

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL EM CAMARÕES  
MARINHOS *Rimapenaeus constrictus* (Stimpson,  
1874), UTILIZANDO MARCADORES  
MICROSSATÉLITES E ANÁLISES MORFOMÉTRICAS.**

Thiago Buosi Silva

São Carlos

- 2007 -

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

**CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL EM CAMARÕES  
MARINHOS *Rimapenaeus constrictus* (Stimpson, 1874),  
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES E  
ANÁLISES MORFOMÉTRICAS.**

Mestrando: Thiago Buosi Silva

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr

Dissertação de mestrado como parte  
dos requisitos para obtenção do  
título de mestre pelo programa de  
Pós-Graduação em Genética e  
Evolução da UFSCar.

São Carlos

- 2007 -

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586cp

Silva, Thiago Buosi.

Caracterização populacional em camarões marinhos *Rimapenaeus constrictus* (Stimpson, 1874), utilizando marcadores microssatélites e análises morfométricas/ Thiago Buosi Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2008. 78 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Camarão. 2. Genética de populações. 3. Microssatélites. 4. Morfometria. 5. *Rimapenaeus constrictus*. I. Título.

CDD: 595.3843 (20<sup>a</sup>)

*“Dedico esse trabalho aos meus pais, que acreditaram em mim, me incentivaram e me apoiaram integralmente durante toda essa jornada”.*

“Sábio não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é o que formula as verdadeiras perguntas”.

**Lévi-Strauss**

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução pela formação acadêmica proporcionada e a CAPES pela concessão da bolsa que tornou possível a minha estadia em São Carlos;

Ao Professor Doutor Pedro Manoel Galetti Júnior por ter aceitado minha proposta de trabalho inicial e por todo o ensinamento transmitido ao longo desses anos;

À Professora Patrícia Domingues de Freitas pela valiosa ajuda no decorrer e na finalização da dissertação;

Aos professores do Departamento de Genética e Evolução pelo exímio esforço empregado para formação de bons profissionais da área;

Os Professores e amigos Dr. Adilson Fransozo e Dr. Rogério Caetano da Costa pelo auxílio nas coletas e contribuição no trabalho desenvolvido;

Aos funcionários e técnicos, que pacientemente atenderam os meus pedidos e minhas necessidades no Depto.;

Aos grandes amigos que me ajudaram muito, cada um de uma forma, do decorrer do trabalho e principalmente no fechamento deste: Allysson, Aninha, Artur, Bia, Carla, Júlia, Lelê, Maressa, Marina e Renatinha;

Os amigos de toda hora: Elseve, Suluçu, Gorran, Pinos, Cervini, Euclides, Juliano Ratinho, Hélinho, Allysson e Bruna e todos os companheiros de Departamento e da Graduação, que de uma forma ou de outra contribuíram para essa jornada;

Os velhos e bons amigos que assim permanecem, apesar da distância: Lucas, Conrado, Fabrício, Marcelo, Leandro, Fábio e Luis Fernando;

E por fim, e não menos importante, aos meus pais e minha irmã que sempre me deram todo e qualquer tipo de apoio durante não só esse trabalho, mas por toda a minha vida.

Muito obrigado a todos vocês!!!

## ABSTRACT

Shrimp capture is one of the most important fishing activities and has been growing in the last years due to an increment in the fishing effort and the larger number and enhanced fishing power of the shrimp boats. Thus, most of the penaeid stocks are being threatened by overexploitation. For our object of study we used the marine shrimp species *Rimapenaeus constrictus*, captured off the coast of Guarapari, Espírito Santo and the coast of Ubatuba, São Paulo. These points were strategically chosen since they are located above and below the Cabo Frio upwelling, a potential geographic barrier for the dispersion of marine organisms. Genetic studies, through the development and analysis of molecular microsatellite markers, and morphometric studies were performed in order to determine if there is any structure in the populations of this region. The  $H_E$  and  $H_O$  values of the four developed polymorphic microsatellite loci were 0.502 and 0.283 for Ubatuba and 0.473 and 0.374 for Guarapari. The  $F_{ST}$  estimate between the populations (0.0012;  $p = 0.1500$ ) and probability (Bayesian method;  $p = 0.993$ ) indicate that these populations behave as a single one, contrasting with the results of the multivariate analyses of the morphometric data. The gene flow rate between the populations may be attributed to the pronounced larval dispersion led by the surface current system of the Brazilian coast. Different patterns of growth and weight gain may have been responsible for the structure based on the morphometric data. Although a raise in the sample and microsatellite numbers are necessary, this study was valuable as it produced knowledge that is useful for the conservation of this species.

## RESUMO

A captura de camarões é uma das atividades pesqueiras de maior importância e que vem aumentando nos últimos anos em decorrência de um incremento do esforço de pesca e de um maior número e poder de pesca das embarcações. Desta forma, a maioria dos estoques de peneídeos está sendo ameaçada por uma superexploração. Utilizamos como objeto desse estudo a espécie de camarão marinho *Rimapenaeus constrictus*, capturada no litoral de Guarapari, Espírito Santo e no litoral de Ubatuba, São Paulo. Esses pontos foram estrategicamente escolhidos por situarem-se ao norte e ao sul da Ressurgência de Cabo Frio, uma possível barreira geográfica para dispersão de organismos marinhos. Estudos morfométricos e genéticos, por meio de desenvolvimento e análise de marcadores moleculares microssatélites, foram realizados a fim de desvendar se há estruturação nas populações dessa região. Os valores de  $H_E$  e  $H_O$ , para os quatro locos microssatélites polimórficos desenvolvidos, foram de 0,502 e 0,283 em Ubatuba e de 0,473 e 0,374 em Guarapari. Os valores da estimativa  $F_{ST}$  entre as populações (0,0012;  $p=0,1500$ ) e de probabilidade (método Bayesiano) ( $p=0,993$ ) indicaram que essas populações se comportam como uma metapopulação, contrastando com resultados das análises multivariadas dos dados morfométricos. Estes resultados podem ser reflexos do fluxo gênico existente entre estas populações, devido à grande dispersão larval provocada pelo sistema de correntes de superfície da costa brasileira e no caso da estruturação apontada pelos dados morfométricos, devido à padrões de crescimento e ganho de peso diferenciado.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	9
1.1. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO.....	9
1.2. ATIVIDADE DE CAPTURA DE CAMARÕES.....	10
1.3. <i>Rimapenaeus constrictus</i> COMO OBJETO DE ESTUDO.....	12
1.4. ÁREAS DE ESTUDO.....	15
1.4.1. <i>Ubatuba, São Paulo</i> .....	16
1.4.2. <i>Guarapari, Espírito Santo</i> .....	17
1.5. ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL E MÉTODOS DE ANÁLISE.....	18
1.6. GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO E MARCADORES MOLECULARES.....	20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	26
3.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
3.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE TECIDOS SÓLIDOS.....	27
3.2.1. <i>Extração de DNA em tampão salino</i> .....	28
3.2.2. <i>Extração de DNA em Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico</i> .....	29
3.3. ISOLAMENTO DOS LOCOS DE MICROSSATÉLITES.....	29
3.3.1. <i>Método de enriquecimento com beads magnéticos</i> .....	29
3.3.2. <i>Digestão do DNA e ligação aos oligonucleotídeos</i> .....	30
3.3.3. <i>Ligação das sondas biotinizadas</i> .....	31
3.3.4. <i>Captura dos fragmentos</i> .....	32
3.3.5. <i>Amplificação dos fragmentos de DNA enriquecidos</i> .....	32
3.3.6. <i>Clonagem do DNA e Ligação</i> .....	33
3.3.7. <i>Mini-preps</i> .....	33
3.3.8. <i>Reação de sequenciamento</i> .....	33
3.3.9. <i>Desenhos dos primers</i> .....	34
3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS LOCOS DE MICROSSATÉLITES.....	35
3.4.1. <i>Teste de temperatura de anelamento dos primers</i> .....	35
3.4.2. <i>Amplificação e validação dos locos microsatélites</i> .....	36
3.4.3. <i>Genotipagem dos indivíduos</i> .....	37
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
3.5.1. <i>Análise da variabilidade genética</i> .....	38
3.5.2. <i>Testes paramétricos</i> .....	39
<b>4. RESULTADOS.....</b>	40
4.1. MICROSSATÉLITES.....	40
4.2. ANÁLISES POPULACIONAIS.....	42
4.3. BIOMETRIA.....	46
4.4. TESTES PARAMÉTRICOS.....	46
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	47
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	58
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	59

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Apresentação do trabalho

A proposta inicial desse estudo era prospectar e validar um conjunto de marcadores microsatélites para a espécie de camarão marinho *Rimapenaeus constrictus* (= *Trachypenaeus constrictus*) a partir do desenvolvimento de bibliotecas genômicas enriquecidas. Para tanto, diferentes exemplares foram coletados na região de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo (Brasil). No entanto, tendo em vista a grande escassez de informações a respeito da distribuição natural e padrão de estruturação populacional dessa espécie, optamos por adicionar coletas de material biológico de outra localidade do litoral brasileiro. Escolhemos como pontos de coleta, regiões situadas ao norte e ao sul da Ressurgência de Cabo Frio, localizada no litoral do Rio de Janeiro. É sabido que este local funciona como um importante obstáculo para dispersão gamética e larval de algumas espécies marinhas, atuando como uma barreira geográfica para as diferentes populações, as quais podem encontrar-se diferenciadas.

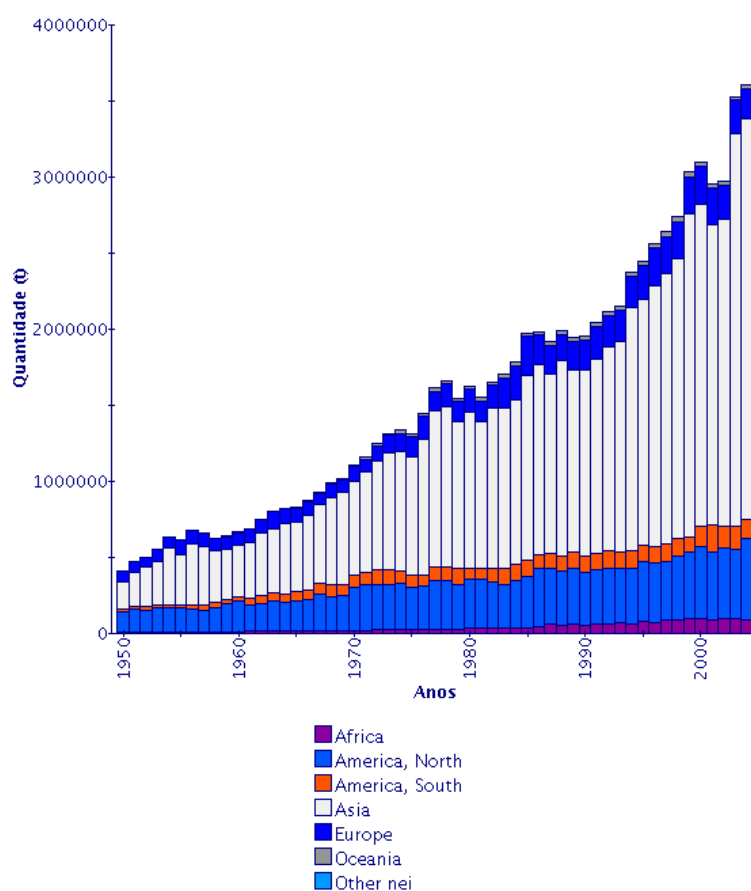
Dentro deste contexto e com o objetivo de enfatizar se as populações naturais de *R. constrictus*, separadas pela Ressurgência de Cabo Frio, apresentam-se com algum grau de diferenciação genética e/ou morfológica, foram coletados exemplares ao norte dessa barreira, no litoral de Guarapari, Espírito Santo e ao sul, no litoral de Ubatuba.

Para a elucidação desse problema, foram calculadas as frequências de alelos entre as populações, heterozigoses observadas e esperadas, Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, probabilidades para déficit de heterozigotos, estimativa do número de populações, perda de variabilidade genética, riqueza alélica, divergência entre as populações e análises discriminantes de dados morfométricos.

## 1.2. Atividade de captura de camarões

A captura de camarões é uma das atividades pesqueiras de maior importância no mundo (D'ONGHIA et al., 1998; CHIOU et al., 2000), principalmente pelo alto valor de comercialização alcançado por sua carne (COSTA, 2002; PINHEIRO, 2004). Estima-se hoje que apenas no nordeste brasileiro, cerca de 100 mil pessoas dependam da pesca camaroeira (SANTOS, 2002) como meio de subsistência.

Um rápido aumento na produção de camarão vem ocorrendo em todo o mundo (Figura 1), como decorrência de um incremento do esforço de pesca e de um maior número de embarcações (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2004). Desta forma, a maioria dos estoques de peneídeos vem sofrendo superexploração.



**Figura 1.** Pesca de camarão no mundo até 2004, segundo FAO ([www.fao.org](http://www.fao.org))

Outro grande problema decorrente do excessivo esforço da pesca sobre os camarões é a captura associada de espécies indesejadas. Na pescaria de arrasto, por exemplo, uma parcela significativa da fauna capturada, como peixes, crustáceos, moluscos, equinodermas e cnidários, são devolvidos ao mar (RODRIGUES et al., 1985; GRAÇA-LOPES et al., 2002; BRANCO; FRACASSO 2004), em geral, porque apresentam baixo valor comercial ou porque estão aquém do tamanho de comercialização desejado (BRANCO; VERANI, 2006). Desse rejeito ou descarte devolvido ao mar, a grande maioria dos indivíduos não consegue sobreviver (BRANCO, 1999). Somente no início dos anos 80 a quantidade total de fauna descartada foi estimada em torno de 3 a 5 milhões de toneladas (NASCIMENTO et al., 1995), superando a quantidade de camarão comercializada no mesmo período (COELHO et al., 1986). Apenas no ano de 1985, a captura total de camarão nas regiões Sudeste e Sul do Brasil atingiu 28.021 toneladas, com uma fauna acompanhante de 308.021 toneladas, o que nos leva a uma proporção média de 1:11 de camarão/fauna acompanhante (CONOLLY, 1986). Branco e Verani (2006), realizando uma análise do impacto da pesca do camarão sete-barbas *Xyphopenaeus kroyeri* na região da Armação do Itapocoroy, Penha, Estado de Santa Catarina, encontraram uma proporção camarão/fauna acompanhante entre 1/3,6 (entre 2001 e 2002) e 1/19,4 (entre os anos 1997 e 1998), corroborando com os dados obtidos por Conolly (1986).

A partir de uma avaliação da pesca de camarões realizada nas regiões sudeste e sul do Brasil entre os anos de 1965 e 1999, constatou-se uma absoluta necessidade de aprimoramento do controle estatístico da atividade pesqueira, em termos de sustentabilidade dos estoques naturais e do estabelecimento de períodos específicos de defeso (D'INCAO et al., 2002). A pesca desordenada conduz a uma alteração nas relações predador-presa, desequilibrando a estrutura funcional das comunidades bentônicas e a utilização de seus recursos (ALVERSON et al., 1994). Isso nos mostra a necessidade de implementação de políticas de proteção e uso sustentável dos estoques naturais de camarões marinhos, bem como uma maior adequação regional para que as

necessidades dos pescadores sejam obtidas, com conseqüente sustentabilidade dos recursos pesqueiros (PINHEIRO, 2004).

### **1.3. *Rimapenaeus constrictus* como objeto de estudo**

Os camarões encontram-se divididos em três grandes grupos: os Caridea e os Stenopodidea, pertencentes à subordem Pleocyemata e os Penaeidea, subordem Dendrobranchiata, ordem Decapoda. Dentro desses grupos existem aproximadamente 2500 espécies descritas, com ampla variação de tamanho (PÉREZ-FARFANTE, 1988).

A espécie *Rimapenaeus constrictus* (STIMPSON, 1874) (Figuras 2A e 2B), anteriormente descrita como *Trachypenaeus constrictus*, pertence à superfamília Penaeoidea, família Penaeidae, a qual inclui as espécies de camarões marinhos mais conhecidas, entre elas, algumas de elevado valor comercial. Outras, porém, constituem itens alimentares importantes para várias espécies da fauna marinha, contribuindo para o equilíbrio trófico desse ambiente. Os camarões peneídeos são encontrados principalmente em ambientes estuarinos e costeiros em profundidades menores do que 100 metros (COSTA, 2002).

Segundo Dall et al. (1990), representantes da família Penaeidae apresentam uma seqüência de desenvolvimento ontogenético similar: uma fase larval planctônica, que inclui os estágios de náuplius, protozoas, mysis e pós-larvas, uma fase juvenil e uma adulta, podendo ocupar diferentes habitats durante o seu ciclo de vida.



