5	450-1100
OPA14	TCTGTGCTCG	2	750-850
OPA18	AGGTGACCGT	3	550-750
OPA20	GTTGCGATCC	4	600-2100
OPP01	GTAGCACTCC	1	600
OPP05	CCCCGGTAAC	4	400-1050
OPP08	ACATCGCCCA	4	750-900
OPP09	GTGGTCCGCA	4	650-1750

Continua...

<i>Primer</i>	Seqüência	n° de marcadores polimórficos	Tamanho dos fragmentos (pb)
OPP11	AACGCGTCGG	3	450-1400
OPP13	GGAGTGCCTC	3	650-950
OPP14	CCAGCCGAAC	3	750-1100
OPP16	CCAAGCTGCC	2	1300-1400
OPP17	TGACCCGCCT	1	1200
OPP19	GGGAAGGACA	1	300

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

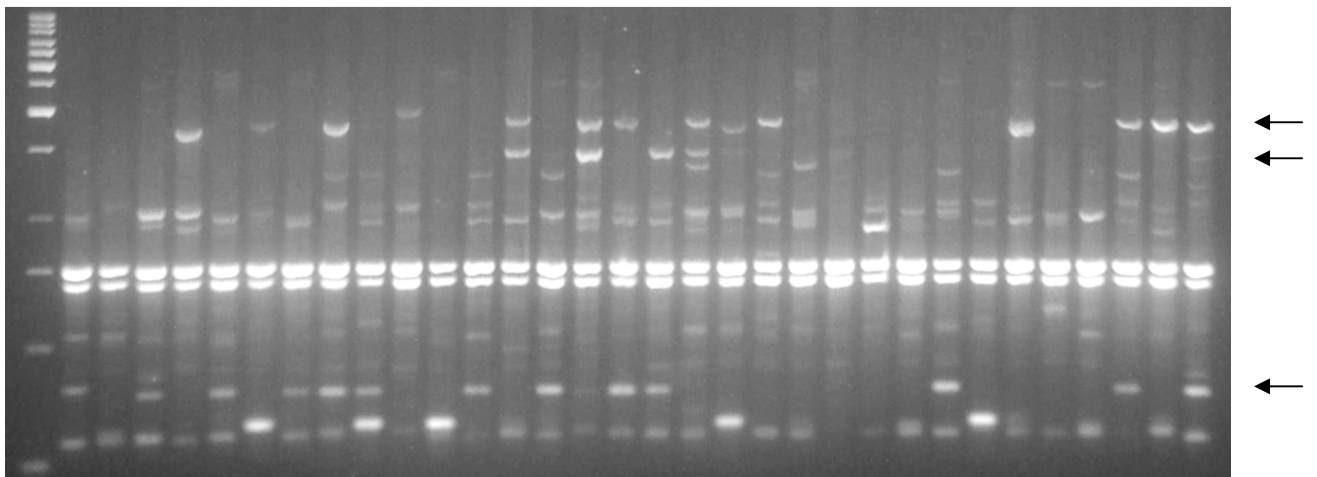


Figura 7. Padrão de bandas RAPD amplificados a partir de 32 indivíduos de um estoque comercial de *L. vannamei* utilizando o *primer* OPA10. M- Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas). Colunas 1 a 32- Amostras. As setas indicam algumas bandas analisadas.

4.3. Diversidade genética e agrupamentos com base nos marcadores RAPD

4.3.1. Diversidade genética

Observando os dados gerados pelo AMOVA (Tabela 5), percebe-se que a variabilidade genética entre os estoques comerciais foi de 18,61% e a variação genética dentro dos estoques foi de 81,39%. O valor de Φ_{ST} estimado entre os estoques (0,186) propõe a existência de uma relativa taxa de endogamia entre estes. O TFPGA apresentou um índice de endogamia interpopulacional (F_{ST}) igual a 0,181, evidenciando também um considerável nível de endogamia entre os estoques causado por estruturação, o que vem corroborar com o AMOVA, embora esse último método não forneça a taxa de endogamia intrapopulacional (F_{IS}). O valor de θ^b , um estimador análogo ao F_{ST} , obtido com o programa HICKORY foi de 0,0026 contrastando com os resultados gerados pelas duas outras metodologias, enquanto o índice de endogamia intrapopulacional (f) obtido com o mesmo programa foi de 0,7292.

Tabela 5. Resultado da Análise Molecular de Variância (AMOVA) baseada em três estoques comerciais de *L. vannamei* na região de Canavieiras (BA)

Fontes de variação	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Porcentagem de variação	<i>P</i>	Estatísticas Φ_{ST}
Entre as populações	2	151,3542	18,61%	<0.0001	0,186
Dentro das populações	93	846,4063	81,39%	<0.0001	0,814
Total	95	997,7604	100%	-----	1,0

4.3.2. Agrupamento

Observando a Figura 8, percebe-se a separação de um grupo distinto composto por 29 indivíduos oriundos do estoque comercial EB e outro grupo mais heterogêneo formado por indivíduos dos três estoques comerciais analisados com predominância de indivíduos do estoque AL. Os indivíduos do estoque comercial KT encontram-se dispersos ao longo do dendrograma.

Analisando ainda a Figura 8, nota-se que alguns indivíduos pertencentes ao estoque comercial KT apresentam uma considerável similaridade genética com indivíduos do estoque comercial AL, sendo, portanto, esses dois estoques mais similares geneticamente entre si do que em relação ao EB. Alguns indivíduos do estoque comercial KT, um indivíduo do estoque comercial EB (EB08) e um indivíduo do estoque comercial AL (AL17) não foram agrupados em nenhum grupo sendo, portanto, menos similares geneticamente em relação aos demais e por isso aparecem isolados no dendrograma.

As similaridades genéticas medidas pelo método de Jaccard (1901) a partir dos dados RAPD variaram aproximadamente de 42 a 85% e o coeficiente de correlação cofenética de Mantel (r) foi de 0,8119 para a análise de agrupamento pelo método UPGMA, indicando que houve baixa distorção na análise de agrupamento.

