

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Danielly Veloso Blanck

**SNPs NO GENE DA HSC70 E SUAS IMPLICAÇÕES NA CARCINICULTURA E
CONSERVAÇÃO DOS ESTOQUES DE CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA (*Macrobrachium
amazonicum*)**

São Carlos - SP
Junho – 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Danielly Veloso Blanck

**SNPs NO GENE DA HSC70 E SUAS IMPLICAÇÕES NA CARCINICULTURA E
CONSERVAÇÃO DOS ESTOQUES DE CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA (*Macrobrachium
amazonicum*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências com área de concentração em Genética Evolutiva.

Autora: Danielly Veloso Blanck

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr

São Carlos - SP
Junho – 2013

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

B641sg

Blanck, Danielly Veloso.

SNPs no gene da HSC70 e suas implicações na
carcinicultura e conservação dos estoques de camarão-da-
amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) / Danielly Veloso
Blanck. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

122 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2013.

1. Genética. 2. Crustáceos (Biologia). 3. Proteína. 4.
Choque térmico. 5. Variabilidade genética. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

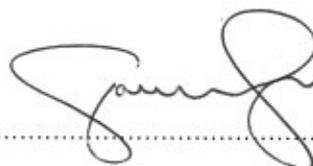
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**“SNPs NO GENE DA HSC70 E SUAS IMPLICAÇÕES NA
CARCINICULTURA E CONSERVAÇÃO DOS ESTOQUES DE CAMARÃO-
DA-AMAZÔNIA (*Macrobrachium amazonicum*)”**

Tese de Doutorado de
DANIELLY VELOSO BLANCK

Banca Examinadora:

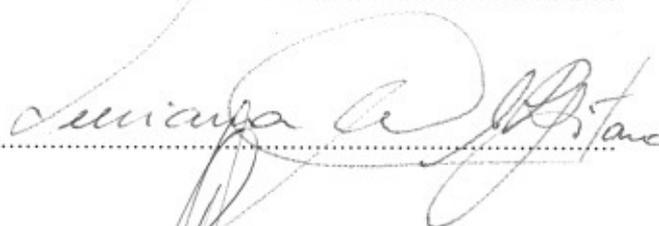
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior



Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito



Profa. Dra. Luciana de Almeida Correia Regitano



Prof. Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo



Dr. Marcello Villar Boock



Dedico esta tese aos meus pais, Rainhart e Laurenice, a quem declaro aqui minha eterna gratidão, admiração e respeito. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular;

Ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos;

À Capes;

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior e co-orientadora “extraoficial” Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas, pela oportunidade de desenvolver este trabalho;

À equipe do setor de carcinicultura do CAUNESP (Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal-SP), em especial o Prof. Dr. Wagner C. Valenti por ceder a estrutura física e material de consumo necessários para o desenvolvimento de parte da tese e o MSc. José Mario de Aquino Penteado por me ensinar e ajudar no manejo diário durante o cultivo dos camarões;

À Profa. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio, por ceder as amostras das populações naturais de camarão-da-amazônia;

À equipe do LabBMC (Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação) pelas trocas de experiências e também pelos momentos de boas risadas, e em especial, à Bia Sasamoto, aluna de iniciação científica que muito contribuiu na amplificação e análises de sequências.

Aos amigos que me deram suporte emocional ao longo do desenvolvimento desta tese (citados na ordem das amizades mais antigas para as mais novas): Carla Guinart, Ane Almeida, Rafael Bernardo, Michelle Mantovani, Roberto Lui, Karen Giselle Rodríguez Castro, Eliana Paviotti e William Gomez Rivera;

Aos meus pais, Rainhart Blanck e Laurenice Veloso, por estarem sempre ao meu lado apoiando e mostrando-me os melhores caminhos a serem seguidos, nunca medindo esforços para meu sucesso pessoal...

...Enfim, agradeço a todos que encontrei nesta caminhada, mesmo que o nome eu não tenha mencionado, e que de alguns nem recorde os nomes, rostos e atos...Todos os encontros me proporcionaram um grande aprendizado...Portanto...