**Figura 2:** Fotografia de dois espécimes de *R. constrictus* recém capturados. Fotos de (A) Thiago Buosi Silva e (B) Costa et al., 2003.

A espécie *R. constrictus* é distribuída na costa do Atlântico Ocidental, podendo ser encontrada desde Nova Scotia, no Canadá, até Santa Catarina (Brasil) (PÉREZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997) (Figura 3). Ecologicamente, sua distribuição está relacionada com fatores ambientais, tais como tipo de sedimento e temperatura (COSTA; FRANSOZO, 2004a).



**Figura 3:** Distribuição da espécie *Rimapenaeus constrictus*, segundo Dall, 1990.

*R. constrictus* se caracteriza por ocupar, preferencialmente, sedimentos heterogêneos (COSTA, 2002), como substratos com conchas e lama misturada com cascalho (BRUSHER et al., 1972; WILLIAMS, 1984; D'INCAO, 1995). Alguns autores a descrevem como associadas a fundo com muita matéria orgânica (PINHEIRO, 2004), outros, porém, acreditam que a quantidade de matéria orgânica no sedimento não interfere na distribuição dessa espécie (COSTA; FRANSOZO, 2004a).

Sua distribuição vertical é bastante ampla, sendo encontrada principalmente em águas rasas, por volta dos 30 metros de profundidade (WILLIAMS, 1984; D'INCAO, 1995). Estudos realizados na região de Ubatuba e Caraguatatuba (São Paulo, Brasil) relataram uma maior incidência de indivíduos entre 20 e 25 metros (PINHEIRO, 2004). Costa e Fransozo (2004a), no entanto, realizando algumas análises na região de Ubatuba, demonstraram que esta espécie parece ser mais abundante em profundidades menores do que 10 metros durante o inverno e primavera e em profundidades acima de 10 metros apenas no verão e outono.

Apesar de *R. constrictus* não ser explorada comercialmente, devido ao seu pequeno tamanho, esta espécie tem papel ecológico importante, uma vez que compõe uma parte significativa da cadeia trófica em sua área de distribuição (COSTA; FRANSOZO, 2004b). Alguns estudos relatam taxas diferentes de crescimento entre os sexos, em geral, comuns entre os Peneídeos (BOSCHI, 1969).

Seu período de reprodução é contínuo ao longo do ano, com atividade reprodutiva mais intensa nos meses de verão e menos intensa durante o inverno (COSTA; FRANSOZO 2004b). Seu ciclo reprodutivo é considerado como “Tipo 3” por Dall et al. (1990), no qual o acasalamento e a desova ocorrem em águas abertas (*offshore*), enquanto o recrutamento dos jovens ocorre em áreas próximas à costa (*inshore*). Essa classificação diverge de alguns dados encontrados na literatura. Costa e Fransozo (2004b) encontraram indivíduos em idade reprodutiva tanto próximo quanto longe da costa, enquanto Bauer e Lin (1994) relataram que indivíduos juvenis e adultos podem ser encontrados em águas costeiras.

Em contraste à maioria das espécies de Peneídeos, indivíduos adultos de *R. constrictus* vivem preferencialmente em águas de alta salinidade, geralmente maior que 30‰ (BRUSHER et al., 1972; WILLIAMS, 1984; BAUER; LIN, 1994; COSTA; FRANSOZO, 2004a). Suas pós-larvas também preferem salinidades relativamente altas, ocorrendo, em geral, em locais protegidos, próximos à costa (DALL et al., 1995).

Devido a sua baixa incidência, esta espécie foi considerada como um contribuinte acidental em arrastos realizados na região da Baía de Fortaleza (Ubatuba – SP) (FRANSOZO et al., 2002). Estudos posteriores, porém, estão demonstrando que este é o quinto camarão mais abundante na região de Ubatuba (COSTA, 2002; PINHEIRO, 2004) e de Caraguatatuba (PINHEIRO, 2004). Segundo Criaes et al. (2000), *R. constrictus* corresponde a 1,7% da fauna de peneídeos encontradas na Flórida, EUA.

#### **1.4. Áreas de estudo**

Ressurgência costeira é um fenômeno importante dentre os processos de circulação sobre a plataforma continental (CARVALHO et al., 2003). Embora cubram menos de 1% da superfície total dos oceanos, as áreas de ressurgência contribuem com 50% do estoque pesqueiro mundial (RODRIGUES, 1973), uma vez que este evento atua sobre os mecanismos ecológicos de produção, aumentando a produtividade biológica local (MESQUITA et al., 1989).

O mecanismo de geração da ressurgência costeira é, principalmente, associado à resposta da circulação oceânica ao padrão de ventos, que afasta a camada superficial e promove um movimento ascendente junto à costa (CUSHMAN-ROSIN et al., 1983). A ressurgência do sudeste brasileiro, que ocorre entre Cabo Frio e a Baía de Guanabara (23°01'S, 42°00'W) no estado do Rio de Janeiro, é um importante fenômeno conhecido por sua alta produtividade decorrente do movimento sazonal de corrente ascendente. Este ocorre quando águas profundas frias vindas do Atlântico Sul (ACAS) com alta concentração de nutrientes alcançam a superfície



oceânica, causando um aumento na comunidade de fitoplâncton (CARBONEL; VALENTIN, 1999). A temperatura de superfície do núcleo destes eventos pode ser até 10°C mais fria do que a água adjacente (RODRIGUES; LORENZZETTI, 2001).

Sua ocorrência e intensidade estão associadas a variações locais na velocidade e direção do vento, topografia costeira e queda na batimetria (HEAD et al., 1996). Estudos realizados na região de Cabo Frio mostraram que a ressurgência ocorre nas estações de primavera e verão, onde ventos nordeste persistem por vários dias, criando um gradiente espacial de nutrientes nas condições oceanográficas (GUIMARÃES; COUTINHO, 2000).

Além do aumento de nutrientes na região, a ressurgência de Cabo Frio tem sido reconhecida como um limite entre as regiões Tropical e Temperada (BRIGGS, 1974), podendo ainda apresentar-se como uma barreira física com potencial para separar populações de uma mesma espécie (MAGGIONI et al., 2003), o que tem sido confirmado em alguns estudos realizados com populações de camarões (D'INCAO, 1995; MAGGIONI et al., 2003, VOLOCH; SOLÉ-CAVA, 2005).

Neste contexto geográfico podemos caracterizar ou distinguir regiões ao sul e ao norte desta ressurgência como locais diferenciados em relação, principalmente, às suas características físico-químicas.

#### 1.4.1. Ubatuba, São Paulo

O litoral norte do Estado de São Paulo é assinalado pela grande proximidade da Serra do Mar em relação ao oceano e apresenta uma linha costeira extremamente recortada, formando enseada e baías, que apresentam características de semiconfinamento (MAHIQUES, 1995). A região de Ubatuba é caracterizada por ser transitória entre a fauna tropical-subtropical e a Patagônica, as quais apresentam limite norte entre os Estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo e limite sul entre Rio Grande do Sul e Uruguai (PALÁCIO, 1982).

Sua enseada e arredores são altamente influenciados pela dinâmica das águas costeiras, onde essa massa de água é assistida por altas temperaturas (maiores do que 20° C) e salinidade inferior a 36 (CASTRO-FILHO et al., 1987). Durante o verão ocorre a entrada de uma corrente de água fria vinda do Oceano Atlântico, a Água Central do Atlântico Sul (ACAS), com temperaturas sempre inferiores a 20° C. Esta corrente penetra intensivamente em águas profundas, alcançando zonas costeiras mais rasas. Essa dinâmica leva a formação de uma termoclina severa que pode ser o fator físico mais importante, afetando a distribuição sazonal das espécies da região (COSTA; FRANSOZO, 2004a).

#### 1.4.2. Guarapari, Espírito Santo

A morfologia da plataforma continental do Espírito Santo possui um aspecto bastante heterogêneo devido à ocorrência de embasamentos de naturezas distintas, tais como complexos insulares (rochas ígneas/metamórficas), recifes submersos e bancos de algas calcárias (CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS – UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, 2005).

A região de Guarapari (ES), situada em uma região de influência predominante do centro de alta pressão do Atlântico Sul, caracteriza-se por uma relevante heterogeneidade. Apresenta uma fisiografia variável e exerce importante influência na formação de barreiras que interferem na hidrodinâmica do Oceano Atlântico Sul Ocidental, podendo ainda gerar eventos transitórios como ressurgências ou vórtices ciclônicos, tal como o Vórtice de Vitória. Suas temperaturas médias estão entre 21 e 29°C e a precipitação média anual entre 1300 e 1400 mm, com umidade relativa do ar média próxima a 80%. As taxas médias de precipitação mensais indicaram em 2004 um máximo de 194,3mm (dezembro) e um mínimo de 51,3mm (agosto) (ALBINO et al., 2005).

## 1.5. Estruturação populacional e métodos de análise

A mensuração das características de um indivíduo, ou um grupo de indivíduos, pode evidenciar o nível de especiação induzido pelo conjunto das condições bióticas e abióticas, e contribui para a definição dos possíveis estoques de sua espécie (PALMA; ANDRADE, 2002). Populações podem ser distinguidas por diferentes características fenotípicas ou genotípicas dos seus indivíduos. Aquelas espécies que apresentam dois ou mais estoques distintos (fenotipicamente ou genotipicamente) são ditas estruturadas (ALLENDORF et al., 1987).

A identificação de estoques e de populações é principalmente importante para espécies de interesse comercial, pois com essa informação, programas de manejo para suas características particulares, como tempo de defeso, época de reprodução, ciclo de desenvolvimento, entre outros, podem ser gerenciados. Dessa forma pode-se garantir uma melhor sustentabilidade de estoques a médio e longo prazo (PHILIPP et al., 1993).

As comparações morfométricas, análises de eletroforese de proteínas e DNA têm se mostrado métodos eficientes para analisar a estrutura de uma população (RYMAN et al., 1984; LESLIE; GRANT, 1990; FERGUSON et al., 1995, CREASEY, et al., 2000).

No caso das análises morfométricas, elas têm se mostrado uma metodologia bastante empregada na separação de estoques naturais e também de cultivos. Em camarões peneídeos as medições mais comuns são comprimentos de carapaça, abdômem e total e o peso húmido. Nas fazendas de aquicultura e indústria de pescados costuma-se aferir principalmente o peso corpóreo (para estimativas de taxa de crescimento, taxa de conversão alimentar, peso comercial, e produtividade). Por outro lado, taxonomistas, ecologistas e outros pesquisadores preferem medidas de comprimento, as quais podem ser mais facilmente realizadas no campo e menos susceptíveis a erros de precisão (CHENG; CHEN, 1990; PRIMAVERA et al., 1998).

Em camarões, relações morfométricas de peso e comprimento têm sido efetuadas principalmente em indivíduos adultos, o que torna os resultados enviesados quando extrapolados

para os juvenis (DALL et al., 1990). PRIMAVERA et al., (1998) demonstraram que o estágio de desenvolvimento é a mais importante diferença para relações comprimento-comprimento e peso-comprimento em *Penaeus monodon* cultivados, o que não seria diferente quando extrapolados para populações naturais. A fim de se determinar como essas relações mudam com o tamanho e estágio de vida, uma grande quantidade de medidas, no entanto, devem ser realizadas (CHOW; SANDIFER, 1991).

Embora medida morfométrica seja uma excelente ferramenta para separação de estoques em ambientes naturais, estas apresentam certas limitações, já que animais com as mesmas características morfométricas podem ser frequentemente assumidos como pertencente a uma única população (TZENG, 2004a). A melhor maneira de explicar a existência de diferenças morfológicas entre populações é através de realização de análises multivariadas (THORPE; LEAMY, 1983). Nesse tipo de abordagem a morfologia apresenta dois componentes independentes: o tamanho e a forma (BOOKSTEIN et al., 1985), sendo que a maioria da variabilidade observada em um conjunto de medidas multivariadas deriva do tamanho (JUNQUERA; PÉREZ-GÁNDARAS, 1993).

Segundo Cadrin (2000), funções discriminantes podem ser aplicadas a dados morfométricos de amostras heterogêneas para se desenhar os limites dos estoques. Análises multivariadas de caracteres morfométricos constituem-se em poderosas técnicas para avaliar a variação espacial dos estoques, uma vez que podem fornecer informações complementares àquelas informações derivadas de estudos bioquímicos, fisiológicos e de ciclo de vida. Estas análises têm fornecido interessantes resultados em relação à estrutura de diferentes espécies marinhas (SCHAEFER, 1989). Tendo em vista que as condições físico-químicas do ambiente são variáveis importantes no crescimento dos indivíduos de uma população, inúmeras técnicas univariadas e multivariadas podem ser empregadas para remover o efeito do tamanho nos resultados de estudos de estruturação. Duas dessas técnicas são análise de regressão e métodos alométricos (TZENG, 2004a).

Na literatura encontramos inúmeros trabalhos que investigam a estruturação de populações de diferentes espécies através de dados morfométricos. Molina et al. (2006) encontraram diferenças entre populações de peixes costeiros e continentais da família Pomacentridae, através de análise multivariada de características morfológicas. Silva (2003) apontou, através de dados morfométricos, que populações de sardinha do Mediterrâneo Ocidental e do nordeste do Atlântico estão estruturadas. Populações de peixes da família Sparidae do Atlântico e do Mediterrâneo se mostraram, através de estatísticas multivariadas e univariadas, estruturadas (PALMA; ANDRADE, 2002). Não foi diferente com aranhas do gênero *Homalonychus* em um estudo realizado no Estado da Califórnia, Estados Unidos da América (CREWS; REDIN, 2006).

Diversos trabalhos também têm avaliado os níveis de diferenciação entre as populações de diferentes espécies de camarões (LESTER, 1979; SARDA et al., 1998; AUBERT; LIGHTNER, 2000; TZENG; Yeh, 2002; SUPUNGUL et al., 2000; GARCÍA-MACHADO et al., 2001; BALL; CHAPMAN, 2003; MCMILLEN-JACKSON; BERT, 2003; BORRELL et al., 2004; TZENG, 2004a; VALLES-JIMENEZ et al., 2005). No Brasil são poucos os estudos voltados ao entendimento da estrutura das populações ocorrentes na nossa costa (MAGGIONI et al., 2003; GUSMÃO et al., 2005; VOLOCH; SOLE-CAVA, 2005) e desses, nenhum aborda a espécie *R. constrictus*. Desta forma, estudos que investiguem as populações do camarão *R. constrictus* são de extrema importância para se implementar políticas de manejos sustentáveis para esta importante espécie de camarão marinho.

## **1.6. Genética da Conservação e Marcadores Moleculares**

A determinação da variabilidade genética com o auxílio de marcadores moleculares pode fornecer diferentes níveis de informações, como estrutura de população, nível de fluxo gênico,

relações filogenéticas, padrão de biogeografia histórica e também grau de parentesco (FÉRAL, 2002).

Marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. Eles podem ser utilizados como pontos de referência nos cromossomos e podem ser detectados por diferentes métodos de análise molecular. A função de um marcador, bem como de sua seqüência de nucleotídeos, é geralmente desconhecida, embora em alguns casos, como por exemplo de genes conhecidos, possa se ter conhecimento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os genomas eucarióticos são providos de uma grande gama de diferentes classes de seqüências repetidas de complexidades distintas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Entre estas, podemos citar as Seqüências Simples Repetidas ou (“Single Sequence Repeats” - SSR), descritas primeiramente por Tautz e Renz (1984) e posteriormente denominada de microssatélites por Litt e Luty (1989). SSRs são seqüências nucleotídicas curtas (com 1 a 6 nucleotídeo de comprimento) repetidas em *tandem* e representam hoje a classe mais polimórfica de marcadores moleculares. Devido sua ampla distribuição no genoma de diferentes organismos, seu alto grau de polimorfismo, do padrão de herança Mendeliana e por se tratarem de marcadores co-dominantes, permitindo a identificação dos heterozigotos, estes microssatélites vêm sendo utilizados em diferentes populações com o propósito de avaliar níveis de variabilidade, distância e estruturação genética dentro de sua espécie (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O polimorfismo nos microssatélites é dado pela sua taxa de mutação (SCHUNG et al., 1997; ZANE et al, 2002), que podem variar de acordo com o tipo de repetição (di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídica) e entre grupos taxonômicos (GOLDSTEIN; SCHÖTTERER, 1999). O tamanho dos alelos pode também influenciar em seu polimorfismo, sendo os maiores mais propensos a sofrer mais variações do que os menores. (SCHLÖTTERER et al., 1998).