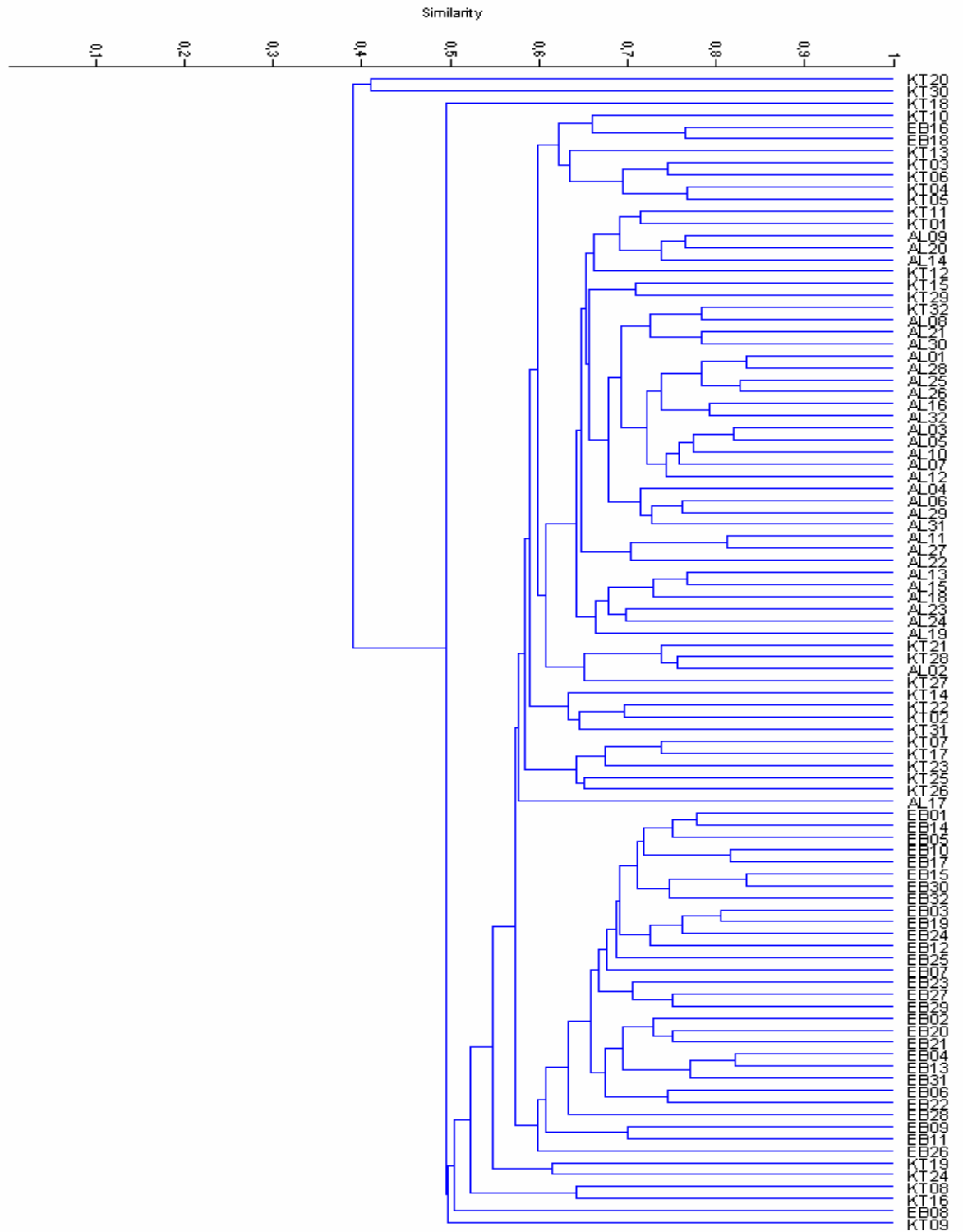


Figura 8. Dendrograma da similaridade genética obtida entre os três estoque comerciais de *L. vannamei*, definido pelo método de agrupamento UPGMA baseado nas similaridades genéticas de Jaccard, calculadas a partir dos dados RAPD.

4.4. COMPORTAMENTO DAS ESTIMATIVAS DE Φ_{ST}

Na região I da Figura 9, onde as estimativas de Φ_{ST} foram obtidos a partir de um número pequeno de marcadores, observa-se uma elevada amplitude desses valores, enquanto que na região II essa oscilação diminui até atingir uma estabilidade (platô) que pode ser verificada na região III do gráfico a partir da utilização de 48 marcadores.

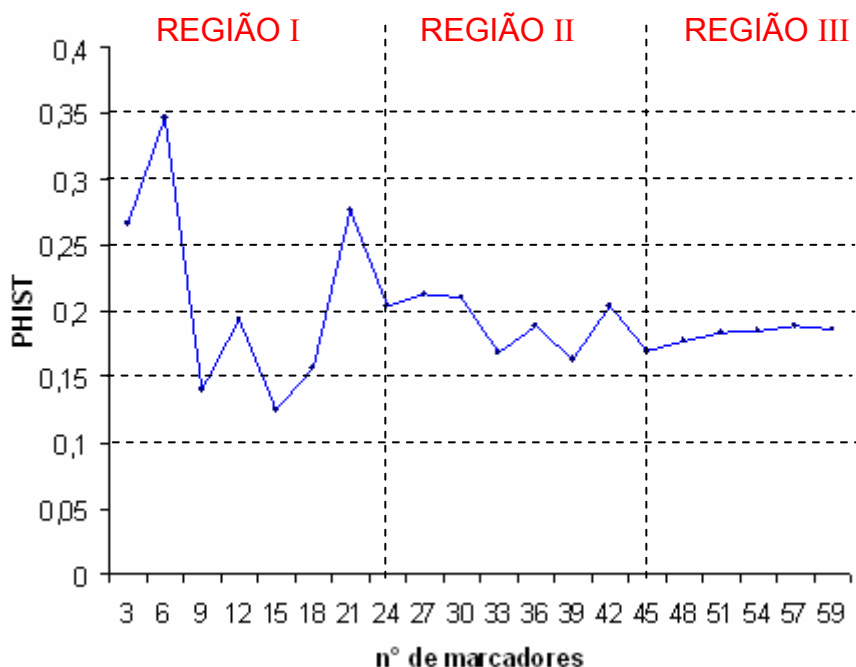


Figura 9. Variação das estimativas Φ_{ST} utilizando diferentes números de marcadores RAPD.

Os valores de coeficiente de variação (CV) apresentaram uma grande oscilação (18 a 44%) e tornaram-se iguais ou inferiores a 30% a partir da utilização de 42 marcadores. Ao final, o CV atingiu um valor médio de 25% com o uso de 59 marcadores (Figura 10).

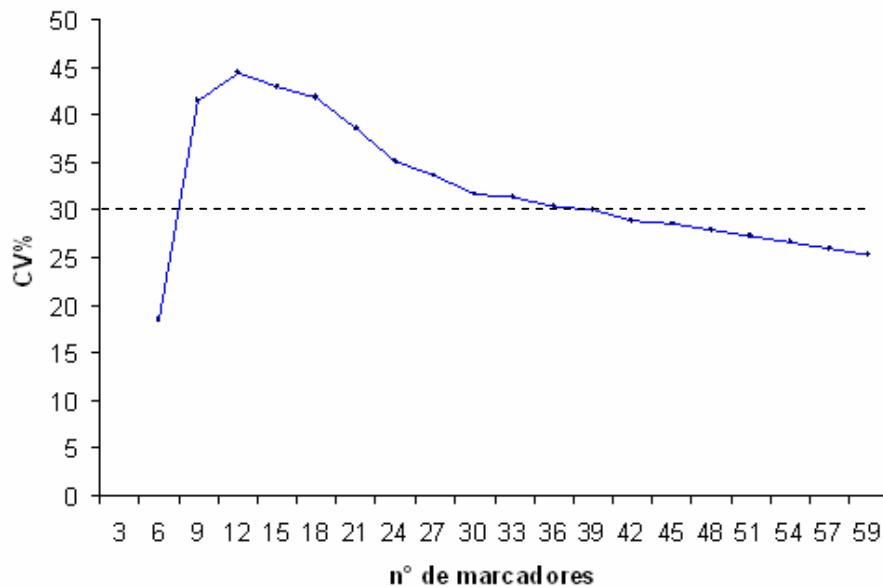


Figura 10. Coeficiente de variação (CV) dos valores de Φ_{ST} utilizando diferentes números de marcadores RAPD.

Também foi calculado o coeficiente de variação dos valores de Φ_{ST} a partir das três regiões distintas observadas na Figura 9 (Figura 11). O CV encontrado utilizando menos de 24 marcadores ficou em torno de 33% (Figura 11A). Utilizando entre 27 e 42 marcadores, esse coeficiente de variação reduziu-se para aproximadamente 10% (Figura 11B). A partir da utilização de 48 marcadores (platô), verificou-se que o valor médio do CV foi menor que 4%, ou seja, muito inferior aos valores de CV obtidos utilizando menos de 45 locos (Figura 11C).