...Muito obrigada a todos!!!

Dificuldades e obstáculos são fontes valiosas de saúde e força para qualquer sociedade.

Albert Einstein

Costumávamos pensar que nosso futuro estava nas estrelas. Agora sabemos que ele está nos nossos genes.

James Watson

BIOGRAFIA

Danielly Veloso Blanck, filha de Rainhart Blanck e Laurenice Veloso. Nasceu no município de Cascavel, Estado do Paraná, aos 21 dias do mês de janeiro de 1983.

Em fevereiro de 2006 concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá, tendo realizado maior parte dos seus estudos na área de Biologia Molecular aplicada à produção animal.

Em fevereiro do mesmo ano, iniciou o mestrado em Zootecnia com área de concentração em Produção Animal na Universidade Estadual de Maringá. Com a proposta de avaliar genético-molecularmente linhagens de tilápias do Nilo, participou do primeiro programa de melhoramento genético de peixes baseado em métodos de genética quantitativa no Brasil. Dentro deste programa, desenvolveu o projeto de mestrado, avaliando a existência de polimorfismo (SNP) no gene do hormônio do crescimento e sua associação com caracteres fenotípicos relacionados ao crescimento em linhagens de tilápias. No mês de março de 2008, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

Em agosto de 2008 ingressou no doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos. Inicialmente, a proposta de trabalho era avaliar a variabilidade genética ao longo das gerações do peixe jundiá sob seleção artificial. As informações geradas serviriam como ferramenta adicional (às informações quantitativas) no controle da endogamia e minimização da perda da variabilidade genética do estoque de reprodutores. Como a implantação de um programa de melhoramento genético demandava uma grande estrutura e muitos recursos financeiros, este projeto tornou-se inviável. Foi quando surgiu a oportunidade de iniciar os primeiros estudos genéticos na espécie de camarão de água-doce, *Macrobrachium amazonicum* (camarão-da-amazônia). Dessa maneira, a autora realizou seus estudos de doutoramento identificando polimorfismos em um gene da família multigênica da Proteína do Choque Térmico (HSC70) e avaliou as aplicações dos mesmos tanto no cultivo como na conservação da espécie.

Em junho de 2013 submeteu-se à banca para defesa de sua tese de doutoramento.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE TABELAS	xii
PREFÁCIO.....	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Caracterização do Problema	01
1.2. Aspectos Gerais da Espécie <i>Macrobrachium amazonicum</i>	02
1.3. As Proteínas do Choque Térmico	06
1.4. Polimorfismos Genéticos	08
<i>1.4.1. Polimorfismos de Base Única</i>	08
<i>1.4.1.1. Base molecular dos SNPs</i>	10
<i>1.4.1.2. Prospecção dos SNPs</i>	11
<i>1.4.1.3. Haplótipos de SNPs</i>	12
<i>1.4.2. Aplicação dos SNPs na Pesca e Carcinicultura</i>	13
<i>1.4.2.1. Aplicação dos SNPs em estudos de populações naturais</i>	14
<i>1.4.2.2. Aplicação dos SNPs no estabelecimento de correlações fenótipo-genótipo em populações de cativeiro</i>	16
1.5. Estudos Genéticos na Espécie <i>Macrobrachium amazonicum</i>	18
1.6. Estudos de Associação de Polimorfismos de Genes das HSP70s à Características de Interesse Econômico	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Coleta de Material Biológico	23
<i>3.1.1. Prospecção de SNPs no Gene da HSC70 do Camarão-da-Amazônia (<i>Macrobrachium amazonicum</i>)</i>	23