A alta taxa de polimorfismo desses locos pode ser explicada, principalmente, pelo pareamento errado após o deslizamento ou *slippage* da DNA polimerase durante a replicação (LEVINSON; GUTMAN, 1987) ou pelo *crossing-over* desigual (SMITH, 1976). No primeiro caso, as duas fitas se separam durante a síntese de DNA e ao se realinharem podem o fazer erroneamente, formando alças (FRANCISCO, 2005), que podem ser corrigidas através do mecanismo celular de reparo. Eventualmente, porém, algumas dessas alças podem não ser reparadas, resultando em ganho ou perda de uma ou mais unidade repetitiva (BACHTROG et al., 2000; HARR et al., 2000; KRUGLYAK et al., 2000).

Geralmente SSRs têm sido isoladas e caracterizadas através da construção de bibliotecas genômicas parciais, utilizando-se sondas de seqüências repetitivas (RASSMANN et al., 1991). Métodos complementares como o de enriquecimento e utilização de esferas magnéticas também vêm sendo amplamente utilizadas (HAMILTON et al., 1999).

Um vasto número de locos microssatélites já foi isolado e caracterizado no DNA de diferentes organismos, para diferentes aplicabilidades. Em peneídeos, as primeiras seqüências microssatélites descritas no genoma de peneídeos datam da década de 90 (BAGSHAW; BUCKOLT, 1995). Eles identificaram quatro microssatélites na espécie *Litopenaeus vannamei* (dois dinucleotídeos perfeitos, um trinucleotídeo perfeito e uma seqüência composta, contendo repetições di e trinucleotídicas). Em seguida, uma seqüência pentanucleotídica perfeita, associada às regiões de DNA satélite, também foi identificada no genoma dessa mesma espécie (BAGSHAW; BUCKHOLT, 1997). Embora os autores tenham afirmado que estas seqüências poderiam ser úteis em estudos populacionais e de mapeamento genético, estes nunca efetuaram a validação dos locos.

O genoma dos peneídeos parece ter repetições microssatélite muito longas, dificultando a clonagem e o seqüenciamento de SSRs que possuam ambas as regiões flangeadoras (FREITAS et al., 2007). Algumas comparações demonstraram que microssatélites encontrados em peneídeos (TASSANAKAJON et al., 1998; CRUZ et al., 2001) têm aproximadamente o dobro

do tamanho dos encontrados em outros grupos animais (ESTROUP et al., 1993; BROOKER et al., 1994), podendo, em alguns casos, ser quatro ou até cinco vezes maiores.

A primeira validação de um loco microssatélite (M1) em camarões peneídeos ocorreu somente em 1997, por Wolfus et al. (1997). Este loco, também descrito para espécie *L. vannamei*, se mostrou eficiente para estimar os níveis de variabilidade genética de diferentes populações, incluindo animais SPF (Specific Pathogen Free) livres de patógenos específicos, e estabelecer marcas genéticas específicas. Posteriormente, Tassanakajon et al. (1998) e Ball et al. (1998) validaram, respectivamente, dois e quatro locos microssatélites no genoma do camarão tigre *P. monodon*, e Xu et al. (1999) descreveram 4 locos microssatélites polimórficos para esta mesma espécie de camarão. Em 1999, Moore et al. (1999) descreveram dois locos eficientes para espécie *M. japonicus*.

Entretanto, até meados de 2000, apenas 31 SSRs tinham sido identificados e validados para Peneídeos. Este número, porém, vem aumentando significativamente nos últimos anos (FREITAS et al., 2007). Até junho de 2006 haviam sido publicados em revistas indexadas e no Genbank 304 microssatélites polimórficos não-mononucleotídeos, descritos para 13 espécies de camarão peneídeos: *Farfantepenaeus notialis* (ROBAINAS et al., 2002; ROBAINAS et al., 2003), *F. paulensis* e *F. subtilis* (MAGGIONI; ROGERS 2002), *F. chinensis* (WANG et al., 2005), *F. merguensis* (WANNA et al., 2004), *Litopenaeus schmitti* (ESPINOSA et al., 2001; MAGGIONI et al., 2003; BORRELL et al., 2004), *L. setiferus* (BALL et al., 1998), *L. stylirostris* (VONAU et al., 1999; BIERNE et al., 2000), *M. japonicus* (MOORE et al., 1999), *P. esculentus* (MEADOWS et al., 2003), *P. monodon* (XU et al., 1999; PONGSOMBOON et al., 2000; BROOKER et al., 2000; XU et al., 2001; WUTHISUTHIMETHAVEE et al., 2003; PAN et al., 2004); *L. vannamei* (WOLFUS et al., 1997; CRUZ et al., 2001; MEEHAN et al., 2003; PÉREZ et al., 2005).

Resultados de “cross-amplification”, onde SSRs são amplificados a partir de *primers* primeiramente descritos para outras espécies, eram também praticamente inexistentes, sendo



limitados a poucos locos descritos para *L. vannamei*, que foram também eficientes em *Rimapenaeus byrdi* (= *Trachypenaeus byrdi*) e *Litopenaeus stylirostris* (PÉREZ et al., 2005). Mais recentemente, estas análises vêm sendo incluídas nos trabalhos de descrição de SSRs. Freitas et al. (2006) desenvolveram oito novos locos microssatélites polimórficos em *L. vannamei*, que também foram testados em ampliações heterólogas em outras espécies de peneídeos. Dentre os oito locos testados, dois amplificaram em *L. schmitti*, um em *F. brasiliensis*, dois em *F. paulensis*, quatro em *X. kroyeri* e quatro em *R. constrictus*. Tais locos poderão ser úteis para realizar análise comparativas, entre outras.

Grande parte dos estudos com marcadores moleculares em camarões está voltada para a identificação de estoques estruturados e análises de variabilidade genética (SUPUNGUL et al., 2000; AUBERT; LIGHTNER, 2000; BORRELL et al., 2004). Em populações naturais, especificamente no Brasil, as diferenciações encontradas, até o momento, vêm sendo atribuídas não só à biologia das espécies (GUSMÃO et al., 2005), mas também ao fenômeno da ressurgência de Cabo Frio, no Rio de Janeiro, onde a estruturação populacional do camarão *L. schmitti* foi observada em alguns estudos (D'INCAO, 1995; MAGGIONI et al., 2003). Voloch e Solé-Cava (2005), em estudos conduzidos com a espécie *X. kroyeri*, utilizando aloenzimas, verificaram que a população da costa do estado de São Paulo se diferenciou significativamente das populações do Rio de Janeiro e do Espírito Santo, atribuindo essa diferença também à influência do fenômeno ressurgência.

Dentro desse contexto, a utilização de marcadores moleculares pode ser eficiente para a caracterização de estruturação genética em populações de camarões, incluindo a espécie *R. constrictus*.

Estas análises podem auxiliar na identificação de unidades populacionais ou potencialmente evolutivas e na conservação de espécies de ambientes marinhos.

## 2. OBJETIVOS

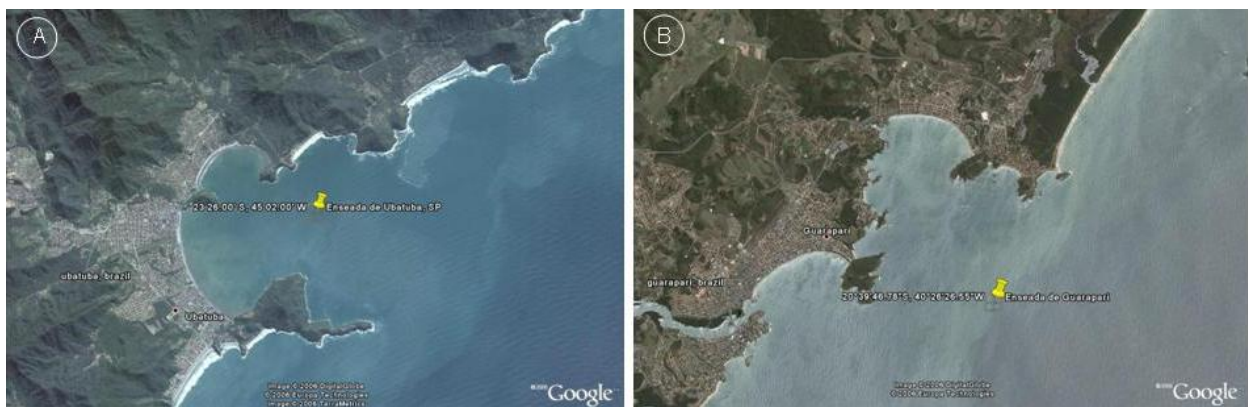
Considerando o exposto, o presente estudo teve como foco a seguinte questão: há estruturação em populações de camarão *Rimapenaeus constrictus* localizadas acima e abaixo da ressurgência de Cabo Frio (Rio de Janeiro), considerada uma importante barreira geográfica para as diversas espécies da fauna marinha? Para tanto estabelecemos como o objetivo geral desse trabalho acessar a variabilidade genética e morfométrica da espécie *R. constrictus* e contribuir com informações úteis para políticas de conservação da espécie. Foram objetivos específicos:

- Prospectar e caracterizar marcadores microssatélites no genoma da espécie *Rimapenaeus constrictus*, através da utilização da metodologia que emprega o uso de esferas magnéticas, visando disponibilizar marcas potencialmente úteis para estudos genéticos e de conservação desta importante espécie de camarão;
- Determinar os níveis de diversidade e diferenciação genética em diferentes populações de *R. constrictus*, no litoral sul do Estado de Santa Catarina e ao norte do Estado de São Paulo;
- Avaliar a existência de diferenciação populacional através de dados morfométricos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção do material biológico

A coleta do material foi realizada ao Norte do litoral do Estado de São Paulo, na região de Ubatuba (23°26'S, 45°02'W) e ao Sul do litoral do Espírito Santo (20°38'S, 40°26'W), separados linearmente por aproximadamente 560Km (Figuras 4A e 4B).



**Figura 4:** Pontos de coleta. A) enseada de Ubatuba (SP) e B) enseada de Guarapari (ES) (Fonte: Google Earth).

As coletas foram realizadas por barcos camaroeiros equipados com duas redes tipo “mexicana” com distância entre-nós de 20 mm na panagem e 15 mm no ensacador. Foram coletados 41 exemplares em Ubatuba e 15 em Guarapari. Os espécimes foram acondicionados em tambores equipados com sistema de aeração até sua manipulação (Figura 5A). Cada indivíduo foi pesado em dinamômetro com carga máxima de 30 gramas e variação de 0,25 gramas e medido com paquímetro de precisão para estudos biométricos e devidamente etiquetados para conservação (Figuras 5B e 5C). Frações da musculatura abdominal foram retiradas e fixadas em álcool etílico absoluto para posterior extração de DNA (Figura 5D).



**Figura 5:** Manipulação do material biológico recém coletado. A) acondicionamento em tanque aerado; B) pesagem; C) medidas e D) tecido muscular para fixação em etanol.

Foram mensuradas o peso fresco (P), comprimento de cefalotórax (Lc), comprimento de abdômem (La) e comprimento total (Lt). Os parâmetros de medida para Lc foram da extremidade posterior da cavidade orbital até a margem posterior da carapaça; de La foi da margem anterior da primeira pleura abdominal até a margem posterior do télson; e de Lt da extremidade posterior da cavidade orbital até a margem posterior do télson.

### **3.2. Extração e quantificação de DNA de tecidos sólidos**

O DNA total foi extraído utilizando-se duas técnicas distintas: a de Tampão Salino, segundo o protocolo descrito por Aljanabi e Martinez (1997), com pequenas modificações e a de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico, descrita por Sambrook et al. (1989), também com

modificações. O DNA foi quantificado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (10mg/mL) em proporção de 1µL para cada 25mL de gel, utilizando-se um marcador de fragmentos de tamanhos e concentrações conhecidos (*Low DNA Mass Ladder<sup>TM</sup>*, *Invitrogen Life Technologies*), como parâmetro de quantificação.

### 3.2.1. Extração de DNA em tampão salino

Para extração de DNA de tecido sólido, porções de 50-100mg da musculatura abdominal, previamente fixadas em etanol absoluto, foram maceradas em nitrogênio líquido em Eppendorfs de 2,0mL, com o auxílio de pistilos de vidro. O material foi homogeneizado em 400 µL de tampão salino composto de cloreto de sódio (NaCl) 0,4 M, Tris ácido clorídrico (Tris-HCl) 10 mM pH=8,0 e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) pH=8,0 a 0,2mM. Posteriormente 40 µL de Sulfato duodecil de sódio (SDS) 20% (Cf=20%) e 8 µL de Proteinase K 20mg/mL (Cf=400 µg/µL) foram adicionados às amostras, que foram agitadas e incubadas em banho-maria a 55-60°C por duas horas e meia.

Após esta primeira etapa, 300µL de NaCl 6M foram adicionados e a solução foi homogeneizada em “vórtex” por 30 segundos à velocidade máxima e centrifugada por 30 minutos à 13.000rpm. O sobrenadante foi então transferido para um outro tubo, onde recebeu igual volume de álcool isopropílico, sendo incubado a -20°C por 1 hora para precipitação do material genético.

Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 13.000rpm. O pellet formado foi lavado com 300µL de etanol 70% e essa nova mistura foi centrifugada novamente por mais cinco minutos. Para finalizar, o DNA foi seco em estufa a 32°C e foi ressuspendido em 70µL de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM).

### 3.2.2. Extração de DNA em Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico

Da mesma maneira do método anterior, porções de 50-100mg da musculatura abdominal foram maceradas em nitrogênio líquido em eppendorfs de 2,0mL, com o auxílio de pistilos de vidro. Entretanto, a solução de digestão utilizada nesse método foi composta por NaCl 1,4 M, Tris-HCl 0,01M pH=8,0, EDTA pH=8,0 a 0,1mM, RNase 100µg/mL e SDS 0,1%. À cada amostra foi acrescentado 1mL dessa solução, que foi incubada em banho-maria a 37° C por 1,5h. Terminada essa fase, as amostras receberam 10µL de Proteinase K 100µg/mL e retornaram ao banho-maria por mais duas horas, porém, dessa vez a 55° C. Em seguida foi acrescentado igual volume de solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) e os tubos agitados por 20 minutos. O material foi centrifugado a 10.000rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo. NaCl 1M e dois volumes de etanol absoluto gelado foram acrescentados, os tubos foram suavemente agitados e depois incubados a -20° C *overnight* para precipitação do DNA. Em seguida o material incubado foi centrifugado a 10.000rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Uma lavagem em 200µL de álcool 70% (gelado) por 5 minutos em centrífuga a 10.000rpm foi efetuada e o sobrenadante foi novamente descartado. O DNA permaneceu em estufa a 34° C para secagem e foi, posteriormente, ressuspendido em 70µL de TE.

### **3.3. Isolamento dos locos de microssatélites**

#### 3.3.1. Método de enriquecimento com beads magnéticos

O isolamento dos locos microssatélites foi realizado através da construção de uma biblioteca genômica, parcialmente enriquecida, para a espécie em estudo, seguindo-se a metodologia proposta por Hamilton et al. (1999). Essa técnica é baseada na captura de

fragmentos de DNA que eventualmente contenham locos microssatélites, utilizando-se sondas biotiniladas de seqüências repetitivas conhecidas e depois recuperadas utilizando-se *beads* magnéticos marcados com estreptavidina (*Streptavidin Magsphere Paramagnetic Particles*<sup>TM</sup>, *Promega*). Aqueles fragmentos de DNA que apresentam seqüências repetitivas e se hibridizam com as sondas que se ligam, posteriormente, às esferas magnéticas, devido a afinidade entre a biotina e a estreptavidina. Estas partículas são capturadas em uma coluna magnética equipada com um ímã. Os demais fragmentos são, então, eliminados após lavagens sucessivas. Esses fragmentos enriquecidos podem ainda ser amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se *primers* que se “anelam” a oligonucleotídeos ligados a ambas as extremidades de cada fragmento, o que torna possível também sua clonagem em vetores específicos com terminações TA.