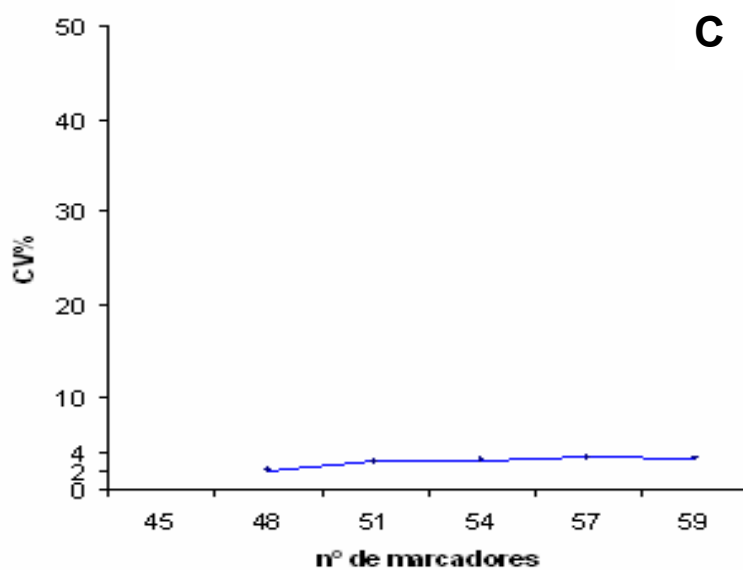
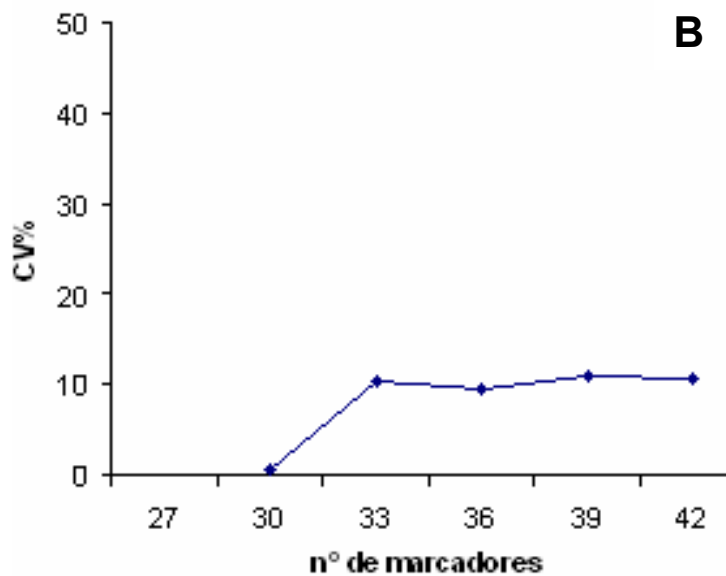
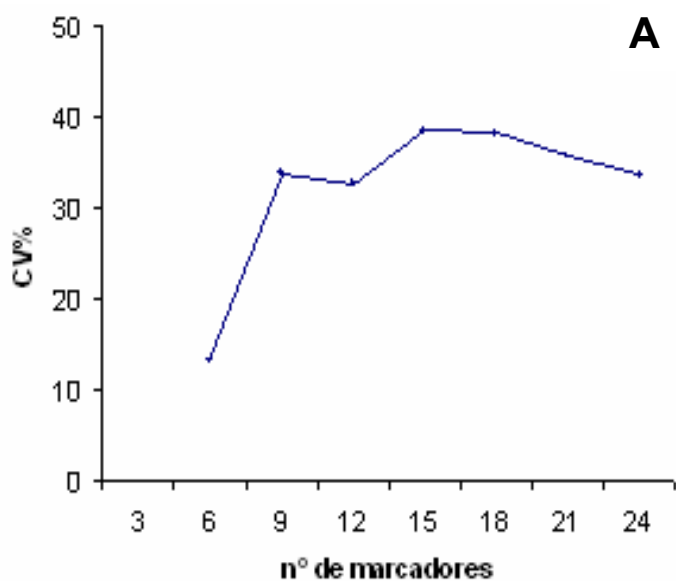


Figura 11. Gráficos dos coeficientes de variação (CV) dos valores de Φ_{ST} . A- CV dos valores de Φ_{ST} utilizando entre 3 e 24 marcadores RAPD; B- CV dos valores de Φ_{ST} utilizando entre 27 e 42 marcadores RAPD e C- CV dos valores de Φ_{ST} utilizando entre 45 e 59 marcadores RAPD.

4.5. Caracterização dos locos microssatélites para *L. vannamei*

Os locos analisados apresentaram um elevado número médio de alelos por loco com número mínimo de 06 (loco Pvan0040) e máximo de 29 alelos (loco MIR-B202FB) (Tabela 6). Esses fragmentos microssatélites amplificados tiveram extensão de 106 a 320 pares de bases. Analisando-se individualmente cada loco, percebe-se que a H_o varia de 0,1929 a 0,9761 e a H_E atinge valores entre 0,6082 e 0,9229.

Os marcadores microssatélites empregados nesse trabalho mostraram também um elevado poder de estimativa da diversidade gênica, detectando de 73,28% a 98,18% da diversidade gênica máxima possível para locos com 6 (0,83) a 29 (0,96) alelos respectivamente (Tabelas 6). A eficiência da estimativa da $H_{E_{Máx}}$ para todos os locos analisados encontra-se na Tabela 7.

Tabela 6. Caracterização de seis locos microssatélites polimórficos em *L. vannamei*. T_a , temperatura de anelamento; N_A , número de alelos; H_o , heterozigosidade observada; H_E , heterozigosidade esperada; $H_{E_{Máx}}$, heterozigosidade esperada máxima

Loco	Seqüência do <i>Primer</i> (5´-3´)	T_a (°C)	N_A	Amplitude dos alelos (pb)	H_o	H_E	$H_{E_{Máx}}$
Pvan0013.1	F: TGCTCTGGTAACGACAAACG R: AGACCTGTGGCGAAGTGC	55	10	268-320	0,2421	0,7465	0,90
Pvan0013.2	F: TGCTCTGGTAACGACAAACG R: AGACCTGTGGCGAAGTGC	55	10	242-282	0,1979	0,7363	0,90
Pvan0040	F: TTTACGATCAGATTGTTC R: GAAATAGAAAATAAAGAAC	46	6	136-150	0,9761	0,6082	0,83
Pvan1758	F: TATGCTCGTTCCCTTTGCTT R: TTGAAGGAAAAGTGTTGGGG	55	19	154-190	0,8876	0,9229	0,94
Pvan1815	F: GATCATTCGCCCTCTTTTT R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA	55	19	106-142	0,9318	0,8897	0,94
MIR-B202FB	MIR: GTGTGTTGCGGAATCGAA B202FB: CTAACCCAATATCGAATC	52	29	126-234	0,6250	0,7080	0,96

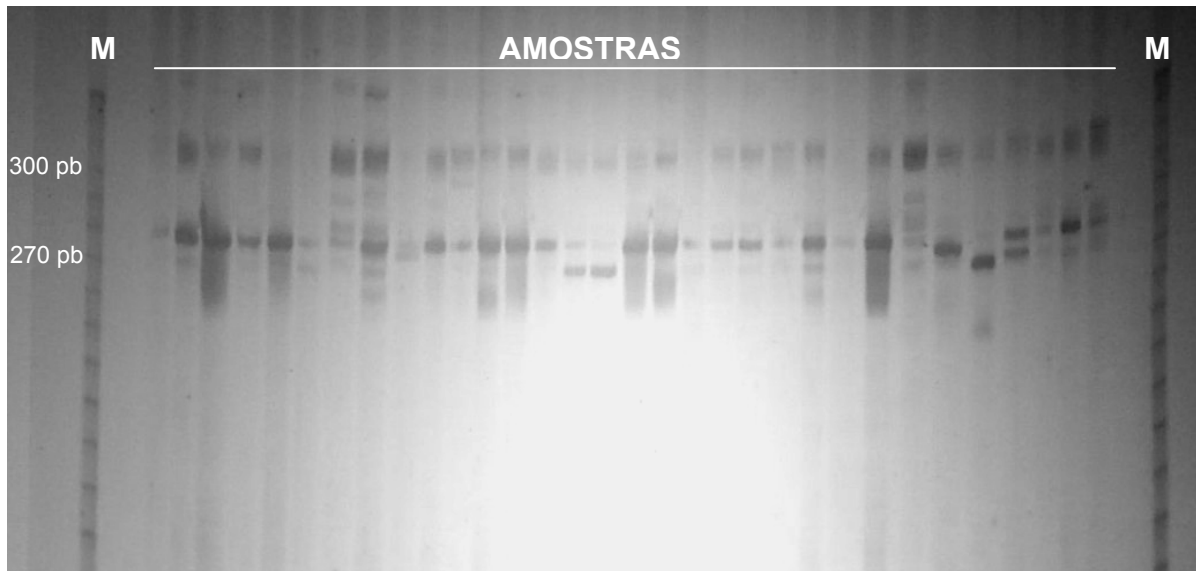
Tabela 7. Eficiência de detecção da diversidade gênica máxima ($H_{E_{Máx}}$) para os seis locos microssatélites polimórficos em *L. vannamei*