3.2.2. Associação de SNPs do gene HSC70 à Características de Interesse Zootécnico do camarão-da-amazônia (<i>Macrobrachium amazonicum</i>)	23
3.2.3. Diversidade e Estruturação Genética de Populações de Camarão-da-Amazônia (<i>Macrobrachium amazonicum</i>) Baseada em SNPs no Gene da HSC70.....	26
3.2. Extração de DNA	27
3.3. Amplificação dos Fragmentos do Gene da HSC70	29
3.3.1. Delineamento dos Oligonucleotídeos.....	29
3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase	31
3.4. Sequenciamento dos Fragmentos do Gene da HSC70	32
3.4.1. Purificação dos Produtos de PCR.....	32
3.4.2. Sequenciamento dos Produtos de PCR.....	32
3.5. Análises <i>in silico</i> das Sequências	33
3.5.1. Sequências Nucleotídicas	33
3.5.2. Sequências Peptídicas	34
3.5.3. Prospecção dos SNPs	35
3.6. Análises Estatísticas.....	38
3.6.1. Prospecção de SNPs no Gene da HSC70 do Camarão-da-Amazônia (<i>Macrobrachium amazonicum</i>).....	38
3.6.2. Associação de SNPs do Gene HSC70 à Características de Interesse Zootécnico do Camarão-da-Amazônia (<i>Macrobrachium amazonicum</i>).....	39
3.6.2.1. Variáveis da qualidade da água	39
3.6.2.2. Estatística descritiva das informações fenotípicas	39
3.6.2.2.1. Estrutura demográfica	39
3.6.2.2.2. Desempenho zootécnico	39
3.6.2.2.3. Genotipagem dos SNPs e frequências alélicas	40
3.6.2.2.4. Reconstrução dos haplótipos e frequências haplotípicas	41
3.6.2.2.5. Associação dos genótipos SNPs com as características fenotípicas	41
3.6.2.2.6. Associação dos haplótipos SNPs com as características fenotípicas	42
3.6.3. Diversidade e Estruturação Genética de Populações de Camarão-da-Amazônia (<i>Macrobrachium amazonicum</i>) Baseada em SNPs no Gene da HSC70.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. Prospecção de SNPs no Gene da HSC70 do Camarão-da-Amazônia (<i>Macrobrachium amazonicum</i>).....	46

4.1.1. Descrição do Fragmento do Gene da HSC70.....	46
4.1.2. Prospecção de SNPs em um Fragmento do Gene da HSC70.....	55
4.2. Associação de SNPs do Gene HSC70 à Características de Interesse Zootécnico do Camarão-da-Amazônia (<i>Macrobrachium amazonicum</i>)	66
4.2.1. Variáveis físico-químicas da água	66
4.2.2. Estatística descritiva das informações fenotípicas.....	68
4.2.2.1. Estrutura demográfica	68
4.2.2.2. Desempenho zootécnico	71
4.2.3. Genotipagem dos SNPs e Frequências Alélicas	77
4.2.4. Reconstrução dos Haplótipos e Frequências Haplotípicas	79
4.2.5. Associação dos Genótipos SNPs com as Características Fenotípicas	82
4.2.6. Associação dos Haplótipos SNPs com as Características Fenotípicas.....	88
4.3. Diversidade e Estruturação Genética de Populações do Camarão-da-Amazônia (<i>Macrobrachium amazonicum</i>) Baseada em SNPs no Gene da HSC70... ..	91
4.3.1. Caracterização da Diversidade Genética	91
4.3.1.1. Análise de locos simples	91
4.3.1.2. Análise dos haplótipos	97
4.3.2. Caracterização da Estruturação Genética	99
5. CONCLUSÕES	105
6. REFERÊNCIAS.....	106

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

SEÇÃO 1. INTRODUÇÃO

- Figura 1** - Morfologia do camarão-da-amazônia, *Macrobrachium amazonicum*. 03
- Figura 2** - Ilustração da variação passível de ser detectada em termos de sequências alélicas pela tecnologia dos marcadores moleculares SNPs..... 09
- Figura 3** - Detecção de heterozigotos usando cromatogramas 12