### 3.3.2. Digestão do DNA e ligação aos oligonucleotídeos

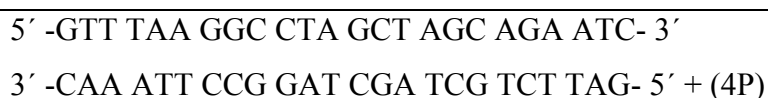
Inicialmente, 2 amostras com aproximadamente 2 µg de DNA de um único indivíduo foram digeridas separadamente com as enzimas de restrição *Rsa* I e *Bst* I (GE Healthcare), conforme descrito abaixo:

0,25µL	BSA (100x)
0,25µL	NaCl 5M (Cf 50mM)
2,5µL	Tampão 2
1,0µL	RSA I ou BSTU I
1,0µL	Xmn I
20,0µL	DNA genômico*
25,0µL	Volume final

\* 200ng/µL

As soluções de digestão com as enzimas Rsa I e BstU I foram mantidas a 37°C e 48°C, respectivamente, por 16h. O DNA digerido foi aplicado em gel de agarose (1%) e os fragmentos com tamanhos entre 300 e 900 pb foram eluídos, utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

No passo seguinte os fragmentos de DNA foram ligados, em ambas as extremidades, a oligonucleotídeos de dupla fita fosfatados (*linkers*), cujas seqüências são discriminadas abaixo:



Esses *linkers* têm a função de disponibilizar sítios de anelamento para os *primers* das reações de PCR subseqüentes e foram ligados conforme a reação abaixo descrita:

7µL	Super SNX <i>Linker</i> (dupla fita)
1,5 µL	10x tampão da DNA ligase
2,0 µL	DNA ligase
4,5 µL	água Milli-Q
15,0 µL	Volume final

Todo o produto purificado é adicionado e incubado à 16° C *overnigth*.

### 3.3.3. LigaçãO das sondas biotiniladas

Os fragmentos de DNA contendo os oligonucleotídeos foram hibridizados a um conjunto de oito sondas biotiniladas de seqüências repetitivas para microssatélites tetranucleotídeos. São elas: (AAAC)<sub>6</sub> (AAAG)<sub>6</sub> (AATC)<sub>6</sub> (AATG)<sub>6</sub> (ACCT)<sub>6</sub> (ACAG)<sub>6</sub> (ACTC)<sub>6</sub> e (ACTG)<sub>6</sub>. Essa reação foi feita em termociclador (PTC-200, MJ Research), programado para uma desnaturaçãO inicial de 95° C por 5 minutos e depois uma queda abrupta para 70° C. Daí em diante houve sucessivas quedas de 0,2° C a cada cinco segundos por 99 vezes consecutivas até atingir a



temperatura de 40° C. A reação foi finalizada e permanece a 15° C. A solução de hibridização utilizada para essa reação está abaixo descrita:

25,0 µL	2x Solução de hibridização (12x SSC, 0,2% SDS)
5,0 µL	Sondas de microssatélites biotinizadas (mix com 10 µM de cada sonda)
10,0 µL	DNA ligado aos <i>linkers</i>
10,0 µL	Água Milli-Q

#### 3.3.4. Captura dos fragmentos

A captura foi realizada com o Kit *Streptavidin Magnetic Sphere Paramagnetic Particles*<sup>TM</sup>, (Promega) conforme especificações do fabricante.

#### 3.3.5. Amplificação dos fragmentos de DNA enriquecidos

Essa etapa foi realizada com o intuito de aumentar, por PCR, o número de fragmentos de DNA previamente enriquecidos. Para tanto utilizamos *primers* com seqüências complementares às dos *linkers*. As condições para essa reação seguem abaixo:

2,5µL	10x Tampão PCR
2,5 µL	BSA
1,3 µL	Super SNX-24* (10 µM – Cf 0,5 µM)
1,5 µL	dNTP (2,5mM – Cf 150 µM)
1,0 µL	MgCl <sub>2</sub> (50mM – Cf 4mM)
14,0 µL	Água Milli-Q
0,2 µL	Taq DNA polimerase
2,0 µL	DNA com linkers
25,0 µL	Volume final

\* seqüência do primer do linker: 5' GTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATC 3'

Essa reação foi feita também em termociclador (PTC-200, MJ Research), programado para uma desnaturação inicial de 95° C por 2 minutos, seguidas por 25 ciclos de 20 segundos a 95° C, 20 segundos a 60° C e 1,5 minutos a 72° C. Terminados os ciclos, as amostras permaneceram a 72° C por meia hora e depois a 15° C por tempo indeterminado.

### 3.3.6. Clonagem do DNA e Ligação

O produto de PCR da amostra de DNA enriquecido foi clonado utilizando-se o kit pGEM®-T Easy Vector System I (Promega), de acordo com as especificações do fabricante.

### 3.3.7. Mini-preps

Após serem plaqueadas em meio sólido, as colônias recombinantes (clones positivos) foram transferidas para placas *Megatiter* de 96 orifícios com auxílio de palitos de madeiras previamente esterilizados. Esses palitos foram mergulhados separadamente nos orifícios da placa, contendo meio líquido. Para realização das mini-preps seguiu-se um protocolo padrão utilizando-se fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Uma réplica das placas foi feita em placas (ELISA) e armazenadas em *freezer* -80 ° C.

Em seguida, alíquotas de 3,0 µL dos produtos de PCR foram aplicadas em gel de agarose a 1% e os insertos com tamanho entre 300 e 900 pb foram escolhidos para serem seqüenciados.

### 3.3.8. Reação de Seqüenciamento

O DNA obtido através das mini-preps das colônias foi amplificado em termociclador PTC-100 (MJ Research) utilizando-se os *primers* M13 *Forward* (5' - CCC AGT CAC GAC GTT

GTA AAA CG -3') e M13 *Reverse* (5'- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG -3'), conforme a reação abaixo descrita:

2,0 µL	Save Money *
2,0 µL	ET Dye
1,0 µL	<i>Primer</i> M13 (10µmol/ µL)
1,0 µL	Água Milli-Q

\* Mix: 200mM Tris pH 9.0 (12,114g); 5mM MgCl<sub>2</sub> (0,51g) e 500mL água

Para essa reação o termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 96° C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 20 segundos a 95° C, 15 segundos a 50° C e 1 minuto a 60° C. Terminados os ciclos as amostras permaneceram a 4° C até serem utilizadas na próxima etapa.

Um total de 46 clones foram seqüenciados em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems Inc.), no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), de responsabilidade do Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva, utilizando-se o kit *DYEnamic™ Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante. Uma segunda alíquota de 46 clones foi enviada para seqüenciamento em MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare) do Centro de Estudos do Genoma Humano, setor de análise de Microssatélites da Universidade de São Paulo (USP), utilizado o Kit *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* , com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase (Amersham Biosciences), conforme especificações do fabricante.

### 3.3.9. Desenho dos primers

As seqüências recebidas de ambos os laboratórios foram submetidas à diferentes softwares, para o devido desenho dos *primers*. O primeiro software a ser usado foi o GENE

RUNNER 3.05 (Hastings Software Inc.). Com o auxílio desse programa conseguimos retirar as seqüências do plasmídio e dos *linkers*. O próximo passo foi encontrar as regiões repetitivas (microsatélites) nas seqüências que possuíamos. Para isso utilizamos o programa TANDEM REPEATS FINDER (BENSON, 1999). Em seguida os *primers* puderam ser desenhados nas regiões flaqueadoras através do programa PRIMER 3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Possíveis problemas que podem ser gerados por dímeros, *loopings* e *hairpins* de *primers* foram minimizados através da análise das seqüências no programa GENE RUNNER 3.05.

### 3.4. Caracterização dos locos de microsatélites

#### 3.4.1. Teste de temperatura de anelamento dos primers

O primeiro passo realizado em laboratório para amplificação dos locos microsatélites caracterizados foi testar os *primers* estabelecidos em reações de PCR em diferentes temperaturas. Essa etapa, que visa encontrar a temperatura ótima de anelamento dos *primers* à sua região complementar do DNA, foi em Termociclador de Gradiente (Eppendorf Mastercycler Gradient). Nesse aparelho pudemos testar uma variação de 12 diferentes temperaturas em uma única reação, que se segue:

1,5 µL	1x PCR <i>buffer</i> *
0,9 µL	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
2,0 µL	dNTP (1,25mM)
1,0 µL	<i>Primer Reverse</i> (8µmol)
1,0 µL	<i>Primer Forward</i> (2µmol)
1,0 µL	<i>Primer M13 Forward</i> (8µmol)
0,1 µL	Taq Dna polimerase (0,5 un.)
6,5 µL	Água Milli-Q
1,0 µL	DNA (50ng)
15,0 µL	Volume final

\* PCR *buffer*: Tris-HCl 200mM pH8,4 e KCl 500mM (Invitrogen Life Technologies)

Assim como nas demais ampliações o termociclador foi programado para uma desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos. Entretanto, nesse passo e nas demais ampliações, trabalhamos com dois ciclos. O primeiro ciclo, do par de *primers* que testamos (94° C por 30 segundos, 56° C ± 8 por 45 segundos e 72° C por 45 segundos) foi repetido 35 vezes. O segundo ciclo, do M13 (94° C por 30 segundos, 53° C por 45 segundos e 72° C por 45 segundos), foi repetido oito vezes. Passadas essa etapas, o termociclador permaneceu a 72° C por 10 minutos e segue a 4° C até a retirada das amostras.

O produto desta reação foi verificado em eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e visualizado em transluminador de luz ultra-violeta. Quando necessário esses géis foram fotografados por sistema de captura de imagem e registrados pelo programa KODAK 1D 3.5.

#### 3.4.2. Amplificação e validação dos locos microssatélites

Os *primers* desenhados para os locos microssatélites foram utilizados em reações de PCR em amostras de 35 espécimes provenientes da Enseada de Ubatuba, Estado de São Paulo. Nessas reações acrescentamos a cada amostra um *primer forward* com seqüência extra (“cauda”) universal do fago M13 (TGT AAA ACG ACG GCC AGT), que foi utilizado, posteriormente, para incorporação de um fluoróforo específico e um *primer reverse* (SCHUELKE, 2000).

Definida a temperatura de anelamento ótima de cada par de *primers*, suas ampliações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ-Research). Tanto o *mix* de PCR, quanto o programa no termociclador de gradiente foram aqui repetidos, porém, com apenas uma temperatura de anelamento. Os produtos de amplificação foram primeiramente visualizados em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídeo e comparados a um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) (Invitrogen Life Technologies). Os locos que não se mostraram polimórficos em agarose foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% em cuba de seqüenciamento vertical e posteriormente corados com nitrato de prata (COMINCINI et al.,

1995) para visualização. Nessa corrida eletroforética utilizamos um marcador de peso molecular de 10pb (Invitrogen Life Technologies).

### 3.4.3. Genotipagem dos indivíduos

Reações de PCR, utilizando-se 30 indivíduos da Enseada de Ubatuba e 15 indivíduos da Enseada de Guarapari, foram realizadas utilizando-se cinco pares de *primers* para os locos de microssatélites isolados nesse trabalho (*Rc01*, *Rc02*, *Rc03*, *Rc04* e *Rc05*).

Para a genotipagem dessas amostras em sequenciador automático, acrescentamos ao mix, além dos 2 *primers* anteriormente mencionados, um terceiro *primer*, marcado com a fluorescência desejada (NED, HEX e 6-FAM; preto, verde e azul, respectivamente) e contendo a seqüência complementar à “cauda” M13 (SCHUELKE, 2000).

Essa reação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research) como descrita abaixo:

1,5 µL	1x PCR <i>buffer</i>
0,9 µL	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
2,0 µL	dNTP (1,25mM)
1,0 µL	<i>Primer Reverse</i> (8µmol)
1,0 µL	<i>Primer Forward</i> (2µmol)
1,0 µL	<i>Primer</i> marcado (8µmol) *
0,1 µL	Taq Dna polimerase (0,5 un.)
6,5 µL	Água Milli-Q
1,0 µL	DNA (50ng)
15,0 µL	Volume final

\* NED, HEM ou 6-FAM

O programa utilizado no termociclador foi o mesmo descrito na etapa anterior, com a temperatura de anelamento específica para cada loco. Cerca de 3 µL do produto de PCR (3µL) foi aplicado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (10mg/mL), para avaliar o

padrão de amplificação dos locos testados. As imagens foram documentadas pelo sistema KODAK 1D 3.5. As amostras amplificadas foram devidamente acondicionadas e enviadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano, setor de análise de Microssatélites da Universidade de São Paulo (USP), para ser genotipado em MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare).

### **3.5. Análises estatísticas**

#### 3.5.1. Análise da variabilidade genética

O *Software* GENEPOP 3.3 (RAYMOND; ROUSSET, 1995) foi utilizado para obtenção das frequências alélicas, que foram posteriormemnte empregadas no cálculo de outras estimativas de variabilidade genética, dos possíveis desvios do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) ( $p < 0,05$ ), e das heterozigosidades esperada ( $H_E$ ) e observada ( $H_O$ ) para cada loco.

As estimativas do valor exato de  $p$ , para o desvio do EHW e deficiência de heterozigotos, foram obtidas pelo algoritmo Cadeia de Markov-MonteCarlo (GUO; THOMPSON, 1992) ( $p < 0,05$ ).

A diferenciação populacional foi estimada pelos índices de fixação de Wright (1978)  $F_{ST}$  e  $F_{IS}$  para cada loco entre as populações de acordo com o método baseado em variância de Weir e Cockerham (1984), utilizando o software FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001). Esse mesmo programa foi utilizado para calcular a significância das estatísticas  $F$ , através de testes de permutação, com correção seqüencial de Bonferroni e os valores de  $F_{ST}$  (proporção da variabilidade atribuída a diferenças entre populações) para os pares de populações. Esse último teste foi utilizado com o intuito de obter o grau de diferenciação genética entre as populações e, para isso, sua significância estatística fora acessada por testes de permutação, utilizando

intervalos de confiança de 95% por *bootstrap* (15.000 réplicas) sobre os locos (CARVALHO-COSTA, 2006).

A estrutura populacional foi calculada também baseada nos genótipos dos indivíduos usando o procedimento Bayesiano modelo-baseado, implementado no software STRUCTURE 2.1 (PRITCHARD et al., 2000). Através deste programa é possível a determinação do número de populações genéticas (K) com base nos genótipos fornecidos, sem fornecer dados discriminados por locais de origem dos indivíduos analisados.

Os valores de riqueza alélica foram estimados através do FSTAT. A riqueza alélica é uma medida do número de alelos que independe do tamanho amostral, e seu cálculo é baseado no método de rarefação de Hurlbert (1971). As diferenças nos valores de riqueza alélica, entre as duas localidades, foram testadas através dos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, Man-Whitney (para amostras independentes) e de Wilcoxon (para amostras relacionadas). Todos esses testes foram efetuados no programa BIOESTAT 3.0 (AYRES et al., 2003).

### 3.5.2. Testes paramétricos

Foram realizadas análises discriminantes para avaliar as diferenças entre camarões provenientes das duas localidades. Para todas as análises não foram considerados os sexos dos indivíduos. Os dados foram transformados através do método de Burnaby a fim de reduzir a influência do tamanho dos indivíduos na análise, para isso foi empregado o programa PAST 1.46 (HAMMER et al., 2001). Todas as análises foram realizadas no programa STATISTICA 6.0 (STATSOFT INC., 1984-2001), sendo considerado um nível de significância de 0,05.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Microsatélites

De um conjunto amostral de 20 espécimes provenientes de Ubatuba foram seqüenciados um total de 93 clones, nos quais 44 apresentaram repetições microsatélites (47,31%). Em alguns desses clones foram encontrados mais de uma seqüência, totalizando 51 microsatélites, sendo 45 simples e 6 compostos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Total de SSRs encontrados nos clones seqüenciados de *R. constrictus*

<b>Classificação</b>	<b>Unidade Repetitiva</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
Simples	Dinucleotídeo	22	43,14
	Trinucleotídeo	8	15,69
	Tetranucleotídeo	12	23,53
	Pentanucleotídeo	3	5,88
Compostos		6	11,76
	Total	51	100

Do total de seqüências foi possível o desenho de *primers* em apenas 10, e destas, em cinco delas foi possível a detecção da temperatura de anelamento ótima.

A seqüência dos *primers*, temperatura ótima de anelamento ( $T_a$ ), a unidade repetitiva ou *motif*, número de alelos e os tamanhos máximo e mínimo dos alelos encontrados estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Características dos 5 locos amplificados, onde Ta = temperatura de anelamento dos *primers*; Na = número de alelos; pb = pares de base.

Loco	Sequencia dos primers (5'-3')	Ta (°C)	Motif	Na	Amplitude (pb)
<b>Rc01</b>	F:GTTGCTTATTGCTGAACC R:GACAACGCCGACTATAAC	57,8	GTT 12	11	294-363
<b>Rc02</b>	F:AATAGGATTCGGATACGC R:AGCAAAAAGTCTGCGTTC	48,1	GTTT 5	3	146-182
<b>Rc03</b>	F:GGCAGCCATGACAGTAAC R:GCTCATCTTTTTGAGGTTTC	51,3	(CAGA)3(CA)2(CAGA)3	1	250
<b>Rc04</b>	F:ACCCAAGCTATGGTCTTC R:ATGCCTGATAAGGGACATC	51,3	(CT)13(ATCT)5	7	166-218
<b>Rc05</b>	F:ATAGAATGTACACACGCC R:TATCAAACCTCTGTCCTCTAG	49,5	(AC)6...(AC)10	7	240-276

As análises efetuadas no *software* GENEPOP não revelaram evidências de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos para o tamanho amostral analisado, como detalhado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Desequilíbrio de ligação entre pares de locos das populações de Ubatuba (Uba) e Guarapari (Gua).  $p = 0,05$ .