Loco	Eficiência de detecção de $H_{E_{Máx}}$
Pvan0013.1	82,94%
Pvan0013.2	81,81%
Pvan0040	73,28%
Pvan1758	98,18%
Pvan1815	94,65%
MIR-B202FB	73,75%

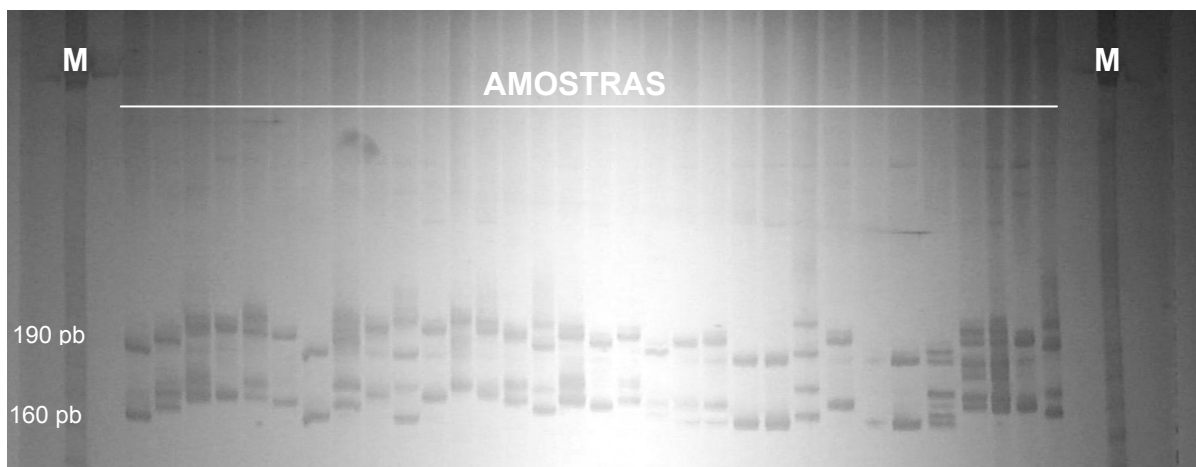
4.6. Estrutura genética utilizando marcadores microssatélites

Dos seis *primers* microssatélites testados, apenas o Pvan1003 apresentou-se monomórfico para esses estoques sendo, portanto, descartado das análises. Por outro lado, o Pvan0013 apresentou loco duplicado.

Os testes de gradiente de temperatura de anelamento (T_a) para os *primers* indicaram T_a ideais entre 46 e 55°C (Tabela 6), permitindo assim, uma melhor visualização das bandas e maior precisão na genotipagem dos indivíduos em gel de poliacrilamida após a coloração com nitrato de prata (Figura 12).



A



B

Figura 12. Géis de poliacrilamida 4% corado em nitrato de prata contendo fragmentos microsatélites dos locos Pvan0013 (A) e Pvan1758 (B) de 32 indivíduos de um estoque comercial de *Litopenaeus vannamei*. M- Marcador de peso molecular 10 pb (invitrogen).

Os estoques comerciais estudados apresentaram diversidade gênica (H_E) variando de 0,5405 a 0,5760, já os valores de heterozigosidade observada (H_O) foram superiores aos esperados ficando entre 0,6272 e 0,6608 (Tabela 7). O coeficiente de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) atingiu um valor médio de -0,1629 sendo que o estoque comercial KT apresentou o menor valor (-0,2273) enquanto que o estoque comercial EB obteve o maior índice (-0,1147) (Tabela 8). A taxa de endogamia interpoblacional encontrada (F_{ST}) evidencia uma relativa estruturação entre os estoques estudados, apresentando um valor médio de 0,2648.

Tabela 8. Estimativa da heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_O) e índice de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) em três estoques comerciais de *L. vannamei*

Estoque comercial	H_E	H_O	F_{IS}
KT	0,5405	0,6608	-0,2273
AL	0,5466	0,6272	-0,1503
EB	0,5760	0,6409	-0,1147
Média	0,5544	0,6430	-0,1629

5. DISCUSSÃO

Um mínimo de conhecimento sobre a variabilidade genética em estoques peneídeos é indispensável para o sucesso da carcinocultura em áreas com elevado potencial para essa atividade. Na região de Canavieiras, a crescente expansão do cultivo de camarões tem gerado a necessidade de investimentos em pesquisas que promovam uma maior rentabilidade dessa atividade aos produtores e o desenvolvimento da micro-região. Procurando atender a essas demandas, este foi o primeiro trabalho realizado nessa localidade com o propósito de avaliar o nível de diversidade genética dos plantéis de *L. vannamei* de diferentes empresas fornecedoras de pós-larvas atuantes em Canavieiras, além de poder auxiliar estudos de genética populacional de espécies em que não foram desenvolvidos *primers* para a amplificação de locos microssatélites, por meio da comparação dos dados obtidos com marcadores dominantes e codominantes.

5.1. Extração de DNA total

Com o avanço tecnológico da biologia molecular nos últimos anos, diversas técnicas como RAPD e microssatélites foram desenvolvidas, auxiliando os estudos de diversidade genética populacional em inúmeras espécies (TELLES et al., 2001). Porém, para a realização de tais técnicas é preciso ter disponível DNA de boa

qualidade, sendo muito importante a implementação de metodologias específicas que melhorem o rendimento da extração (WALDSCHMIDT et al, 1997).

Segundo Valentim et al. (2003) ainda são poucos os experimentos que avaliam diferentes protocolos de extração em crustáceos descritos em literatura, havendo, portanto, a necessidade de buscar métodos alternativos. Entretanto, alguns protocolos de extração de DNA de camarão já demonstraram ser adequados para o fornecimento de material genético de boa qualidade para análises de variabilidade populacional, apesar de ainda utilizarem reagentes altamente tóxicos.

No presente trabalho, dos quatro protocolos avaliados para a extração de DNA de *L. vannamei*, o método descrito por Sambrook et al. (1989) foi o único que proporcionou o surgimento de material genético em quantidades detectáveis em gel de agarose 1%. Esse fato mostra que o fenol associado ao clorofórmio e ao álcool isoamílico foi um reagente muito importante para a efetiva extração de DNA dessa espécie nas condições específicas desse estudo.

Apesar da obtenção de DNA por meio do protocolo acima citado, esse material genético apresentou-se inviável para as reações de PCR em função do seu elevado estado de degradação e quantidade de contaminantes. Para tentar resolver esse problema, foram acrescentadas algumas alterações ao protocolo de Sambrook et al. (1989) sendo, ao final, gerado DNA em quantidade e qualidade satisfatória. A eliminação da etapa de maceração do tecido em nitrogênio líquido parece ter evitado a degradação do DNA em escala substancial. A trituração do material diretamente em tampão de lise mostrou ser adequada para evitar a oxidação do tecido e o aumento do tempo de permanência e número de lavagens em etanol permitiu uma maior precipitação de DNA e uma maior eliminação de resíduos como restos de fenol e proteínas (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Apesar dos demais protocolos de extração de ácidos nucleicos não se apresentarem satisfatórios para as condições específicas desse estudo, estes podem gerar resultados positivos por meio das alterações nas concentrações dos componentes utilizados em tais procedimentos (VALENTIM et al., 2003).

Além do tipo de material de partida, das condições de obtenção das amostras e do tempo de preservação destas, a escolha do protocolo de extração

de DNA mais adequado é também influenciada pelas condições de infraestrutura e funcionamento específicos de cada laboratório de pesquisa.