SEÇÃO 2. OBJETIVOS

Nada consta

SEÇÃO 3. MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 4** - Desenho esquemático das dimensões usadas na análise biometria do *M. amazonicum*. 25
- Figura 5** - Desenho esquemático da diferenciação sexual de machos e fêmeas da espécie *M. amazonicum* 25
- Figura 6** - Morfotipos dos machos da espécie *M. amazonicum* 25
- Figura 7** - Pontos de coletas de duas populações naturais de *M. amazonicum*. 27
- Figura 8** - Estrutura do gene da HSC70 do camarão da Malásia (*M. rosenbergii*), descrita por LIU et al. (2004)..... 30
- Figura 9** - Identificação dos SNPs através de alinhamento dos eletroferogramas e busca por picos de sobreposição de sinais de fluorescência em *M. amazonicum* 37
- Figura 10** - Exemplo de um teste de atribuição, obtido pelo *Structure*, representando uma população estruturada, com K=5. Os indivíduos são representados por barras verticais e as populações por cores distintas..... 45
- Figura 11** - Exemplo de um teste de atribuição, obtido pelo *Structure*, representando uma população não estruturada, com K = 5. Cada indivíduo, representado por uma barra vertical, possui a mesma probabilidade de pertencer a qualquer uma das populações, representadas pelas cores distintas 45

SEÇÃO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Figura 12** - Gel de agarose a 1,5% corado em GelRed, contendo os fragmentos do gene da HSC70 em *M. amazonicum*. 47
- Figura 13** - Eletroferogramas parciais referentes ao sequenciamento de fragmentos do gene HSC70 em *M. amazonicum*..... 48

Figura 14 - Resultado da análise de BLAST mostrando alta similaridade da região sequenciada neste trabalho com outras sequências do banco de dados <i>GenBank</i>	50
Figura 15 - Resultado da análise de BLAST mostrando valores de identidade e acurácia do alinhamento realizado com outras sequências do <i>GenBank</i>	50
Figura 16 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos de um fragmento do gene da HSC70 de três espécies de <i>Macrobrachium</i>	52
Figura 17 - Alinhamento das sequências de aminoácidos de uma parte da proteína HSC70 de três espécies de <i>Macrobrachium</i>	52
Figura 18 - Árvore de distância das sequências de aminoácidos de HSP70 e HSC70 de algumas espécies de crustáceos.	54
Figura 19 - Árvore de distância das sequências de aminoácidos da HSC70 de camarões marinhos e de camarões de água-doce.....	54
Figura 20 - Eletroferogramas parciais referentes ao sequenciamento de fragmentos do gene HSC70 em <i>M. amazonicum</i>	56
Figura 21 - Eletroferogramas parciais demonstrando os genótipos dos SNPs identificados no fragmento HSC70-1 do gene da HSC70 em uma população experimental de <i>M. amazonicum</i> .	56
Figura 22 - Eletroferogramas parciais demonstrando os genótipos dos SNPs identificados no fragmento HSC70-2 do gene da HSC70 em uma população experimental de <i>M. amazonicum</i> .	57
Figura 23 - Alinhamento dos fragmentos proteicos da HSC70 de <i>M. amazonicum</i>	61
Figura 24 - Frequência relativa de cada classe demográfica de <i>M. amazonicum</i> cultivados em duas densidades de estocagem ao momento da despesca.	69
Figura 25 - Frequência relativa de cada classe demográfica de <i>M. amazonicum</i> ao longo do experimento cultivados em duas densidades de estocagem	70
Figura 26 - Mapa indicando as populações de <i>M. amazonicum</i> já estudadas molecularmente.	92
Figura 27 - Estimativa do número de populações de <i>M. amazonicum</i> determinadas pelo programa <i>Structure</i>	102
Figura 28 - Resultado dos testes de atribuição de indivíduos de duas populações de <i>M. amazonicum</i> , gerados pelo programa <i>Structure</i>	102

SEÇÃO 5. CONCLUSÕES

Nada consta

SEÇÃO 6. REFERÊNCIAS

Nada consta

LISTA DE QUADROS

SEÇÃO 1. INTRODUÇÃO

Nada consta

SEÇÃO 2. OBJETIVOS

Nada consta

SEÇÃO 3. MATERIAL E MÉTODOS

Quadro 1 - Sequências dos *primers* delineados para as amplificações de PCR dos fragmentos do gene da HSC70 de *M. amazonicum* e suas respectivas posições de complementariedade na sequência-referência, tamanho esperado do fragmento e temperatura de anelamento (*T_a*) .. 31