População			Valor de p	Desvio Padrão
Uba	Rc01	Rc02	0,34228	0,00494
Uba	Rc01	Rc04	0,84079	0,00540
Uba	Rc02	Rc04	0,87307	0,00164
Uba	Rc01	Rc05	0,49627	0,00946
Uba	Rc02	Rc05	0,79795	0,00236
Uba	Rc04	Rc05	0,08773	0,00340
Gua	Rc01	Rc02	0,74306	0,00296
Gua	Rc01	Rc04	0,94415	0,00082
Gua	Rc02	Rc04	0,80702	0,00137
Gua	Rc01	Rc05	0,49386	0,00347
Gua	Rc02	Rc05	0,22809	0,00244
Gua	Rc04	Rc05	1,00000	0,00000

## 4.2. Análises populacionais

Entre os cinco locos identificados o loco Rc03 mostrou-se monomórfico e não foi considerado para a análise populacional. No total foram encontrados 28 diferentes alelos nas duas populações, para os locos restantes analisados, sendo 11 alelos para o loco Rc01, três alelos no loco Rc02, sete alelos no loco Rc04 e sete no Rc05. Dentre esses alelos, 14 são exclusivos ou privados da população de Ubatuba e quatro exclusivos de Guarapari (Tabela 4).

Os testes de Kruskal-Wallis executados com o programa *BIOESTAT 2.0* para valores de riqueza alélica e diversidade gênica revelaram valores não significativos para essas análises ( $H = 1,47$ ;  $p = 0,225$  e  $H = 0$ ;  $p = 0,99$ , respectivamente).

Os valores de heterozigosidade observada ( $H_O$ ) variaram de 0,267 a 0,429 (Guarapari) e 0,143 a 0,533 (Ubatuba) e os de heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) de 0,373 a 0,602 (Guarapari) e 0,382 a 0,653 (Ubatuba) (Tabela 5). Os locos Rc01 e Rc04 apresentaram déficits significativos de heterozigotos na população de Ubatuba ( $p \leq 0,013$ ) após correção de Bonferroni (Rice, 1989). Esses mesmos locos apresentaram déficit de heterozigotos nesta população de acordo com as proporções de randomizações que deram um valor de  $F_{IS}$  maior do que o observado ( $pL$ ).

Levando em consideração todos os locos, os valores de diversidade gênica não foram diferentes nas duas localidades. Ubatuba apresentou um valor de diversidade de 0,52 e Guarapari de 0,48.

O valor estimado do  $F_{ST}$  ( $\theta$  de Weir e Cockerham, 1984) para os pares de amostras foi 0,0012 ( $p = 0,15$ ), não se observando diferenças significativas entre as duas localidades. Estes dados indicam que há uma alta homogeneidade genética entre as populações para os locos microssatélites utilizados neste trabalho e para o tamanho amostral analisado.

**Tabela 4.** Distribuição dos alelos nos indivíduos de Ubatuba (Uba) e Guarapari (Gua).

Loco	Frequência Alélica		
	Alelo	Uba	Gua
<b>Rc01</b> (11 alelos)	294	-	1
	300	-	9
	306	32	17
	309	6	1
	312	1	2
	321	1	-
	327	2	-
	330	8	-
	333	4	-
	357	1	-
	363	1	-
<b>Na</b>		9	5
<b>Np</b>		6	2
<b>Rc02</b> (3 alelos)	146	-	1
	150	14	7
	182	42	22
<b>Na</b>		2	3
<b>Np</b>		0	1
<b>Rc04</b> (7 alelos)	166	1	-
	168	4	-
	170	32	18
	172	15	12
	174	2	0
	208	1	-
	218	1	-
<b>Na</b>		7	2
<b>Np</b>		5	-
<b>Rc05</b> (7 alelos)	240	2	-
	242	12	4
	244	1	-
	246	1	-
	248	43	22
	250	1	1
	276	-	1
<b>Na</b>		6	4
<b>Np</b>		3	1

onde: Na = número de alelos e Np = número de alelos privados.

**Tabela 5.** Valores de  $H_O/H_E$ , Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*,  $F_{IS}$ , de  $p$  para randomizações de  $F_{IS}$  maiores que o esperado ( $pL$ ) e menores que esperado ( $pS$ ) e de Riqueza Alélica ( $Ra$ ) para os locos polimórficos isolados de *R. constrictus*, em amostragens de Ubatuba (Uba) e Guarapari (Gua).  $p = 0,05$ .

Loco	$H_E/H_O$		$pHW$	$F_{IS}$	$pL (F_{IS})$	$pS (F_{IS})$	$Ra$	
	Uba	Gua	Uba/Gua	Uba/Gua	Uba/Gua	Uba/Gua	Uba	Gua
Rc01	0,653/0,143	0,602/0,267	0,0000/0,1284	0,784/0,566	0,0252/0,252	1,0000/1,0000	7,430	4,864
Rc02	0,382/0,214	0,421/0,400	0,1292/0,5968	0,443/0,051	0,0500/0,6438	1,0000/0,7063	2,000	2,933
Rc04	0,568/0,241	0,497/0,400	0,0000/0,4006	0,579/0,200	0,0189/0,400	1,0000/0,9125	5,120	2,000
Rc05	0,458/0,533	0,373/0,429	0,9658/1,0000	-0,167/-0,156	0,9625/1,0000	0,1625/0,5313	4,586	4,000
Média	0,502/0,283	0,473/0,374					4,784	3,449

Isto nos revela que as amostras comparadas devem pertencer a uma mesma população genética, em que não há subestrutura. Esses dados são corroborados por aqueles encontrados pelo programa STRUCTURE 2.1, por análise Bayesiana implementada, onde os dados são independentes do local de origem ( $K=1$ ,  $p(K/X)=0,99$ , Tabela 6). Por outro lado, dados de diferenciação gênica demonstram que a distribuição de alelos é diferenciada entre as populações apenas para o loco Rc01 (Tabela 7).

**Tabela 6.** Probabilidade,  $p(K/X)$ , para cada um dos possíveis modelos populacionais testados ( $K=1, 2, 3$  e  $4$  populações) pelo software STRUCTURE (*burn-in* 100.000, 200.000 réplicas) para *R. constrictus* amostrados em Ubatuba e Guarapari.  $p = 0,05$ .

<b>K</b>	<b>Estimativa <math>-\ln</math> de</b>	
	<b>probabilidade</b>	<b><math>p(K/X)</math></b>
1	-383,8	0,993106436
2	-392,3	0,000202066
3	-388,8	0,006691499
4	-412,1	5,087 E-13

**Tabela 7.** Valores de  $p$  da diferenciação gênica e diferenciação genotípica dos locos analisados em *R. constrictus*.  $p = 0,05$ .

<b>Locos</b>	<b>Diferenciação</b>	<b>Diferenciação</b>
	<b>Gênica (p)</b>	<b>Genotípica (p)</b>
Rc01	0,00229	0,0616
Rc02	0,54101	0,5868
Rc04	0,39758	0,5679
Rc05	0,78096	0,7132

### **4.3. Biometria**

Os indivíduos coletados em Ubatuba apresentaram peso úmido médio de 0,88 gramas (1,50 g máximo e 0,25 g mínimo), comprimento de cefalotórax médio de 1,18 milímetros (5,45 mm máximo e 0,71 mm mínimo), comprimento de abdômem médio de 2,70 milímetros (3,37 mm máximo e 1,87 mm mínimo) e comprimento total médio de 3,89 milímetros (4,98 mm máximo e 2,54 mm mínimo). As amostras de Guarapari apresentaram peso úmido médio de 2,0 gramas (4,0g máximo e 1,25g mínimo), comprimento de cefalotórax médio de 1,41 milímetros (1,90 mm máximo e 1,22 mm mínimo), comprimento de abdômem médio de 3,68 milímetros (4,50 mm máximo e 3,40 mm mínimo) e comprimento total médio de 5,07 milímetros (6,50 mm máximo e 4,60 mm mínimo).

### **4.4. Testes paramétricos**

Para a análise estatística foram considerados 40 indivíduos de Ubatuba e 15 de Guarapari e os dados foram transformados segundo Burnaby (1996) para redução do efeito do tamanho entre as amostras. Nesse tipo de correção, os dados com maior robustez, ou seja, com maior força estatística, são aqueles que apresentam o valor de lâmbida de Wilk mais próximo de zero.

O resultado da análise discriminante se mostrou com forte poder de separação dos grupos estudados, sendo o valor encontrado para o lâmbida de Wilk para os dados transformados de 0,397. Baseado nessa análise as duas populações apresentaram-se significativamente diferenciadas ( $p < 0,0000$ ;  $F(3,51) = 25,839$ ). A variável Lt (comprimento total) não foi incluída na análise devido seu valor na estatística de tolerância T ( $T < 0,010$ ).

Como o número amostral foi muito pequeno optamos por não separar valores em função do sexo, já que isso levaria a resultados com pouco ou nenhum valor estatístico.

As funções obtidas pela análise discriminante para separação dos locais de coleta encontram-se listadas na Tabela 8. O percentual de acerto de cada função está listado na Tabela 9.

**Tabela 8:** Função de classificação

Variável	Uba	Gua
	p=0,727	p=0,273
Lc	-244,116	-255,178
La	57,851	103,425
Peso	1,819	-5,958
Constante	-282,821	-319,262

Onde: Uba = Ubatuba; Gua = Guarapari; Lc = comprimento da cefalotórax; La = comprimento do abdome.

**Tabela 9:** Matriz de classificação (linhas: classificações observadas; colunas: classificações pré-ditas)

Grupo	% de acerto	Uba p=0,727	Gua p=0,272
Uba	92,5	37	3
Gua	100	0	15
Total	94,5	37	18

Os resultados obtidos através da análise de discriminantes canônicos se apresentaram significativos ( $p < 0,0000$ ), reforçando a existência de duas populações estruturadas ( $R$  canônico = 0,777; Qui-Quadrado = 47,60).

## 5. DISCUSSÃO

Análises genético-populacionais utilizando marcadores moleculares podem fornecer diferentes tipos de informações, tais como níveis de variação genética, presença ou ausência de fluxo gênico, possíveis relações filogenéticas, padrões de biogeografia histórica, grau de



parentesco e níveis de estruturação populacional (FÉRAL, 2002). A estrutura de populações pode ser estudada com base em um conjunto de características genéticas e demográficas de uma espécie e é resultante da interação de uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos (MARTINS, 1987). O nível de diversidade e diferenciação genética existente dentro e entre populações é resultado da diversidade genética disponível e intrínseca de uma espécie e de processos como seleção, fluxo gênico, sistemas de acasalamento. A combinação de todos estes fatores pode distribuir esta variação dentro e entre as populações, diferenciando-as ou não umas das outras (AVISE, 2004).

Muitos estudos que buscam investigar a estrutura genética de populações naturais de camarões têm utilizado os marcadores microssatélites, principalmente, devido os seus altos níveis de polimorfismo e poder informativo. Populações de *P. monodon* (BROOKER et al., 2000) e *P. esculentus* (WARD et al., 2006) na Austrália, de *L. setiferus* nos EUA e Golfo do México (BALL; CHAPMAN, 2003) e de *L. schimittii* em Cuba (BORRELL et al., 2004) tiveram sua estrutura genética caracterizada através do emprego de marcadores microssatélites. Em alguns casos, no entanto, a utilização desses marcadores ainda é restrita, uma vez que o número de locos descrito para algumas espécies de peneídeos é insuficiente (FREITAS et al., 2007). Assim, além do uso de locos microssatélites para caracterizar a estrutura genética de diferentes populações de peneídeos, análises enzimáticas também vêm sendo realizadas para esta finalidade (BENZIE, 2000).

No Brasil, os trabalhos que investigam a estrutura genética de populações nativas de peneídeos ainda são escassos, entretanto, os poucos dados têm apontado para um padrão de diferenciação genética entre populações dentro de uma mesma espécie. Estes resultados, em geral, têm sido relacionados ao fenômeno de ressurgência observado na região de Cabo Frio, fenômeno este que estaria atuando como uma possível barreira, impedindo o fluxo gênico entre as populações e favorecendo a diferenciação genética e estruturação das mesmas.

Voloch e Solé-cava (2005), em estudos com sete locos polimórficos de alozimas, mostraram que as populações de *X. kroyeri* de São Paulo encontram-se geneticamente diferenciadas em relação às do Rio de Janeiro e do Espírito Santo. Estudos, também realizados com alozimas, nas espécies *F. brasilensis*, *L. schimitti*, *F. paulensis* e *Farfantepenaeus sp*, evidenciaram, porém, estruturação somente nas populações de *F. brasiliensis* e *L. schimitti* (GUSMÃO et al., 2005). Em populações de *L. schimitti* do sudeste e do nordeste da costa brasileira, Maggioni et al. (2003) também detectaram presença de estruturação genética nesta espécie.

No presente trabalho, apesar do loco Rc01 ter indicado diferenciação gênica significativa entre as amostras de Ubatuba e Guarapari analisadas, provavelmente devido o seu alto número de alelos privados (o maior entre os locos analisados), os dados gerais, considerando-se o total de locos analisado, não indicaram haver estruturação genética nas populações analisadas. Os valores de  $F_{ST}$  (0,012) e sua probabilidade ( $p = 0,15$ ) indicariam ausência de diferenças genéticas significativas em *R. constrictus* nos dois pontos amostrados. Segundo Wright (1978) e Hartl e Clark (1997), valores de  $F_{ST}$  situados entre 0 e 0,05 sugerem fraca diferenciação genética; valores entre 0,15 e 0,25, diferenciação moderada; e valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação genética. Com base nesse critério, sugerimos não haver diferenciação significativa entre as populações aqui analisadas. Desta forma, os indivíduos de *R. constrictus* amostrados em Ubatuba (26° 44' S, 48° 02' W) e em Guarapari (23° 26' S, 45° 02' W) parecem fazer parte de uma única população panmítica (pelo menos ao longo da costa sudeste do Brasil). Os dados baseados na análise realizada pelo STRUCTURE, também sugeriram não haver diferenciação genética entre as amostras analisadas.

Apesar de outros estudos realizados em algumas espécies de camarões da costa brasileira terem indicado haver estruturação genética significativas entre diversas populações, vários fatores relacionados ao ambiente marinho e à biologia de peneídeos podem interferir no processo de diferenciação e estruturação das populações. Diferenças nos padrões de dispersão (GUSMÃO

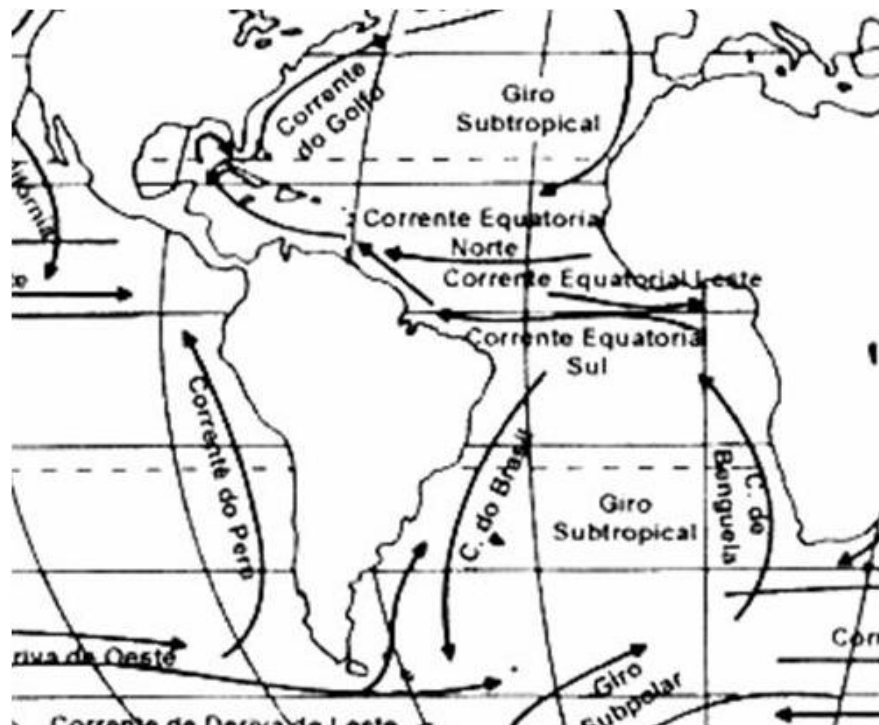
et al., 2005) e preferências ambientais em relação à temperatura da água, salinidade, tipo de sedimento e batimetria (HOLTHUIS, 1980; PAIVA, 1997) dos animais são alguns desses exemplos.