5.2. Seleção de *primers* RAPD

A quantidade de *primers* selecionados e o número de locos RAPD analisados foram considerados suficientes para realização das estimativas de variabilidade genética nos estoques comerciais estudados. Segundo Telles et al. (2001), o mais importante no estudo de genética populacional não é o número de *primers* RAPD utilizados e sim a quantidade de bandas polimórficas produzidas por estes. Povh et al. (2005), com o objetivo de avaliar a variabilidade genética de linhagens de tilápias (*Oreochromis niloticus*) no estado do Paraná consideraram a utilização de 45 marcadores RAPD adequada. A quantidade de marcadores polimórficos por *primer* em determinadas populações cativas pode variar de acordo com o tempo e o número de gerações nascidas em cativeiro, podendo haver, portanto, a redução da quantidade de marcadores polimórficos por *primer* em populações com o maior tempo de domesticação e com ciclos de vida curtos que permitam um elevado número de gerações nascidas em cativeiro (FREITAS, 2003).

Embora alguns estudos mostrem que, para uma boa reprodutibilidade da reação de RAPD os fragmentos amplificados devam ter extensão variando entre 200 e 1500 pares de bases (FOWLER et al., 1998; LIU et al, 1999), os marcadores utilizados nesse trabalho apresentaram boa reprodutibilidade nos três estoques mesmo com o tamanho dos seus fragmentos extrapolando essa extensão (150 a 2100 pares de bases).

5.3. Diversidade genética com base nos marcadores RAPD

Os coeficientes de endogamia interpopulacional encontrados com marcadores RAPD utilizando os programas AMOVA e TFPGA, sugerem haver uma significativa diferenciação entre os estoques comerciais estudados e esse efeito seria causado pela estruturação genética destes estoques (GILPIN; SOULÉ, 1986). De acordo com esses programas, cerca de 18% da variabilidade genética dos animais encontram-se entre os estoques, ou seja, os conjuntos gênicos dos animais fornecidos pelas empresas são substancialmente diferentes entre si, contendo a possibilidade de respostas diferenciadas às mudanças de condições ambientais, introdução de um potencial agente patogênico e até mesmo apresentar desempenhos contrastantes diante de uma determinada fórmula de ração ou método de manejo (DE DONATO et al., 2005).

Prim et al. (2003) analisando a variabilidade genética de rãs criadas em cativeiro provenientes de populações dos estados de Goiás, Pará e Paraná, utilizando o AMOVA, verificou um Φ_{ST} de 0,349, sendo 34,85% da variabilidade genética resultante da variação entre as populações e 65,15% da variação intrapopulacional. Serrano et al. (2004), trabalhando com bovinos, observaram que a variação genética entre cinco rebanhos de diferentes raças foi de 29,96%, enquanto pesquisas com búfalos mostraram que o valor de endogamia interpopulacional foi de 0,265 (ALBUQUERQUE et al., 2006). Os resultados de Φ_{ST} encontrados para as populações de rãs, bovinos e búfalos acima citados, mostraram-se superiores aos índices de variabilidade genética gerados para o *L. vannamei* nesse estudo. Isto se deve provavelmente, ao fato de ainda existir uma considerável diversidade genética nesses estoques comerciais de camarões ou talvez porque as outras espécies possuam uma estreita base genética.

Já o programa HICKORY supõe não haver estruturação dos estoques e sim uma elevada endogamia intrapopulacional em função do cruzamento entre indivíduos geneticamente semelhantes, indicando a existência de uma seleção intencional ao longo de gerações seguidas (FREITAS; GALETTI, 2002). Em nenhum momento a taxa de endogamia intrapopulacional gerada pelo HICKORY foi utilizada para as análises genéticas desse trabalho, uma vez que, a

confiabilidade desse índice em certas condições é questionada pelos próprios autores do programa (HOLSINGER et al., 2002).

Embora os dados gerados através de estatística Bayesiana pelo HICKORY não apresentem congruência com a estatística Φ_{ST} fornecida pelo AMOVA nesse trabalho, algumas pesquisas em outras espécies mostraram uma consistência entre esses aplicativos. Estudos de genética populacional da estrela do mar *Asterina gibbosa* e da espécie arbórea *Medicago citrina* por meio de marcadores AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) demonstraram não existir diferenças significativas entre os índices de endogamia interpopulacional gerados pelo AMOVA e o HICKORY (BAUS et al., 2005; JUAN et al., 2004) enquanto que, em populações de aspargos na Itália, os resultados de estruturação genética obtidos por marcadores ISSR (*intersimple sequence repeat*) através do HICKORY foram confirmados pelo AMOVA (SICA et al., 2005). É necessário a realização de mais estudos com outros modelos populacionais utilizando estas mesmas ferramentas para poder emitir uma conclusão mais sólida com relação à confiabilidade da metodologia utilizada pelo programa HICKORY.

5.4. Comportamento das estimativas de Φ_{ST}

As análises das estatísticas Φ_{ST} com diferentes números de marcadores RAPD mostraram que, com menos de 48 locos, os valores das estimativas Φ_{ST} são discrepantes entre si. O coeficiente de variação (CV) foi muito elevado quando utilizados poucos marcadores e ao final dos testes, com o total de 59 locos, o CV ficou em torno de 25%, um valor considerado razoavelmente baixo (PIMENTEL GOMES, 2000). Uma das razões para explicar o valor do coeficiente de variação final encontrado com os 59 marcadores seria a presença de valores extremos de Φ_{ST} observados quando utilizada uma pequena quantidade de locos RAPD. Esses valores extremos são, portanto, responsáveis pelo aumento do desvio padrão e conseqüentemente, pela elevação do CV.

Para tentar reduzir as distorções do CV pela influência dos valores extremos e também buscando uma análise mais aprofundada dos dados do

comportamento das estimativas de Φ_{ST} , foi calculado um CV apenas para os valores obtidos a partir da utilização de 45 marcadores. Percebeu-se após os novos cálculos que o CV ficou em torno de 3,5%, o que nos permitiu propor que a partir da utilização de 48 marcadores, a variação dos valores de Φ_{ST} obtidos é menor que 4% (Figura 11C). Segundo Gill (1987), em ciências biológicas, valores de CV menores que 1% são muito raros, sendo mais comum encontrar valores para esse coeficiente na faixa de 5 a 50%.

Outros autores têm utilizado a mesma metodologia aplicada no presente trabalho para concluir qual o melhor número de marcadores dominantes para se obter um determinado parâmetro com estimativas confiáveis. Telles et al. (2001) analisando raças de bovinos, determinou 50 como sendo o número mínimo de marcadores RAPD necessários para estimar a divergência genética entre essas raças. Outro estudo em eucaliptos mostrou que com menos de 10 marcadores dominantes, o coeficiente de variação da taxa de cruzamento estimada para essa espécie é de duas a três vezes superior ao encontrado, utilizando de 18-20 marcadores (GAIOTTO et al., 1997). O estabelecimento de um número mínimo de marcadores RAPD capazes de permitir fazer inferências sobre estrutura genética populacional de espécies em geral e em particular do *L. vannamei*, é importante no sentido de economizar tempo, esforço e custos dentro de um laboratório de pesquisa.

5.5. Agrupamento com base nos marcadores RAPD

O dendrograma gerado a partir dos dados de RAPD mostrou que os indivíduos dos estoques comerciais dos fornecedores KT e AL são mais próximos entre si do que em relação ao estoque do fornecedor EB. Isso provavelmente é um indicativo de que o fornecedor EB detém um conjunto gênico diferente em sua origem em relação aos demais fornecedores que, por sua vez, parecem ter uma origem genética mais em comum. Todos os estoques possuem pelo menos um indivíduo que não foi agrupado em nenhum grupo, possivelmente isto pode ter se dado porque esses animais são de fato geneticamente diferentes dos demais

indivíduos, tanto do seu estoque, quanto dos outros. Caso essa hipótese seja verdadeira, isso mostra que nos estoques comerciais das empresas fornecedoras de pós-larvas existem animais que podem ser utilizados em futuros processo de reprodução com o intuito de inserir variabilidade genética nesses estoques, se necessário.

O coeficiente de correlação cofenética de Mantel ($r = 0,8119$) mostrou que o dendrograma gerado é consistente em relação à matriz obtida. Trabalhos de análise de estrutura populacional com marcadores dominantes em roedores e plantas mostraram valores de correlação cofenética de Mantel de 0,683 e 0,670 respectivamente, como suficientes para discussão do dendrograma sem a necessidade de divulgação da matriz de similaridade (OLIVEIRA, 2005; BELAJ et al., 2003).