Quadro 2 - Sequências dos genes de membros da família da HSP70 utilizadas no presente trabalho 35

Quadro 3 - Código de degeneração de bases, conforme discriminação da *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC. 36

SEÇÃO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nada consta

SEÇÃO 5. CONCLUSÕES

Nada consta

SEÇÃO 6. REFERÊNCIAS

Nada consta

LISTA DE TABELAS

SEÇÃO 1. INTRODUÇÃO

Nada consta

SEÇÃO 2. OBJETIVOS

Nada consta

SEÇÃO 3. MATERIAL E MÉTODOS

Nada consta

SEÇÃO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 - Descrição dos SNPs identificados em uma população de <i>M. amazonicum</i> , suas variantes alélicas, frequência dos alelos e valores de probabilidade para teste de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.	58
Tabela 2 - Médias e desvios padrão das variáveis físico-química da água conforme a densidade de estocagem de <i>M. amazonicum</i>	66
Tabela 3 - Estatística descritiva geral das variáveis fenotípicas estudadas em <i>M. amazonicum</i>	72
Tabela 4 - Estatística descritiva das variáveis fenotípicas (média \pm erro padrão) estudadas em <i>M. amazonicum</i> , considerando-se os efeitos da densidade de estocagem	72
Tabela 5 - Estatística descritiva das variáveis fenotípicas (média \pm erro padrão) estudadas em <i>M. amazonicum</i> , considerando-se os efeitos da classe demográfica	73
Tabela 6 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) determinada entre as características fenotípicas estudadas na espécie <i>M. amazonicum</i>	73
Tabela 7 - Frequências alélicas dos polimorfismos no gene da HSC70 nas densidades de estocagem e classes demográficas de <i>M. amazonicum</i>	78
Tabela 8 - Haplótipos reconstruídos para o gene da HSC70 do <i>M. amazonicum</i> e sua distribuição conforme a densidade de estocagem e classe demográfica	81
Tabela 9 - Efeito do SNP C256T sobre as características fenotípicas (média \pm erro padrão) de <i>M. amazonicum</i> cultivados na densidade de estocagem 40.m ⁻²	83
Tabela 10 - Efeito dos SNPs C256T e T907C sobre as características fenotípicas (média \pm erro padrão) de fêmeas de <i>M. amazonicum</i>	85
Tabela 11 - Efeito do haplótipo H7 sobre as características fenotípicas (média \pm erro padrão) de <i>M. amazonicum</i> cultivados na densidade de estocagem 200.m ⁻²	88

Tabela 12 - Efeito do haplótipo H10 sobre as características fenotípicas (média ± erro padrão) de <i>M. amazonicum</i> cultivados na densidade de estocagem 40.m ⁻²	89
Tabela 13 - Efeito do haplótipo H7 sobre as características fenotípicas (média ± erro padrão) de fêmeas e machos de <i>M. amazonicum</i>	90
Tabela 14 - Descrição dos SNPs (parcimoniosamente informativos e não informativos) identificados, variantes alélicas e frequências alélicas em duas populações de <i>M. amazonicum</i>	93
Tabela 15 - Índices de diversidade genética para cada um dos 20 SNPs identificados no gene da HSC70 de duas populações nativas de <i>M. amazonicum</i>	96
Tabela 16 - Haplótipos, sítios variáveis e frequência relativa dos respectivos haplótipos detectados em duas populações naturais de <i>M. amazonicum</i>	98
Tabela 17 - Análise da Variância Molecular em duas populações nativas de <i>M. amazonicum</i>	100

SEÇÃO 5. CONCLUSÕES

Nada consta

SEÇÃO 6. REFERÊNCIAS

Nada consta

PREFÁCIO

Esta tese é um estudo genético do camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) que inclui a prospecção de SNPs no gene constitutivo da Proteína do Choque Térmico de 70 kDa (HSC70), a associação desses SNPs à características de interesse zootécnico e a estruturação de populações naturais baseada nesses SNPs. Esses temas darão origem a três artigos científicos.