Populações de *F. paulensis*, por exemplo, são geralmente encontradas em águas frias onde a desova ocorre usualmente próximo aos 50 m de profundidade e sua migração encontra-se mais relacionada à profundidade do que à latitude (ZENKER; AGNES, 1977). Ao contrário, *F. brasiliensis* e *L. schmitti* preferem águas quentes, fazendo com que sua migração esteja mais relacionada à temperatura (ZENKER; AGNES, 1977) que aos demais fatores. Isso explicaria o porquê da formação de uma barreira geográfica para dispersão de *L. schmitti* na região de Cabo Frio, região essa que apresenta temperatura até 10° C menores do que as águas adjacentes (RODRIGUES; LORENZZETTI, 2001).

Além dos aspectos biológicos, as correntes marinhas, tanto as de superfície quanto as de sub-superfície, também interferem na dispersão dos animais e, conseqüentemente, nos níveis de estruturação das populações. Correntes de superfície, por exemplo, são criadas através da fricção dos oceanos e o vento. Cerca 2% da energia do vento é transferida para a superfície do oceano (THURMAN e TRUJILLO, 2002). No Brasil são três as principais correntes. A Corrente Equatorial do Sul vem da porção oriental do oceano e alcança a costa brasileira, impulsionada pelos ventos alíseos, na região 10-15°S e se divide em dois braços. A primeira vai em direção ao norte, formando a Corrente Norte do Brasil, enquanto a segunda flui para o sul, próxima à linha da costa, formando a Corrente do Brasil e alcança os 33-38°S (PETERSON; STRAMMA, 1991). Uma terceira corrente, a Corrente das Malvinas, vem do Sul carregando águas mais frias (Figura 6).

Uma outra corrente atuante no Brasil, embora não seja de superfície, é a ACAS. Essa corrente é formada quando a corrente do Brasil, vinda do Norte com águas quentes e de alta salinidade, encontra com as águas frias vindas do sul (30-40°S). Uma parcela dessa água aumenta de densidade, submerge e retorna para o norte e uma outra, principal, para o leste,

formando um importante gradiente de temperatura (EMÍLSSON, 1959). Estudos conduzidos por Costa e Fransozo (2004b), com o intuito de detectar padrões de maturação gonadal em *R. constrictus*, mostraram que essa ocorre continuamente ao longo do ano, atingindo um pico nos meses de verão. Esse padrão de maturação foi relacionado principalmente à disponibilidade de matéria orgânica (BAUER; LIN, 1994; COSTA; FRANSOZO, 2004b).



**Figura 6.** Principais correntes oceânicas mundiais (retirado de PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

Embora diversos autores tenham relacionado a maturação gonadal de peneídeos principalmente à temperatura, onde as desovas ocorrem em águas mais quentes (PÉREZ-FARFANTE, 1969; DALL et al., 1990), esse fator parece não ter influenciado a população da região de Ubatuba, haja visto que nos meses de primavera e verão ocorre o fortalecimento da ACAS e conseqüente queda na temperatura (COSTA; FRANSOZO, 2004b).

Segundo Costa e Fransozo (2004b), a espécie *R. constrictus* é amplamente distribuída na faixa de 30m de profundidade e sua dispersão larval ocorre preferencialmente próxima à superfície (COSTA, comunicação pessoal). Considerando, então, que a temperatura parece não ser o fator determinante na dispersão e desova de *R. constrictus* e que as dinâmicas das correntes influenciam na dispersão larval, podemos sugerir que a Ressurgência de Cabo Frio não tem

agido como uma barreira geográfica para o fluxo gênico dessa espécie. Assim, os indivíduos de Guarapari podem alcançar a região de Ubatuba ainda enquanto larvas pela Corrente do Brasil, principalmente, nos meses de outono e inverno, meses em que a Ressurgência de Cabo Frio perde força. Em contrapartida, indivíduos adultos de Ubatuba, por viverem mais ao fundo, podem alcançar a região de Guarapari pela ACAS. Dessa forma, o fluxo gênico entre as populações, estaria sendo mantido entre as duas localidades, fazendo com que essas populações se comportem como uma única população panmítica geneticamente não diferenciada. Entretanto, apesar dos dados moleculares sugerirem ausência de estruturação, possíveis erros amostrais e/ou metodológicos não podem ser descartados.

No presente trabalho os valores de heterozigidade observada para as duas populações variaram de 0,143 a 0,533 (Ubatuba) e 0,267 a 0,429 (Guarapari). Foi observado um máximo de 9 alelos para população de Ubatuba e 5 alelos para população de Guarapari. Houve déficit de heterozigotos significativo para os locos Rc01 e Rc04 (Ubatuba) com  $p \leq 0,013$ , após correção de Bonferroni.

A deficiência de heterozigotos tem sido um fenômeno amplamente observado em populações de camarões e outras espécies marinhas (HARE et al., 1996; ENGLISH et al., 2000; LUCZYNSKI et al., 2000; Xu et al., 2001; ADDISON; HART, 2004; LUAN et al., 2006). Esta, em geral, tem sido atribuída principalmente à existência de alelos nulos, efeito Wahlund, acasalamentos preferenciais e aumento do endocruzamento, além de amostragem não-aleatória (GARCÍA DE LEÓN et al., 1997). Provavelmente, um ou mais desses fatores devam estar relacionados ao déficit de heterozigotos observado nas populações de *R. constrictus* aqui analisadas.

Apesar dos resultados encontrados no presente trabalho corroborarem com os descritos na literatura, que, em geral, tem reportado dados similares para diversas espécies de camarões peneídeos (MOORE et al., 1999; VONAU et al., 1999; CRUZ et al., 2002; MAGGIONI e ROGERS 2002; MAGGIONI et al., 2003; MEEHAN et al., 2003; WUTHISUTHIMETHAVEE

et al., 2003; WANNA et al., 2004; PÉREZ et al., 2005; WANG et al., 2005; LIU et al., 2006; LUAN et al., 2006; WARD, et al., 2006), algumas exceções têm sido observadas. Tanto o número de alelos quanto os valores de heterozigosidade observada podem apresentar uma ampla amplitude de variação, dependendo dos locos utilizados e das populações analisadas. Sugaya et al. (2002), por exemplo, encontraram valores médios de 1,4 alelos por loco e heterozigosidade de 0,027 em estudos conduzidos com o camarão *P. monodon* na Indonésia. Por outro lado, Meadows et al. (2003) encontraram um máximo de 74 alelos por loco analisado. Um grande número de alelos, no entanto, pode favorecer erros de *scoring* de alelos (O'REILLY et al., 2000), diminuindo a eficiência de tais locos para análises genético-populacionais. Porém, é necessário que haja polimorfismo suficiente para que tais locos se constituam em ferramentas eficientes para estudos que comparam a diversidade genética entre populações (O'CONNELL; WRIGHT, 1997).

Embora as análises moleculares não tenham sugerido a existência de estruturação genética entre as populações estudadas, as análises multivariadas dos dados morfométricos, apontaram diferenças significativas entre as populações de *R. constrictus* das duas localidades amostradas, com  $p < 0,0000$ . Os valores biométricos médios observados para a população de Ubatuba foram semelhantes aos encontrados por Costa e Fransozo (2004b) na mesma região, porém, inferiores e significativamente diferentes dos encontrados para os indivíduos de Guarapari. Obviamente, estas diferenças, parecem não estar correlacionadas com a estrutura genética das populações, as quais ainda mantêm pools gênicos similares e significativamente não diferenciados.

Estudos com dados morfométricos têm sido utilizados em diversas espécies de camarão com o intuito de obter relações entre os padrões de medida (peso e comprimento) e sexo (PRIMAVERA et al., 1998; PEIXOTO et al., 2004; MARIAPPAN; BALASUNDARAM, 2004). Tzeng e Yeh (2002) estudando cinco populações de camarão *P. japonicus* em Taiwan, encontraram estruturação diferenciada em duas delas, a partir de análises multivariadas. O mesmo tipo de análise foi realizado em *Parapenaeopsis hardwickii*, em três localidades da China

e Taiwan, (TZENG, 2004a) e em *Artemesia franciscana* (CAMARGO et al., 2003), demonstrando haver níveis de estruturação diferenciados entre as populações analisadas. Em peixes, análises de dados morfométricos também têm sido eficientes para detectar estruturação populacional em algumas espécies marinhas (MOLINA et al. 2006; SILVA, 2003; PALMA; Andrade, 2002; TZENG, 2004b).

Vários fatores podem favorecer a diferenciação morfológica entre populações de uma mesma espécie, um destes encontra-se intimamente relacionado com pressões de seleção diferenciadas que estas populações venham a sofrer. Estas pressões podem inclusive estar relacionadas com ações antrópicas distintas, como fornecimento de alimento em excesso, introdução de espécies exógenas competitivas, atividade pesqueira intensa, entre outras (Comunicação pessoal de Patrícia Domingues de Freitas, recebida por correio eletrônico).

De acordo com o boletim de estatística da pesca, publicado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais - IBAMA (2005), que apresenta informações sobre a produção pesqueira nacional (Regiões e Unidades da Federação) referente à pesca extrativa e aquicultura (marinha e continental) e balança comercial de produtos pesqueiros, somente no ano de 2004, a pesca no estado do Espírito Santo desembarcou 683,5 toneladas de camarões marinhos, sendo que a frota camaroneira nesse estado é exclusivamente artesanal. Já no estado de São Paulo esses valores alcançaram a ordem de 2.245,5 toneladas de camarões, sendo uma parcela significativa (64,2%) efetuada pela frota pesqueira industrial, que apresenta maiores danos para o ambiente marinho. Dessa forma, o estado de São Paulo sofre muito mais com a força antrópica da pesca, tendo seu habitat degradado com maior severidade.

É válido ressaltar que os 6381 desembarques da pesca extrativa marinha registrada somente no município de Ubatuba em 2004 equivalem a 18,13% do total de desembarques de todo o estado. Somado a isso, a produção de pesca extrativa marinha de Ubatuba no mesmo ano, alcançou 2.812.688 kg, o equivalente a 10,1% da produção total de São Paulo (ÁVILA-DASILVA et al., 2005). É notório que o esforço de pesca e a relação desembarque/produção no

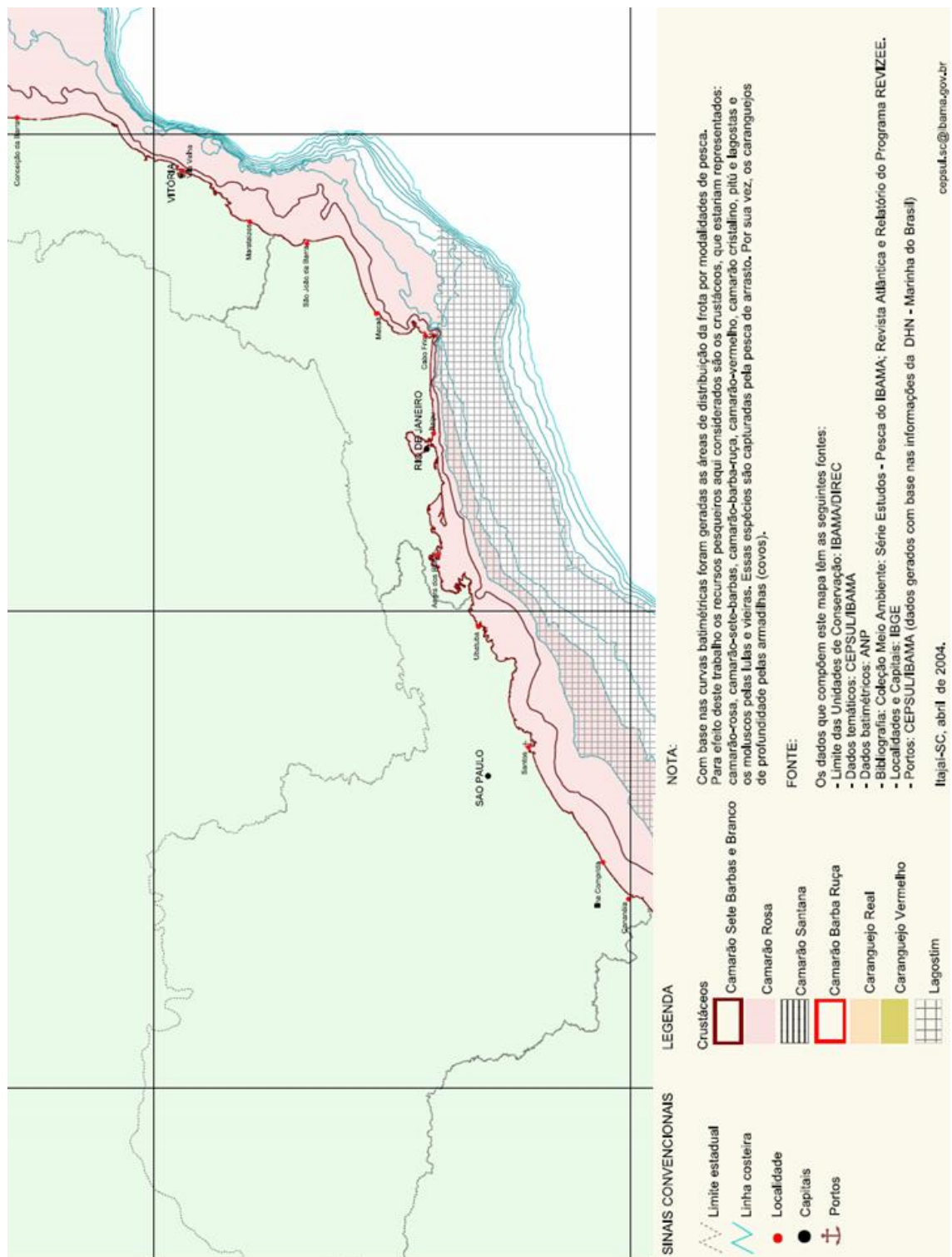
município de Ubatuba são muito grandes, o que reforça a idéia de que essa região encontra-se muito impactada com o esforço da pesca extrativa marinha. Para o município de Guarapari, no entanto, ainda não se tem dados disponíveis na literatura para uma possível análise comparativa. A atividade camaroeira no litoral de São Paulo e Espírito Santo encontra-se ilustrada na Figura 7. Note que a distribuição da frota é muito maior ao longo da costa do litoral Paulista em relação ao Espírito Santo.

Além da atividade da pesca, clinas latitudinais também podem promover pressões de seleção diferenciadas, facilitando uma maior ou menor predação em pontos específicos. O gradiente de diversidade encontra-se relacionado com o aumento da diversidade de espécies que em geral, se dá de um ponto de maior latitude para um de menor latitude. Ele pode ser observado em algumas comunidades de invertebrados e alguns grupos planctônicos. Por exemplo, o litoral da Costa Rica possui cinco vezes mais espécies do que litoral do Estado de Washington, nos Estados Unidos da América. Esse gradiente de diversidade está relacionado ao gradiente de temperatura, causado pelos eventos de resfriamento do clima e glaciação dos pólos que ocorreram nos últimos milhões de anos (LEVINTON, 1995). Além da variação da diversidade de espécies, tem sido proposto gradientes (ou clinas) também em taxas metabólicas, crescimento e tamanho, onde em maiores latitudes existe uma maior taxa de crescimento, indivíduos mais velhos e atraso na maturação. A temperatura e interação temperatura/fotoperíodo têm sido amplamente propostas como algumas das variáveis responsáveis por produzir esse fenômeno (GIESE, 1959; ANNALA et al., 1980; JONES e SIMONS, 1983; LONSDALE; LEVINTON, 1985).

A predação, que aumenta conforme diminui a latitude, também pode agir selecionando indivíduos com menores tamanhos máximo e maturidade, já que diminui a sobrevivência (WALLERSTEIN; BRUSCA, 1982). Diferentes padrões de crescimento e maturação em caranguejos *Brachyura* foram encontrados na costa leste e oeste da América do Norte. Essas



diferenças foram relacionadas às variáveis ambientais causadas pela variação de latitude (HINES, 1989).



**Figura 7.** Área de distribuição da frota camaroneira nos Estados de São Paulo e Espírito Santo, baseado em curvas batimétricas.