5.6. Caracterização dos locos microssatélites para o *L. vannamei*

Os testes com diferentes temperaturas de anelamento em *primers* microssatélites mostram que houve poucas alterações em relação às temperaturas originalmente descritas, apenas os *primers* Pvan0040 e Pvan1003 tiveram suas T_a s alteradas em 1°C. Os testes com gradiente de temperatura de anelamento são importantes para a observação da T_a que proporcione melhores condições de amplificação do DNA, evitando assim, o surgimento de fragmentos inespecíficos no gel (LEVITT et al., 1994).

Os três estoques comerciais estudados não apresentam diferenças significativas no nível de diversidade gênica, sendo a heterozigosidade observada sempre maior que a esperada em todas elas (Tabela 7). Esses valores de heterozigosidade observados são superiores aos encontrados em estudos de estrutura genética populacional em outras espécies como o *Litopenaeus schmitti* em Cuba, onde a heterozigosidade observada atingiu valores entre 0,605 e 0,653 (BORRELL et al., 2004). Em alguns trabalhos com populações naturais de camarões como *P. monodon* nas Filipinas e o *Fanneropenaeus chinensis* na Ásia, as heterozigosidades observadas ficaram entre 0,749-0,791 e 0,660-0,756

respectivamente (XU et al., 2001; LIU et al., 2006). Talvez uma das razões da menor heterozigosidade observada nas populações cativas em relação as naturais seja a perda da variabilidade genética em função da redução do número de diferentes alelos ao longo das gerações (FREITAS; GALETTI, 2002).

Uma maneira de avaliar a capacidade de um marcador quanto ao seu poder de discriminação de heterozigotos esperados em uma população panmítica, é através da estimativa do percentual da diversidade gênica máxima ($H_{E_{Máx}}$) que é dependente do número de alelos em cada loco. Os marcadores utilizados nesse estudo apresentaram excelentes índices dessas estimativas, cobrindo não menos que 80% da máxima diversidade gênica possível de ser estimada com qualquer um desses marcadores nesses estoques.

Em populações onde a renovação dos estoques é realizada sem a preocupação com a manutenção da variabilidade genética podem ocorrer problemas como redução da performance de crescimento e aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas (WOLFUS et al., 1997). A seleção artificial tem o poder de aumentar significativamente a performance animal, porém o descuido com a manutenção da variabilidade genética pode causar impactos extremamente negativos em virtude da depressão endogâmica (GOYARD et al., 2003). Para que continue havendo um considerável número de diferentes alelos nas populações coletadas na região de Canavieiras é muito importante o constante monitoramento da variabilidade genética durante a renovação desses estoques em programas de melhoramento.

6.7. Estrutura genética utilizando marcadores microssatélites

O resultado do índice de endogamia entre populações (F_{ST}), obtido com os marcadores microssatélites, evidencia a existência de uma significativa diferenciação entre os estoques analisados e isto, conseqüentemente, pode levar a uma redução da variabilidade genética. Esses resultados corroboram com os dados gerados pelo AMOVA e TFGA. Belaj et al. (2003) trabalhando com populações de *Olea europaea L.* da Espanha e Itália compararam os índices de

endogamia interpopulacional obtidos pelo AMOVA para RAPD com dados de marcadores microssatélites e verificaram que esses valores foram 0,072 e 0,074 respectivamente, concluindo não haver diferenças significativas entre os resultados fornecidos pelos diferentes marcadores para essa espécie. A comparação entre os resultados obtidos por marcadores dominantes e codominantes realizada no presente estudo é importante no sentido de verificar desvios entre os coeficientes de endogamia fornecidos pelos mesmos. O comportamento robusto das estimativas Φ_{ST} obtidas por meio dos marcadores RAPD através do AMOVA em relação às estatísticas F_{ST} geradas a partir da análise de microssatélites mostra que de fato esses marcadores dominantes podem ser utilizados para inferências genéticas populacionais por grupos de pesquisa que não têm acesso aos marcadores codominantes.

As análises dos dados oriundos dos marcadores microssatélites nos estoques de camarões das fazendas Canavieiras, também mostraram valores de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) negativos, supondo assim a não existência de preferência de cruzamentos entre indivíduos consangüíneos nas populações parentais, confirmando dessa maneira a ineficiência da metodologia utilizada pelo programa HICKORY para estimativa desse coeficiente nesse trabalho. Esses resultados são extremamente positivos segundo alguns autores, pois, uma drástica redução de indivíduos reprodutores em uma população pode causar elevação do nível de consangüinidade em função da deriva genética, resultando em perda de variabilidade genética (FREITAS; GALETTI, 2002).

De acordo com Goyard et al. (2003) a eficiência de qualquer programa de melhoramento está relacionada ao nível de variabilidade genética dos reprodutores. Nesse sentido, diversos estudos têm alertado aos melhoristas de espécies animais sobre a importância do monitoramento da variabilidade genética, mostrando que a perda desta em populações de peneídeos cultivados em cativeiro ao longo de gerações seguidas está associada ao aumento da susceptibilidade a doenças, surgimento de deformidades físicas e redução da taxa de crescimento (WOLFUS et al., 1997; SBORDONI et al., 1986; CROCOS et al., 2002). Contudo, De Donato et al. (2005) contestam a necessidade de cuidados com a manutenção da variabilidade genética em programas de melhoramento pois, segundo este, os efeitos da depressão endogâmica podem

ser evitados com o manejo adequado dos estoques, além disso, esses efeitos variam segundo cada espécie.

Os valores negativos de F_{IS} gerados com os microssatélites podem ser perfeitamente compreendidos, uma vez que, esse coeficiente é igual a: um subtraído pela razão entre H_O e H_E . Como a H_O foi sempre superior a H_E (Tabela 7), o resultado final da equação será negativo. Para explicar esses números, pode-se propor a possível existência de uma pressão seletiva sobre esses estoques e que os indivíduos heterozigotos tenham se adaptado de forma mais eficiente. Seleções diferenciais podem ocorrer em todos ou qualquer estágio de vida dos organismos, indo desde a fecundação até a fase adulta (HENDRICK, 2000). Outras possíveis explicações para o aumento da H_O estariam relacionadas a um possível cruzamento de diversas linhagens endogâmicas gerando um número acentuado de heterozigotos. Nos estoques comerciais de camarões estudados em Canavieiras pode estar manifestado o vigor híbrido ou heterose e esse efeito é contrário à depressão endogâmica. Bierne et al. (2000) detectaram uma correlação positiva entre heterozigosidade obtida via microssatélites e taxa de crescimento em estoques de *L. stylirostris* cultivados na Tailândia. Uma das características da heterose é o aumento do valor médio fenotípico demonstrado pela elevação dos índices zootécnicos e eficiência fisiológica (FALCONER, 1987). Contudo, a heterose também pode causar efeitos indesejáveis como a menor adaptação a determinadas condições em relação aos homozigotos (HENDRICK, 2000).

Os resultados obtidos no presente trabalho terão aplicação na carcinocultura em Canavieiras, pois, a verificação de uma significativa diversidade genética nos estoques de *L. vannamei* nessa região, propõe que os processos de produção de pós-larvas adotados futuramente devam estar atentos para a manutenção da mesma, pois essa diversidade é fundamental para o sucesso da atividade nessas propriedades. No momento, é possível recomendar que os produtores continuem adquirindo as pós-larvas de diferentes laboratórios, o que manterá a diversidade genética natural da espécie e poderia evitar a perda total da produção em caso de doenças, mudanças drásticas no ambiente ou no manejo.