Dois destes artigos tiveram como alvo uma população experimental de *M. amazonicum*, a qual é mantida no setor de carcinicultura do CAUNESP (Centro de Aquicultura da UNESP), no município de Jaboticabal-SP. Em se tratando desta população, o primeiro artigo traz a descrição de um fragmento HSC70 e a prospecção e validação de polimorfismos de base única (SNP) neste mesmo gene (nota técnica publicada no periódico *Conservation Genetics Resources*). O segundo artigo traz um experimento de desempenho de camarão-da-amazônia, no qual, medidas de interesse zootécnico foram testadas quanto à sua associação aos polimorfismos identificados no gene da HSC70 (a ser submetido para o periódico *Aquaculture*). Estas informações são de relevante importância para a aquicultura ao passo que esta é uma alternativa sustentável para a redução dos impactos antrópicos nos estoques naturais da espécie.

O terceiro artigo traz uma análise da diversidade e estrutura genética de duas populações naturais de *M. amazonicum* sob um ponto de vista local (dentro de uma escala menor que 300 Km). Estas populações foram coletadas no estado do Pará, uma à jusante da UHE de Tucuruí, no rio Tocantins (município de Mocajuba-PA), e outra no rio Paracauari (município de Soure-PA). O trabalho também aborda uma análise comparativa com a população de cativeiro, a qual foi fundada a partir de juvenis provenientes do mesmo sistema hidrogeográfico (Furo das Marinhas, Pará) que as populações naturais estudadas. Para este trabalho também foi analisada a variação genética do gene da HSC70 (artigo a ser submetido para o periódico *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*). Este tipo de análise permite o conhecimento do *status* genético da espécie, o que permite a orientação de medidas de manejo da conservação e do manejo reprodutivo no cativeiro.

Esta tese está estruturada em *Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões*. A subdivisão em artigos será vista na seção *Resultados e Discussão*. Como a parte que envolve toda a manipulação genético-molecular (extração de DNA, amplificação do gene alvo, purificação dos produtos de PCR, sequenciamento, edição das sequências e prospecção dos SNPs) se repete nos artigos, decidiu-se adotar este modelo no intuito de tornar a leitura desta tese mais agradável, reduzindo a repetição de descrição dos procedimentos metodológicos. Desse modo, a porção metodológica que diferencia os trabalhos se limita as questões da amostragem e aos métodos utilizados nas análises estatísticas dos dados. Assim, as subseções *Coleta de material biológico* e *Análises estatísticas* serão subdivididas seguindo as mesmas subdivisões da seção *Resultados e Discussão*:

- i. Prospecção de SNPs no gene da HSC70 do camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*);
- ii. Associação de SNPs do gene HSC70 à características de interesse zootécnico do camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*); e
- iii. Diversidade e estruturação genética de populações de camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) baseada em SNPs no gene da HSC70.

RESUMO

BLANCK, D. V. **SNPs no gene da HSC70 e suas implicações na carcinicultura e conservação dos estoques de camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*)**. São Carlos: UFSCar, 2013. 122 f. Tese (doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

O *Macrobrachium amazonicum* é uma espécie endêmica da América da Sul que tem sido muito explorada pela pesca artesanal principalmente nas regiões norte e nordeste brasileira. A superexploração da espécie tem levado à diminuição dos estoques naturais, afetando as relações socioeconômicas de populações ribeirinhas e o *status* genético deste crustáceo. Nesse contexto, a aquicultura surge como uma alternativa sustentável para amenizar este impacto nos estoques naturais. Uma visão molecular das adaptações e modificações em resposta às variáveis ambientais é importante para se entender a biologia, distribuição e capacidade que este crustáceo possui para se adaptar a diferentes condições e regiões geográficas, quer seja em seu habitat natural ou em cativeiro. Um modo de resposta a essas situações é a adaptação através de mudanças na composição genética de populações como resultado da seleção. Considerando estes aspectos, marcadores SNPs (Polimorfismos de Base Única) localizados em genes candidatos relacionados ao *fitness* surgem como ferramentas promissoras para detecção de seleção e estruturação genética em populações naturais, bem como para verificar a sua correlação com características complexas de interesse na aquicultura. No presente trabalho objetivou-se estudar SNPs no gene da HSC70 (forma constitutiva do gene da Proteína do Choque Térmico de 70 kDa) em duas abordagens: (1) a prospecção e associação destes SNPs às características de crescimento em uma população cativa de *M. amazonicum* (CAUNESP); e (2) a prospecção de SNPs, caracterização da variabilidade e estruturação genética de duas populações naturais de *M. amazonicum* (rios Tocantins e Paracauari, ambos no Pará). Para o primeiro estudo, desenvolveu-se um experimento de desempenho zootécnico destes camarões, submetidos a duas densidades de estocagem (condição normal e de intensificação). No momento da despesca, mensuraram-se variáveis de crescimento (comprimentos total e abdominal e pesos total, abdominal e do hepatopâncreas) e determinou-se o sexo dos indivíduos. Os efeitos dos SNPs sobre estas variáveis fenotípicas foram testados em modelo