Sabe-se também que a combinação de fatores genéticos e ambientais interfere no processo de crescimento (TZENG, 2002a) e a variação das características morfométricas pode ser largamente afetada por fatores ambientais (CHENG; CHEN, 1990; PRIMAVERA et al., 1998; TZENG et al., 2001). Dessa maneira, o fato de as populações das duas regiões amostradas estarem submetidas a ações antrópicas diferentes, pode ser responsável pelo favorecimento dos indivíduos de crescimento mais rápido, no nosso caso, os de Ubatuba. Esse crescimento acelerado, em relação aos indivíduos de outras localidades, pode ter levado a diferentes padrões de ganho de peso e, dessa forma, alterado a relação “peso *versus* tamanho” estabelecida para a espécie. Essa diferença nas relações pode ter sido detectada pelas análises multivariadas de dados morfométricos, apontando para uma estruturação dessas populações.

Parece, portanto, que a ação antrópica, em especial a de pesca, embora esteja conduzindo a uma diferenciação na estruturação morfométrica das populações, ainda é recente e não interferiu na estrutura genética das populações, as quais se mantêm geneticamente similares, formando uma única população. Por outro lado, não podemos esquecer que locos microssatélites, em geral, são considerados marcadores neutros, livres de pressão de seleção e, apesar deles refletirem o genoma como um todo, podem não estar relacionados diretamente com outros locos que estejam contribuindo para as diferenças morfométricas aqui encontradas.

Uma segunda hipótese para se explicar a estruturação morfológica detectada pela análise multivariada é um possível erro amostral. Em estudos morfométricos realizados em *P. monodon*, com relação peso *versus* comprimento, a mais notável diferença para ambos os relacionamentos (comprimento/comprimento e comprimento/peso) é dada pelo estágio de vida/idade (PRIMAVERA et al., 1998).

A transformação dos dados morfométricos é uma regressão que leva em consideração o tipo de crescimento, se alométrico (como nos camarões) ou isométrico, e tende minimizar o efeito do tamanho nas análises. Na análise multivariada, a relação de duas variáveis juntas (peso e comprimento) é levada em consideração, e não valores independentemente (BROOKSTEIN et

al., 1985). Nos nossos estudos as análises multivariadas foram efetuadas com os valores não transformados, visto que apresentaram maior robustez de resultados. Isso nos leva a crer que parcelas proporcionais de cada fase do desenvolvimento estavam presentes nos indivíduos amostrados, diminuindo possíveis efeitos que diferenças relacionadas ao estágio de desenvolvimento animal pudessem ocasionar. Entretanto, como o número amostral de Guarapari foi relativamente menor que o de Ubatuba, a possibilidade de algum erro amostral, por captura não aleatória é maior. Além disso, pode haver diferenças entre as interações relacionadas ao tamanho ainda não conhecidas. O aumento da amostragem bem como da quantidade de marcadores utilizados nas análises, permitirá uma resolução em fina-escala da dinâmica populacional de *R. constrictus*. Porém, no momento, podemos apontar que os dados genéticos e morfométricos obtidos com este trabalho sugerem que uma possível estruturação populacional em *R. constrictus* possa estar em curso e que medidas de conservação devem levar esse aspecto em consideração.

## 6. CONCLUSÕES

- O presente trabalho caracterizou quatro locos microssatélites polimórficos para *R. constrictus*, os quais se mostraram eficientes também para outras espécies de peneídeos nativas e de interesse econômico;
- Níveis similares de variação genética intra-populacional foram encontrados nas duas populações de *R. constrictus* do litoral do sudeste do Brasil ;
- Não foram detectadas diferenças genéticas significativas entre as populações das duas localidades, sugerindo que estas se comportam como uma única população panmítica;

- Os dados biométricos apontaram diferenciação morfológica entre as populações, possivelmente relacionadas às pressões de seleção diferenciadas entre as regiões estudadas;
- Em vista de sua importância na cadeia trófica do ambiente marinho, o presente trabalho se constitui em uma importante ferramenta para elaboração de planos futuros de manejo que visem a sua conservação e manutenção da diversidade genética dessa espécie em seu habitat.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDISON, J.A.; HART, M.W. Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) using microsatellites. **Marine Biology**, v. 144, p. 243-251. 2004.
- ALJABANI, 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.
- ALBINO, J.; Vale, C.C.; GOMES, R.C. **Modelagem, monitoramento, erosão e ocupação costeira**: descrição climática do litoral do Espírito Santo. Vitória: Instituto do Milênio / Recos, 2005.
- ALLENDORF, F.W.; RYMAN, N.; UTTER, F.M. Genetics and fishery management: past, present and future. In: RYMAN, N; UTTER, F. **Population Genetics & Fishery Management**. Washington: University of Washington Press, 1987. p. 1-19.
- ALVERSON, D.L. et al. **A global assessment of fisheries bycatch and discards**. USA: FAO Fisheries Technical Paper, 1994. v. 339, 233p.

- ANNALA, J.H.; McKay, J.L.; BOOTH, J.D.; PIKE, R.B. Size at onset of maturity in female *Jasus edwardsii* (Decapoda: Palinuridae) in New Zeland. **New Zeland Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 14, p. 217-228, 1980.
- AUBERT, H.; LIGHTNER, D.V. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stilirostris* of the Gulf of California, Mexico. **Marine Biology**, v. 137, p. 875-885, 2000.
- ÁVILA-DA-SILVA, A.O. et al. Produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo no ano 2004. In: **Série Relatórios Técnico**. São Paulo. 2005. n. 20, p. 1-40.
- AVISE, J.C. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd ed. Sunderland: **Sinauer Associates**, 2004. 684p.
- AYRES, M. et al. **Bioestat**: Versão 3.0. Belém, Pará, Brasil: Sociedade civil Mamirauá, MCT-CNPQ, 2003.
- BACHTROG, D. et al. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs - Evidence from *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 1277-1285. 2000.
- BAGSHAW, J.C.; BUCKOLT, M.A.; Apliccation of DNA probe technology in shrimp aquaculture. In: **II Congresso Ecuatoriano de Acuicultura**, 1. 1995, Equador. p. 29-33.
- BAGSHAW, J.C.; BUCKHOLT, M.A. A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei* . **Gene**, v. 184, p. 211-214. 1997.
- BALL, A.O.; LEONARD, S.; CHAPMAN, R.W. Characterization of (GT)<sub>n</sub> microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1247-1263. 1998.
- BALL, A.O.; CHAPMAN, R.W. Population genetic analysis of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, using microsatellite genetic markers. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 9, p. 2319-2330. 2003.

- BAUER, R.T.; J. LIN. Temporal patterns of reproduction and recruitment in populations of the penaeid shrimps *Trachypenaeus similis* (Smith) and *T. constrictus* (Stimpson) (Crustacea: Decapoda) from the north-central Gulf of México. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 182, p. 205–222. 1994.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 573-580. 1999.
- BENZIE, J.A.H. Population genetic structure in penaeid prawns. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 1-4, p. 95-119. 2000.
- BIERNE, N. et al. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Aquaculture**, v. 184, p. 203-219. 2000.
- BOOKSTEIN, F. et al. Morphometrics in evolutionary biology. Philadelphia: **Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, Special Publication 15. 1985.
- BORRELL, Y. et al. DNA microsatellite variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp *Litopenaeus schimittii*. **Marine Biology**, v. 114, p. 327-333. 2004.
- BOSCHI, E.E. Estudio biológico pesquero del camarón *Artemesia longinaris* Bate de Mar del Plata. **Boletín del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero**, v. 18, p. 1–47. 1969.
- BRANCO, J.O. **Biologia do *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeidae), análise da fauna acompanhante e das aves marinhas relacionadas a sua pesca, na região de Penha, SC, Brasil**. 1999. 147 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recurso Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de São Carlos, São Carlos, 1999.
- BRANCO, J.O.; FRACASSO, H.A.A. Ocorrência e abundância da carcinofauna acompanhante na pesca do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller) (Crustacea, Decapoda),

- na Armação do Itapocoroy, Penha, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 2; p. 295-301. 2004.
- BRANCO, J.O.; VERANI, J.R. Pesca do camarão sete-barbas e sua fauna acompanhante, na Armação do Itapocoroy, Penha, SC. In: BRANCO, J.O.; MARENZI, A.W.C. **Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável: estudos de caso em Penha, SC**. Itajaí, SC: Editora da UNIVALI, 2006. p. 153-170.
- BRIGGS, J.C. **Marine Zoogeography**. New York: McGraw-Hill, 1974.
- BROOKER, A.I. et al. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatics Sciences**, v. 51, p. 1959-1966. 1994.
- 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, p. 149-157. 2000.
- BRUSHER, H.A.; RENFRO, W.C.; NEAL, R.A. Notes on distribution, size, and ovarian development of some penaeid shrimps in the northwestern Gulf of Mexico, 1961-62. **Contribution of Marine Science**, n. 16, p. 75-87. 1972.
- BURNABY, T.P. Growth-invariant discriminant functions na generalized distances. **Biometrics**, v. 22, n. 1, p. 96-110. 1996.
- CADRIN, S.X. Advances in morphometric identification of fishery stocks. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 91-112. 2000.
- CAMARGO, W.N.; ELY, J.S.; SORGELOOS, P. Morphometric characterization of thalassohaline *Artemia franciscana* populations from the Colombian Caribbean. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 697-702. 2003.

- CARBONEL, C.A.A.; VALENTIN, J.L., Numerical modelling of phytoplankton bloom in the upwelling ecosystem of Cabo Frio (Brazil). **Ecological Modelling**, v. 116, p. 135–148. 1999.
- CARVALHO, G.A., CABRAL, A.P., FERNANDES, M.A.S. Correlação entre o campo de vento médio e um índice que define a intensidade da ressurgência na região do Cabo Frio (23°s / 42°w) através da análise de dados orbitais (quikscat / avhrr). In: **SBSR (escrever por extenso)** Belo Horizonte, Brasil. **Anais XI SBSR, INPE**, 2003. p. 1509 - 1514.
- CARVALHO-COSTA, L.F. **Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (teleostei: characiformes: prochilodontidae) na bacia do Rio São Francisco, região de Três Marias (MG)**. 2006, 69 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- CASTRO-FILHO, B.M.; MIRANDA, L.B.; MIYAO, S.Y. Condições hidrográficas na plataforma continental ao largo de Ubatuba: variações sazonais e em média escala. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 135-151. 1987.
- CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS – UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO (CCHN-UFES). **Relatório do Monitoramento Ambiental – Projeto Recifes Artificiais Marinhos (RAM): Victory 8B**. Espírito Santo: UFES, 2005. Disponível em: [www.iema.es.gov.br/download/Rel\\_Monitoramento2.pdf](http://www.iema.es.gov.br/download/Rel_Monitoramento2.pdf). Acesso em 12 out. 2006.
- CHENG, C.S.; CHEN, L. Growth and relationships among body length and tail weight of *Penaeus monodon* from culture environment in Taiwan. **Aquaculture**, v. 91, p. 253–263. 1990.
- CHIOU W.D.; WU, C.C.; CHENG, L.Z. Spatio-temporal distribution of sergetid shrimp *Acetes intermedius* in the coastal waters of southwestern Taiwan. **Fisheries Science**, v. 66, p. 1014 – 1025. 2000.



- CHOW, S., SANDIFER, P.A., Differences in growth, morphometric traits, and male sexual maturity among pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, from different commercial hatcheries. **Aquaculture**, p.165–179. 1991.
- COELHO, J.A.P. et al. Análise da rejeição de peixes na pesca artesanal dirigida ao camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) no litoral do Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 51-61. 1986.
- COMINCINI, S. et al. Characterization of bovine microsatellites by Silver staining. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 112, p. 415-420. 1995.
- CONOLLY, P.C. Status of the brazilian shrimp fishing operations and results of related research. **FAO General Contribution**, v. 3, p. 1-28. 1986.
- COSTA, R.C. **Biologia e distribuição ecológica das espécies de camarões Dendrobranchiata (Crustacea: Decapoda) na região de Ubatuba (SP)**. 2002. 186 f. Tese (Doutorado em Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2002.
- COSTA, R.C.; FRANSOZO, A. Abundance and ecologic distribution of the shrimp *Rimapenaeus constrictus* (Crustacea: Penaeidae) in the northern coast of São o Paulo State, Brazil. **Journal of Natural History**, v. 38, n. 901- 912. 2004a.
- COSTA, R.C.; FRANSOZO, A. Reproductive Biology of the Shrimp *Rimapenaeus constrictus* (DECAPODA, PENAEIDAE) in the Ubatuba Region of Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 24, n. 2, p. 274–281, 2004b.
- COSTA, R.C. et al. Chave ilustrada para identificação dos camarões *Dendrobranchiata* do litoral norte do estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotrópica**, v. 3, n. 1. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?identificationkey+BN01503012003>, 2003.

- CREASEY, S. et al. Genetic and morphometric comparisons of squat lobster, *Munidopsis scobina* (Decapoda: Anomura: Galatheidae) populations, with notes on the phylogeny of the genus *Munidopsis*. **Deep-Sea Research II**, v. 47, p. 87-118. 2000.
- CREWS, S.C.; HEDIN, M. Studies of morphological and molecular phylogenetic divergence in spiders (Aranae: *Homalonychus*) from the American southwest, including divergence along the Baja California Peninsula. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 38, p. 479-487. 2006.
- CRIALES, M.M.; BELLO, M.J.; YEUNG, C. Diversity and recruitment of Penaeoid shrimps (Crustacea: Decapoda) at Bear Cut, Biscayne Bay, Florida, USA. **Bulletin of Marine Science**, v. 67, n. 2, p. 773-788. 2000.
- CRUZ, P.; et al. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 239-241. 2001.
- CUSHMAN-ROSIN, B.; O'BRIEN J.J.; SMITH, R.L. Notes and correspondence: On wind and ocean-velocity correlations in a coastal-upwelling system. **Journal of Physical Oceanography**, v. 13, n. 3, p. 547-550. 1983.
- DALL, W. et al. The biology of penaeid. In: BLAXTER J. H. S.; A. J. SOUTHWARD. **Advances in Marine Biology**. San Diego: *Academic press*, 1990. 489p.
- D'INCAO, F.; VALENTINI, H.; RODRIGUES, L.F. Análise da pesca de camarões nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. **Atlantica Rio Grande**, v. 24, p. 103-116. 2002.
- D'INCAO, F. **Taxonomia, padrões distribucionais e ecológicos dos Deandrobanchiata (Crustácea: Decapoda) do Brasil e Atlântico Ocidental**. 1995, 365 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, PR. 1995.
- D'ONGHIA, G. et al. Distribution biology and population dynamics of *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) (Decapoda: Natantia: Aristeidae) in the northwestern Ionian sea (Mediterranean Sea). **Crustaceana**, v. 71, n. 5, p. 518-544. 1998.

- EMÍLSSON, I. Alguns aspectos físicos e químicos das águas marinhas braileiras. **Ciência e Cultura**, v. 11, n. 2, p. 44-54. 1959.
- ENGLISH, L.J.; MAGUIRE, G.B.; WARD, R.D. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific lobster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia. **Aquaculture**, v. 187, p. 283-298. 2000.
- ESPINOSA, G.L.; et al. Microsatellites from white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda). **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 18, p. 232-234. 2001.
- ESTROUP, A. et al. Characterization of GT and CT microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 1427-1431. 1993.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture**. 2004. Disponível em: [www.fao.org/DOCREP/007/y5600e/y5600e00.htm](http://www.fao.org/DOCREP/007/y5600e/y5600e00.htm). Acesso em 10 mar. 2006.
- FÉRAL, J.P. How useful are the genetics markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 268, p. 121-145. 2002.
- FERGUSON A. et al. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. **Journal of Fishery Biology**, v. 47, p. 103–126. 1995.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1998. 220 p.
- FRANCISCO, M.R. **Estruturação genética em populações do tangará-dançarino *Chiroxiphia caudata* (Aves, Pipridae) no corredor costeiro da Mata Atlântica (SP) e sua importância para conservação**. 2005, 116 f. Dissertação (Doutorado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 2005.

- FRANSOZO, A.; COSTA et al. Composition and abundance of shrimp species (Penaeidea and Caridea) in Fortaleza bay, Ubatuba, São Paulo, Brazil. **Modern Approaches to the Study of Crustacea**, p. 117-123. 2002.
- FREITAS, P.D.; JESUS, C.M.; GALETTI JR, P.M. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 2, p. 324-326. 2006.
- FREITAS, P.D.; et al. *In silico* analysis of polymorphic microsatellites in penaeid shrimp and construction of a free-access database. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 4, p. 1194-1197. 2007.
- GARCÍA-DE-LEÓN, F.J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of Europe sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Molecular Ecology**, v. 6, p. 51-62. 1997.
- GARCÍA-MACHADO, et al.. Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda). **Marine Biology**, v. 138, p. 701-707. 2001.
- GIESE, A.C. Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates. **Annual Review of Physiology**, v. 21, p. 547-576. 1959.
- GOLDSTEIN, D.B.; SCHÖTTERER, J.M. **Microsatellites, evolution and application**. 1th ed. USA, Oxford: Oxford University Press. 1999.
- GRAÇA-LOPES, R.; et al. Comparação entre a produção de camarão sete-barbas e de fauna acompanhante pela frota de pequeno porte sediada na Praia de Perequê, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 189-194. 2002.
- GOUDET, J. **FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3**. Disponível em <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. 2001.