Outro importante achado nessa pesquisa foi a confirmação dos marcadores RAPD como ferramenta adequada para uso na avaliação da diversidade genética dos estoques comerciais estudados, gerando resultados de endogamia interpopulacional compatíveis com os marcadores microssatélites. O comportamento das estimativas Φ_{ST} mostrou-se estável a partir da utilização de 48 locos sendo, portanto esse o número mínimo de marcadores recomendados para estudos de genética populacional para essa espécie. Para o monitoramento continuado desta diversidade, recomenda-se coletar bianualmente amostras de *L. vannamei* (32 indivíduos) de produtores que obtenham pós-larvas de laboratórios distintos e genotipá-los com os *primers* RAPD destacados na Tabela 2. Eles serão adequados para gerar os 48 marcadores necessários para a averiguação da diversidade genética existente. Seguindo-se todas as recomendações descritas no presente trabalho, acredita-se que em 30 dias será possível emitir um parecer técnico acerca da variabilidade genética remanescente nestes estoques. Se esta prática for adotada, obter-se-á em alguns anos, um monitoramento genético representativo da variabilidade genética local, já que poderão ser feitas comparações das estimativas ao longo do tempo.

Espera-se que esse estudo possa estimular futuros trabalhos na principal região baiana em cultivo de camarão, auxiliando, dessa maneira, os produtores e proporcionando um desenvolvimento econômico sustentável com esta prática.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que:

- O método de extração de DNA descrito por Sambrook et al. (1989) com pequenas modificações, permitiu a obtenção de material genético em quantidade e qualidade adequada para as condições específicas desse estudo.
- Os resultados do coeficiente de endogamia interpopulacional obtidos pelas diferentes metodologias de análise de dados de marcadores dominantes através dos programas TFPGA e AMOVA mostram-se diferentes dos obtidos através do programa HICKORY.
- As estatísticas F_{ST} de Wright geradas a partir de marcadores codominantes corroboraram com os resultados encontrados pelos programas TFPGA e AMOVA, mostrando que os marcadores RAPD constituem-se uma ferramenta eficaz nos estudos de genética de populações nas condições estabelecidas no presente trabalho.

- O comportamento das estimativas de Φ_{ST} mostrou-se estável a partir da utilização de 48 marcadores dominantes, devendo, portanto, este ser o número mínimo de locos dominantes utilizados em trabalhos sobre a variabilidade genética de populações desta espécie.
- A taxa de endogamia entre os estoques comerciais mostra que os conjuntos gênicos utilizados pelos fornecedores de pós-larvas são diferentes entre si, abrindo a possibilidade de respostas diferenciadas frente a determinadas condições de manejo.
- Como o valor de F_{IS} encontrado pelo GDA mostra a não existência de endogamia intrapopulacional, então a variabilidade genética desses estoques parece estar sendo mantida ao longo das gerações nascidas em cativeiro.
- Os estoques de camarão mantidos nas fazendas Ocean e Maricanes Maricultura, provenientes dos fornecedores de pós-larvas KT, AL e EB na época das nossas coletas constituem, pela perspectiva da variabilidade genética, um bom material para o estabelecimento de uma produção carcinicultora de qualidade e bons rendimentos econômicos.

8. REFERÊNCIAS

- ABCC. **Projeto executivo para apoio político ao desenvolvimento do camarão marinho cultivado**. Recife, 2004. 11 p.
- ALBUQUERQUE, M.D.M. et al. Genetic variability of buffaloes estimated by RAPD markers. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 623-628, 2006.
- ALFONSO, E.; COELHO, M.A. Manejo de larvicultura. In: CURSO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO DE PÓS-LARVAS DE CAMARÃO MARINHO. Programa Iberoamericano de Ciência y Tecnología para el Desarrollo. Florianópolis: Cytel, 1997. p. 132.
- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, C.R., et al. **Aqüicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004. p. 199-220.
- ARANA, L.V. **Aqüicultura e desenvolvimento sustentável. Subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura brasileira**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1999. 310 p.
- AUBERT, H.; LIGHTNER, D.V. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. **Marine Biology**, v. 137, n. 5-6, p. 875-885, 2000.
- BARBIERI JR., R.C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos: Reprodução, Maturação e Larvicultura**. Viçosa: Aprenda Fácil, v. 01. 2001. 255 p.

BAUS, E.; DARROCK, D.J.; BRUFORD, M.W. Gene-flow patterns in Atlantic and Mediterranean populations of the Lusitanian sea star *Asterina gibbosa*. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 11, p. 3373-3382, 2005.

BELAJ, A. et al. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, n. 4, p. 736-744, 2003.

BEUZEN, N.D.; STEAR, M.J.; CHANG, K.C. Molecular markers and their use in animal breeding. **Veterinary Journal**, v. 160, n. 1, p. 42-52, 2000.

BIERNE, N. et al. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Aquaculture**, v. 184, n. 3-4, p. 203-219, 2000.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, Impr. Univ. 1997. 547 p.

BORRELL, Y. et al. DNA microsatellite variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Marine Biology**, v. 144, n. 2, p. 327-333, 2004.

BROOKER, A.L. et al., Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. **Marine Biology**, v. 136, n. 1, p. 149-157, 2000.

CEDENO, V. et al. Quantitative genetics and genetic transformation for the selection of pathogen-resistant shrimp. In: ADVANCES IN SHRIMP BIOTECHNOLOGY. National Center For Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok: Flegel TW, p. 61-65, 1998.

CRESTE, S.; NETO, A.T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

CROCOS, P. et al. Comparative growth, survival and reproductive performance of inbred and outbred lines domesticated shrimp, *Penaeus japonicus*. **Aquaculture**, v. 204, p. 198, 2002.

CRUZ, P. et al. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 3, p. 239-241, 2002.

CRUZ, P. et al. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Mar Biotechnol (NY)**, v. 6, n. 2, p. 157-64, 2004.

DE DONATO, M. et al. Mass selection and inbreeding effects on a cultivated strain of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in Venezuela. **Aquaculture**, v. 247, n. 1-4, p. 159-167, 2005.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fesh tissues. **Focus** v. 12, n., p. 13-15 1987.

DOYLE, R. Genetic domestication of aquaculture broodstocks: a review. In: FAO WORKSHOP ON HATCHERY GUIDELINES FOR SHRIMP DOMESTICATION AND DISEASE CONTROL. Mazatlan, México: 2002. p. 25.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes - Application to Human Mitochondrial-DNA Restriction Data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, Impr. Univ., 1987. 279 p.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FOWLER, E.V. et al. Genetic variation in captive koalas (*Phascolarctos cinereus*): Parentage determination and individual identification. **Biochemical Genetics**, v. 36, n. 5-6, p. 193-206, 1998.

FRANCISCO, A.K. **Relações genéticas em planteis de reprodutores do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, através do sequenciamento dos genes RNAr 16 e COI do DNAm**. 2003. 59 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

FRANCISCO, A.K.; GALETTI, P.M. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 258-261, 2005.

FREITAS, P.D.; GALETTI, P.M. PCR-based VNTR core sequence analysis for inferring genetic diversity in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 431-434, 2002.

FREITAS, P.D. **Marcadores Microssatélites em Camarões**: Curso Teórico. 2005a, 40 p. Disponível em: <<http://www.shrimp.ufscar.br>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2006.

FREITAS, P.D. **Estudos de diversidade genética em camarões utilizando marcadores moleculares**. Manual Prático. Marcadores de RAPD. São Carlos, 2005b. p. 1-37. Disponível em: <<http://www.shrimp.ufscar.br>>. Acesso em: 17 dez 2007.

FREITAS, P.D. **Estudos de diversidade genética em estoques de reprodutores de camarões *Litopenaeus vannamei* no Brasil**. 2003. 120 f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and

AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 5-6, p. 842-849, 1997.

GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCONVSKY, R. Genetic structure, mating system, and long distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.) **Journal of Heredity**. v 94, n. 5, p. 399-406, 2003

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*. **Mol Mar Biol Biotechnol**, v. 5, n. 1, p. 71-83, 1996.

GILL, J.L. **Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences**. Ames: The Iowa State University Press, 1987. v.1, 411 p.

GILPIN, M. E.; SOULÉ, M. E. Minimum viable populations: processes of species extinction. In: SOULÉ, M. E. Conservation biology: the science of scarcity and diversity. Sunderland: Sinauer Associates, MA., 1986.

GONCALVES, M.M. et al. Fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) analyses and genetic diversity in *Litopenaeus vannamei* (*Penaeidae*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2005.