linear misto, conduzidos pelo *Proc Mixed* do programa SAS. Dentre 12 SNPs identificados nesta população, houve efeito de interesse para dois SNPs (C256T e T907C) e dois haplótipos (H7 e H10), efeitos estes que compreendem várias características de crescimento, incluindo interações de densidade e classe populacional. Os efeitos mais importantes foram encontrados na densidade normal de cultivo e nas fêmeas. O fato de não terem sido detectados efeitos significativos de SNPs na alta densidade de estocagem neste primeiro estudo exclui a possibilidade de uso desta informação para a intensificação do cultivo do *M. amazonicum*. De qualquer maneira, estes resultados consistem de informação relevante para aplicação no desenvolvimento de linhagens com alto potencial de crescimento, através da Seleção Assistida por Marcadores. O efeito detectado nas fêmeas pode ser indício do envolvimento do gene da HSC70 com o desenvolvimento reprodutivo da espécie. Na segunda abordagem feita, detectou-se 13 SNPs na população do rio Tocantins e seis na população do rio Paracauari. Todos os SNPs apresentaram-se sem desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém em alguns pares de locos SNPs foi detectado desequilíbrio de ligação. As duas populações apresentaram alta diversidade haplotípica. A diversidade de haplótipos para a população do rio Tocantins foi 0,712 e para a população do rio Paracauari foi 0,596, diferindo significativamente entre as populações ($P \leq 0,05$). A AMOVA indicou que toda a variabilidade está presente dentro das populações, fazendo com que estas duas populações não estejam diferenciadas geneticamente ($F_{ST} = -0,00048$). Aparentemente, baseando-se somente nas informações de diversidade e na ausência de estrutura genética, a ação antrópica não tem causado efeitos drásticos no *status* genético destas duas populações de *M. amazonicum*. Estes resultados provam que marcadores SNPs localizados no gene da HSC70 são úteis no estabelecimento de estratégias de manejo em programas de seleção genética, bem como em programas de conservação da espécie foco deste estudo.

Palavras-chave: Crustáceos. Proteína do Estresse Térmico. Variabilidade.

ABSTRACT

BLANCK, D. V. **SNPs within the gene HSC70 and their implications for farming and conservation of Amazon River Prawn (*Macrobrachium amazonicum*)**. São Carlos: UFSCar, 2013. 122 p. Thesis (Science doctorate) – Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