- GUIMARÃES, M.A., COUTINHO, R. Temporal and spatial variation of *Ulva ssp.* and water properties in the Cabo Frio upwelling region of Brazil. **Aquatic Botany**, v. 66, p. 101–114. 2000.
- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361–72. 1992.
- GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A.M. Population genetic structure of Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus sp.*, *F. brasiliensis*, *F. paulensis* and *Litopenaeus schmitti*: Decapoda: *Penaeidae*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 165–171. 2005.
- HAMILTON, M.B.; et al. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques**, v. 27, p. 500–507. 1999.
- HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: palaeontological statistics software package for education and data analyses. **Paleontologia Eletronica**, v. 4, n. 1, 9p. 2001.
- HARE, M.P.; KARL, S.A.; AVISE, J.C. Anonymous nuclearDNA markers in the American oyster and their implications for the heterozygote deficiency phenomenon in marine bivalves. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, p. 334–345. 1996.
- HARR, B.; ZANGERL, B.; SCHLÖTTERER, C. Removal of Microsatellite Interruptions by DNA Replication Slippage: Phylogenetic Evidence from *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 1001–1009. 2000.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. 1th ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1997.
- HEAD, E.J.H., et al. Plankton dynamics and carbon flux in an area of upwelling off the coast of Morocco. **Deep Sea Research**, v. 43 n. 11e12, p. 1713–1738. 1996.
- HINES, A.H. Geographic variation in size at maturity in brachyuran crabs. **Bulletin of Marine Science**, v. 45, p. 356 - 368. 1989.

- HOLTHUIS, L.B. 1980, FAO species catalogue. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. **FAO Fish. Synopses**, v. 125, n. 1, p. 261. 1980.
- HURLBERT, S.H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology**, v. 52, p. 577–586. 1971.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (IBAMA) - **Estatística da Pesca 2004. Grandes regiões e unidades da Federação.** Disponível em: [http://200.198.202.145/seap/pdf/cogesi/boletim\\_2004.pdf](http://200.198.202.145/seap/pdf/cogesi/boletim_2004.pdf). Acesso em 28 set. 2005.
- JONES, M.B.; SIMONS, M.J. Latitudinal variation in reproductive characteristics of a mud crab, *Helice crassa* (Grapsidae). **Bulletin of Marine Science**, v. 33, p. 657-670. 1983.
- JUNQUERA, S.; PÉREZ-GÁNDARAS, G. Population diversity in Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) as revealed by multivariate analysis of morphometric and meristic characters. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 50, p. 383-391. 1993.
- KRUGLYAK, S. et al. Distribution and Abundance of Microsatellites in the Yeast Genome Can Be Explained by a Balance Between Slippage Events and Point Mutations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 1210-1219. 2000.
- LESLIE, R.W.; GRANT, W.S. Lack of congruence between genetic and morphological stock structure of the Southern African anglerfish *Lophius vomerinus*. **South African Journal of Marine Science**, v. 9, p. 379–398. 1990.
- LESTER, L.J. Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. **The Journal of Heredity**, v. 70, n. 3, p. 175-180. 1979.
- LEVINTON, J.S. **Marine Biology: Function, Biodiversity, Ecology.** USA, Oxford, 1995: Oxford University Press. 420 p.

- LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 203-221. 1987.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401. 1989.
- LIU, P.; MENG, X.H.; KONG, J. Polymorphic analyses of microsatellite DNA in wild populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 6, p. 556-562. 2006.
- LONSDALE, V.J. e LEVINTON, J.L. Latitudinal differentiation in embryonic duration, egg size, and newborn survival in a harpacticoid copepod. **Biology Bulletin**, v. 168, p. 419-431. 1985.
- LUAN, S; KONG, J; WANG, Q.Y. Genetic variation of field and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. **Aquaculture Research**, v. 37, p. 785-792. 2006.
- LUCZYNSKI, M. et al. Biochemical genetic characteristics of four Polish sea trout (*Salmo trutta trutta*) populations. **Polskie Archiwum Hydrobiologii**, v. 47, p. 21-28. 2000.
- MAGGIONI, R.; ROGERS, A.D. Microsatellite primers for the three Western Atlantic *Farfantepenaeus* prawn species. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 51-53. 2002.
- MAGGIONI, R.; ROGERS, A.D.; MACLEAN, N. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3213-3217. 2003.
- MAHIQUES, M.M. Sedimentary dynamics of the bays of Ubatuba, State of São Paulo, Brazil. **Journal of Shellfish Research**, v. 17, n. 4, p. 931-935. 1995.

- MARIAPPAN, P; BALASUNDARAM, C. Studies on the morphometry of *Macrobrachium nobilii* (Decapoda, Palamonidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 3, p. 441-449. 2004.
- MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação in situ. **IPEF**, v. 35, p. 71-78. 1987.
- MCMILLEN-JACKSON, A.L.; BERT, T.M. Disparate patterns of population genetic structure and populations history in two sympatric penaeid shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the eastern United States. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2895-2905. 2003.
- MEADOWS, J.R.S. et al. Characterization of 23 tri- and tetranucleotide microsatellite loci in the Brown Tiger Prawn, *Penaeus esculentus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 454-456. 2003.
- MEEHAN, D. et al. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Crustacea, Decapoda). **Marine Biotechnology**, v. 5, p. 311-330. 2003.
- MESQUITA, A.R.; LEITE, J.B.A.; RIZO, R. Patterns of instability in a region of shelf break upwelling. **Proc. SIUEC**, v. 2, p. 425-436. 1989.
- MOLINA, W.F., SHIBATTA, O.A.; GALETTI-JR, PM. Multivariate morphological analyses in continental and island populations of *Abudefduf saxatilis* (Linnaeus) (Pomacentridae, Perciformes) of Western Atlantic. **Pan-American Journal of Aquatic Science**, v. 1, n. 2, p. 49-56. 2006.
- MOORE, S. S. et al. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. **Aquaculture**, v. 173, p. 19-32. 1999.
- NASCIMENTO, P.A.M. et al. Cultivar camarões. A chance de mitigar os impactos ambientais da pesca. **Panorama da Aqüicultura**, v. 05, p. 19-21. 1995.



- O'CONNELL, M.; WRIGHT, J.M. Microsatellite DNA in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, p. 331-363. 1997.
- O'REILLY, P.T. et al. Isolation of twenty low stutter di- and tetranucleotide microsatellites for population analyses of walleye Pollock and other gadoids. **Journal of Fish Biology**, v.50, p. 1074-1086. 2000.
- PAIVA, M.P. **Recursos pesqueiros estuarinos e marinhos do Brasil**. Avaliação do potencial sustentável de recursos vivos na zona econômica exclusiva. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1997. 286 p.
- PALACIO, F.J. Revisión zoogeográfica marina Del sur Del Brasil. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 31, n. 1, p. 69-92. 1982.
- PALMA, J.; ANDRADE, J.P. Morphological study of *Diplodus sargus*, *Diplodus puntazzo*, and *Lithognathus mormyrus* (Sparidae) in the eastern Atlantic and Mediterranean. **Sea Fisheries Research**, v. 57, p. 1-8. 2002.
- PAN, Y-W. et al. Isolation and Characterization of 23 polymorphic microsatellite markers for diversity and stock analysis in tiger shirmp (*Penaeus monodon*). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 345-347. 2004.
- PEIXOTO, S. et al. Morphometric relationship of weight and length of cultured *Farfantepenaeus paulensis* during nursery, grow out, and broodstock production phases. **Aquaculture**, v. 241, p. 291–299. 2004.
- PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. Brasil: Editora Interciência, 2002. 382p.
- PÉREZ, F. et al. Development of EST\_SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus byrdi*. **Marine Biotechnology**, v. 7, p 554-569. 2005.

- PÉREZ-FARFANTE, I. Western Atlantic Shrimps of the genus *Penaeus*. **Fishery Bulletin U.S.**, v. 67, p. 461-590. 1969.
- PÉREZ-FARFANTE, I. Illustrated key to Penaeoid shrimps of commerce in the Americas. NOAA Technical Report, **NMFS**, v. 64, p. 1-32. 1988.
- PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. **Penaeoid and Segestoid Shrimps and Prawns of the World**. Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Paris: Memoires Muséum National d'Histoire Naturelle, 1997. v. 175, 233 p.
- PETERSON, R.G.; STRAMMA, L. Upper level circulation in the South Atlantic Ocean. **Progress in Oceanography**, v. 26, p. 1-73. 1991.
- PHILIPP D.P., EPIFANIO, J.M.; JENNINGS, M.J.. Point/counterpoint: conservation genetics and current stocking practices – are they compatibly? AFS Issues. **Fisheries, (Aquat. Fish. Sci.)**, v. 18, n. 12, p. 15-16. 1993.
- PINHEIRO, A. P. Biodiversidade de *Penaeoidea* (Crustácea: Decapoda) do litoral norte do estado de São Paulo. 2004, 89 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2004.
- PONGSOMBOON, S. et al. Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Science Asia**, v. 26, p. 1-8. 2000.
- PRIMAVERA, J.H.; PARADO-ESTEPA, F.D.; LEBATA, J.L. Morphometric relationship of length and weight of giant tiger prawn *Penaeus monodon* according to life stage, sex and source. **Aquaculture**, v. 164, p. 67–75, 1998.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotypic data. **Genetic**, v. 155, n. 945-959. 2000.
- RASSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Electrophoresis**, v. 12, p. 113 – 118. 1991.

- RAYMOND, M.; ROUSSET, M. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249. 1995.
- RICE, W.R. Analysing tables os statistical tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223-225. 1989.
- ROBAINAS, A. et al. Microsatellite loci from the pink shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea, Decapoda). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 344-345. 2002.
- ROBAINAS, A.; ESPINOSA, G.; MACHADO, E.G. Characterization of the pink shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea, Decapoda) microsatellite DNA. **Reviews of Investigation Marine**, v. 24, p. 161-164. 2003.
- RODRIGUES, R.F. **Upwelling at Cabo Frio (Brazil)**. 1973, 89 f. Dissertação (Mestrado), Naval Posgraduate School Monterray, Califórnia. 1973.
- RODRIGUES, E.S. et al. Levantamento das espécies de camarão presentes no produto da pesca dirigida ao camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller, 1862) no estado de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 77-85. 1985.
- RODRIGUES, R.R.; LORENZZETTI, J.A. A numerical study of the effects of bottom topography and coastline geometry on the southeast brazilian coastal upwelling. **Continental Shelf Research**, v. 21, p. 371-394. 2001.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. PRIMER 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S.; Misener, S. **Bioinformatics Methods and Protocols**. Totowa: Humana Press. 2000. p. 365–386.
- RYMAN, N.; LAGERCRANTZ, U.; ANDERSSON, L.; CHAKRABORTY, R.; ROSENBERG, R. Lack of correspondence between genetic and morphologic variability patterns in Atlantic herring (*Clupea harengus*). **Heredity**, v. 53, p. 687–704. 1984.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- SANTOS, M.C.F. Biologia populacional e manejo da pesca do camarão branco *Litopenaeus shmitti* (Burkenroad, 1936) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) no nordeste oriental do Brasil. 2002, 200 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Pernambuco, Recife. 2002.
- SARDÀ, F. et al. Enzymatic and morphometric analyses in Mediterranean populations of the rose shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 221, p. 131–144, 1998.
- SCHAEFER, K.M. Morphometric analysis of Yellowfin tuna *Thunnus albacares* from the Pacific Ocean. **Inter-American Tropical Tuna Commition**, v. 19, n. 5, p. 389-427. 1989.
- SCHLÖTTERER, C. et al. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 1269–1274. 1998.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234. 2000.
- SCHUNG, M.D.; MACKEY, T.F.C.; AQUADRO, C.F. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. **Nature Genetics**, v. 15, p. 99-102. 1997.
- SILVA, A. Morphometric variation among sardine (*Sardina pilchardus*) populations from the northeastern Atlantic and the western Mediterranean. **Journal of Marine Science**, v. 60, p. 1352-1360. 2003.
- SMITH, G.P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science**, v. 191, p. 528–535. 1976.
- SUPUNGUL, P. et al. Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. **Marine Biotechnology**, v. 2, p. 339 – 347. 2000.

- SUGAYA, T.; IKEDA, M.; TANIGUCHI, N. Relatedness structure estimated by microsatellites DNA and mitochondrial DNA polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms analyses in the wild population of kuruma prawn *Penaeus japonicus*. **Fisheries Science**, v. 68, p. 793-802. 2002.
- TASSANAKAJON A. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v.7, p. 55 – 61. 1998.
- TAUTZ, D. e RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4126 – 4138. 1984.
- THORPE, R.S. e LEAMY, L. Morphometric studies in inbred and hybrid House mice (*Mus sp.*): multivariate analysis of size and shape. **Journal of Zoology**, v. 199, p. 421-432. 1983.
- THURMAN, H.V. e TRUJILLO, A.P. **Essentials of Oceanography**. 7th ed. Prattice-Hall, 2002 524 p.
- TZENG, T.; CHIU, C.; YEH, S. Morphometric variation in red-spot prawn (*Metapenaeopsis barbata*) in different geographic waters of Taiwan. **Fisheries Research**, v. 53, p. 211-217. 2001.
- TZENG, T.D. e YEH, S.Y. Multivariate allometric comparisons for kumura shrimp (*Penaeus japonicus*) off Taiwan. **Fisheries Research**, v. 59, p. 279-288. 2002.
- TZENG, T.D. Stock identification of sword prawn *Parapenaeopsis Hardwickii* in the East China Sea and Taiwan Strait inferred by morphometric variation. **Fisheries Science**, v. 70, p. 758–764. 2004a.
- TZENG, T.D. Morphological variation between populations of spotted mackerel (*Scomber australasicus*) of Taiwan. **Fisheries Research**, v. 68, p. 45-55. 2004b.

- VALLES-JIMENEZ, R.; CRUZ, P.; PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. **Marine Biotechnology**, v. 6, p. 475-484. 2005.
- VOLOCH, C.M.; SOLÉ-CAVA, A.M. Genetic structure of the sea-bob shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller, 1862; Decapoda, Penaeidae) along the Brazilian southeastern coast. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 254-257. 2005.
- VONAU, V. et al. Three polymorphic microsatellites in the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Animal Genetics**, v. 30, p. 234-235. 1999.
- WALLERSTEIN B.R.; BRUSCA R.C. Fish predation: a preliminary study of its role in the zoogeography and evolution of shallow water idoteid isopods (Crustacea: Isopoda: Idoteidae). **Journal of Biogeography**, v. 9, p. 135-150. 1982
- WANG, H.; LI, F.; XIANG, J. Polymorphic EST-SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, v. 249, p. 107-114. 2005.
- WANNA, W. et al. Population genetic structure of *Penaeus merguensis* in Thailand based on nuclear DNA variation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 311, p. 63-78. 2004.
- WARD, R.D. et al. Population genetic structure of the brown tiger prawn, *Penaeus esculentus*, in tropical northern Australia. **Marine Biology**, v. 148, p. 599-607. 2006.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370. 1984.
- WILLIAMS, A.B. **Shrimps, Lobsters and Crabs of the Atlantic Coast of the Eastern United States, Maine to Florida**. Washington, D.C.: *Smithsonian Institution Press*, 1984. 550 p.
- WOLFUS, G.M.; GARCIA, D.K.; ALCIVAR-WARREN, A. Application of the microsatellite technique for analysing genetic diversity breeding programs. **Aquaculture**, v. 152, p. 35-47. 1997.

- WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4: Variability Within and Among Natural Populations**. Chicago, IL: The University of Chicago Press. 1978.
- WUTHISUTHIMETHAVEE. et al. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp. **Aquaculture**, v. 224, p. 39-50. 2003.
- XU, Z. et al. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. **Animal Genetics**, v. 30, p. 150 – 156. 1999.
- XU, Z. et al. Genetic diversity of wild and culture Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture**, v. 199, p. 13-40. 2001.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16. 2002.
- ZENKER, H.H. e AGNES, J.L. Distribuição do camarão-rosa *Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis* ao longo da costa Sudeste e Sul do Brasil. **S. Doc. Tec., SUDEPE-PDP**, v. 21, p. 1-105. 1977.