GOYARD, E. et al. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. **Aquatic Living Resources**, v. 16, n. 6, p. 501-508, 2003.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HENDRICK, P.W. **Genetics of populations**. London: Jones and Bartlett Publishers Incorporated, 2000. 553 p.

HOLSINGER, K.E.; LEWIS, P.O.; DEY, D.K. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 7, p. 1157-1164, 2002.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bull Soc Vandoise Sci Nat**, v. 37, p. 547-579, 1901.

JUAN, A. et al. Patterns of variability and gene-flow in *Medicago citrina*, an endangered endemic of islands in the western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Molecular Ecology**. v. 13. p. 2679–2690, 2004.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annual of Botany**, v. 78, n. 2, p. 143-149, 1996.

KLINBUNGA, S. et al. Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. **Marine Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 428-438, 2001.

LERNER, I.M.; DONALD, H.P. **Recentes progressos no melhoramento genético dos animais**. São Paulo: Polígono, 1969. 342 p.

LESTER, L.J.; PANTE, M.J.R. Genetics of *Penaeus* species. In: FAST, A.W.; LESTER, L.J. **Marine Shrimp culture: principles and practices**. New York: Elsevier Science Publishers, 1992. p. 29 - 52.

LEVITT, R.C. et al. Fluorescence-based resource for semiautomated genomic analyses using microsatellite markers. **Genomics**, v. 24, n. 2, p. 361-5, 1994.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data, Version 1.0 (d16c)**. Free program distributed by the authors over the Internet. 2001. Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>> Acesso em: 21 de março de 2005.

LITT, M.; LUTY, J.A. A Hypervariable Microsatellite Revealed by Invitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac-Muscle Actin Gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 397-401, 1989.

LIU, P. et al. Polymorphic analysis of microsatellite DNA in wild populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 6, p. 556-562, 2006.

LIU, Z.J. et al. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. **Aquaculture**, v. 174, n. 1-2, p. 59-68, 1999.

LUCCHESI, T. **Avaliação da viabilidade da carcinocultura marinha no estado de São Paulo: uma análise a partir de indicadores de competitividade de cadeia produtiva**. 2003. 145 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

MAGGIONI, R.; ROGERS, A.D.; MACLEAN, N. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda : Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, p. 3213-3217, 2003.

MATEUS, J.C. et al. Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle blends using microsatellites. **International Society for Animal Genetics, Animal Genetics**, v. 35, p. 106-113, 2004.

MELLO, R.H. Fazendas Alagadas – produção de peixes e crustáceos em cativeiro é negócio da China. **Panorama da Aqüicultura**, v. 69, Janeiro-Fevereiro, 2002.

MILLER, M.P. **Tools for Population Genetic Analysis**. Northern Arizona State University: Flagstaff, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado**: seguimento de mercado. Departamento de Pesca e Aqüicultura. Brasília: MAPA/SARC. DPA, CNPq, ABCC, 2001. 276 p.

OLIVEIRA, C.G. **Diversidade genética do ouriço-preto (*Chaetomys subspinosus*, OLFERS 1818 Rodentia: Erethizontidae) para auxiliar na elaboração de seu plano de manejo**. 2005. 59 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2005.

PEARSE, E.D.; CRANDALL, A.K. Beyond F_{ST} : Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetic**. v. 05, p. 585-602, 2004.

PEREZ, F. et al. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*. **Marine Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 554-569, 2005.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Degaspari, 2000. 477 p.

POVH, J.A., et al. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.

PRESTON, N.P.; CLIFFORD, H.C. Genetic improvement of farmed shrimp: summary and implications of a global survey. **Global Aquaculture Advocate**, v. 5, n. 1, p. 48-50, 2002.

PRIM, E.C.P.; PADUA, J.T.; BATAUS, L.A.M. Variabilidade Genética da Rã-Touro Gigante (*Rana catesbeiana*) Proveniente de Populações dos Estados de Goiás, Pará e Paraná, Criadas em Sistema Intensivo de Cultivo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2003.

PRIMAVERA, J.H. A review of maturation and reproduction in closed *thelycum penarids*. In: FIRST INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE CULTURE OF PENAEID PRAWNS/SHRIMP. Philippines: Iloilo City, 1984.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 2001. 359 p.

ROHLF, F.L.J. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.7. **Exeter Publishing**, New York, 1992.

SAMBROOK J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 540 p.

SBORDONI, V. et al., Bottleneck Effects and the Depression of Genetic-Variability in Hatchery Stocks of *Penaeus-Japonicus* (Crustacea, Decapoda). **Aquaculture**, v. 57, n. 1-4, p. 239-251, 1986.

- SERRANO, G.M. et al. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 6, p. 543-549, 2004.
- SHIKANO, T.; CHIYOKUBO, T.; TANIGUCHI, N. Temporal changes in allele frequency, genetic variation and inbreeding depression in small populations of the guppy, *Poecilia reticulata*. **Heredity**, v. 86, n., p. 153-160, 2001.
- SICA, M. et al. ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. **BMC Genetics**. v. 6, n. 17, p. 1-7, 2005.
- SKOV, E. Are RAPD-markers Reproducible Between Different Laboratories? **Silvae Genetica**, v. 47, n. 5-6, p. 283-287, 1998.
- STURTEVANT, A. H. **A history of genetics**. New York: Haper & Row Publishers, 1965.
- TASSANAKAJON, A. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 110-115, 1997.
- TELLES, M.P.C., et al. Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de *locos* necessários para a estabilidade da divergência estimada. **Ciência Animal Brasileira**. v. 2, n. 2, p. 87-95, 2001.
- TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. Rio de Janeiro: LTC - Livros técnicos e científicos, 2005. 656 p.
- VALETIM, M. et al. Comparação de protocolos para extração do DNA de *Lernaea* sp. (Copepoda: Cyclopoida). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**: v. 25, n. 2, p. 219-222, 2003.
- WAINBERG, A.A.; CAMARA, M. R. Braziliam Shrimp Farming...it's growing, but is it sustainable? In: WORLD AQUACULTURE, 1998, p. 27-30.
- WALDSCHMIDT, A.M. et al. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, p. 421-423, 1997.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for Pcr-Based Typing from Forensic Material. **Biotechniques**, v. 10, n. 4, p. 506-513, 1991.
- WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**. v. 07, p. 524-530, 1990.
- WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis II**. Sunderland: Sinauer, 1996. 445 p.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res**. v. 18, p. 7213-7218. 1990.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic-Markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WOLFUS, G.M.; GARCIA, D.K.; ALCIVAR WARREN, A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. **Aquaculture**, v. 152, n. 1-4, p. 35-47, 1997.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annal of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.

XU, Z. et al. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. **Animal Genetics**, v. 30, n. 2, p. 150-156, 1999.

XU, Z.K. et al. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture**, v. 199, n. 1-2, p. 13-40, 2001.

ANEXOS

ANEXO A. Protocolo de coloração de gel de poliacrilamida em nitrato de prata descrito por Creste et al. (2001).

1 Fixação: o gel aderido a uma das placas de corrida, foi colocada em uma bandeja contendo 1L de solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 1%) permanecendo por 10 minutos sob leve agitação.

2 Lavagem: em água destilada foi realizada a primeira lavagem onde o gel ficou na bandeja por 1 minuto.

3 Oxidação: nessa etapa o gel foi mergulhado em solução de ácido nítrico 1,5% e agitado por 3 minutos.

4 Lavagem: segue a mesma metodologia do passo 2.

5 Impregnação: foi realizada por meio da imersão do gel em solução de nitrato de prata 0,2% agitando-se por 20 minutos.

6 Lavagem: esse passo é caracterizado por duas lavagens do gel em água destilada com tempo de imersão em água de 30 segundos.

7 Revelação: em solução gelada composta por 3% de carbonato de sódio anidro foi imerso o gel agitando-se levemente. Adicionou-se a essa solução 54 μ L de formaldeído 37%. Após cerca de 10-15 minutos foi possível detectar o aparecimento das bandas SSR.

8 Bloqueio: o gel foi colocado em solução de ácido acético 5% e agitado por 5 minutos.

9 Lavagem: segue a mesma metodologia do passo 2.