Macrobrachium amazonicum is an endemic species in South America, which has been exploited by artisanal fisheries in northern and northeastern Brazil. The overexploitation of this species has led to the decline of its natural stocks. This scenario affects the riverine communities and the genetic status of populations of this crustacean. In this context, the aquaculture emerges as a sustainable alternative to soften this impact over the natural stocks. A molecular view of adaptations and modifications in response to environmental variables is important for understanding the biology, distribution and capacity of this crustacean to adapt to different conditions and geographic regions, either in its natural habitat or in captivity. Considering these aspects, SNPs markers within fitness-related candidate gene emerge as promising tools for selection and detection of genetic structure in natural populations and to verify their correlation with complex traits of interest in farming. In this study, the aim was to investigate SNPs in the HSC70 (70-kilodalton Heat Shock Cognate) gene under two approaches: (1) the prospection and association of SNPs to growth traits in a captive population of *M. amazonicum* (CAUNESP); and (2) the SNPs prospection, characterization of the variability and genetic structure of two wild stocks of *M. amazonicum* (Tocantins and Paracauari rivers, both in Pará state). To the firstly study, were carried out an experimental performance of these prawns, undergone to two stocking densities (normal and intensification conditions). Growth traits (total and abdominal length, and total abdominal and hepathopancreas weight) and sex were determined during the harvesting. The SNPs effects on these phenotypic variables were tested in a mixed model conducted by the *Proc Mixed* of the SAS program. Twelve SNPs were identified. Among them, only two SNPs (C256T and T907C) and two haplotypes (H7 and H10) presented effects of interest. These effects comprised several traits, including density and population class interactions. The most important effects were found in the normal density of the farming and on females. SNPs effects were not detected in high stocking density treatment.

So, this fact excludes the possibility of using this information to the farming intensification of *M. amazonicum*. However, these results consist of relevant information for the development of high performing culture lines of *M. amazonicum* by Marker Assisted Selection. The SNPs effects on females may indicate the involvement of the HSC70 gene in the reproductive development of the species. In the second study, 13 SNPs were characterized in the Tocantins river population and six SNPs in the Paracauari river population. No significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium was found. However, linkage disequilibrium was detected among some pairs of SNP loci. Both stocks showed high haplotype diversity. The haplotype diversity was 0.712 and 0.596 for the Tocantins and Paracauari river populations, respectively. These values were significantly different between the populations ($P \leq 0.05$). AMOVA indicated that almost all variability occurs within the populations and these stocks are not genetically differentiated ($F_{ST} = -0,00048$). Apparently, if based on the diversity and the absence of genetic structure information, the anthropic action has not caused drastic effects on the genetic status of these two populations of *M. amazonicum*. These results prove that SNP markers within HSC70 gene are useful in establishing strategies for managing breeding programs as well as programs for the conservation of the species focus of this study.

Keywords: Crustaceans. Heat Shock Protein. Genetic Variability.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização do Problema

A aquicultura é um dos sistemas de produção de alimentos que mais cresce, tendo apresentado uma produção mundial de cerca de 60 milhões de toneladas de organismos aquáticos em 2010 (FAO, 2012). A alta demanda por organismos aquáticos como fonte de proteína animal na alimentação humana tem aumentado em função do aumento da população mundial, do maior conhecimento acerca dos benefícios nutricionais destes organismos e também devido a preocupações relativas à superexploração das reservas naturais.

Frente a este cenário e o grande potencial aquífero continental do Brasil, a exploração comercial de camarões de água-doce, em especial a espécie *Macrobrachium amazonicum* (conhecido popularmente como camarão-da-amazônia), vem recebendo grande destaque econômico, tornando-se uma alternativa sustentável e viável para a manutenção da produção de organismos aquáticos em níveis compatíveis com o consumo e com a preservação das populações naturais.

Entre as espécies nativas do gênero *Macrobrachium* que ocorrem no Brasil, o *M. amazonicum* é a mais indicada para o cultivo devido ao seu rápido crescimento, fácil manutenção em cativeiro, versatilidade ambiental e grande aceitação pelo mercado consumidor. Segundo Lobão e Rojas (1991), indivíduos dessa espécie, embora possuam um crescimento menor que o de outras espécies do gênero, não apresentam a agressividade característica do *M. acanthurus* e *M. carcinus*. Além disso, no que diz respeito ao cultivo de uma espécie de água-doce nativa *versus* o cultivo de espécies exóticas, deve-se preferir o cultivo da espécie nativa devido à sua importância na manutenção da biodiversidade local. Sendo assim, são evitados os problemas causados pela introdução das espécies exóticas sobre as populações locais, como já tem ocorrido com o *M. rosenbergii* e o *M. dacqueti* (GAZOLA-SILVA; MELO; VITULE, 2007; IKETANI et al., 2011).

Em função deste grande potencial de exploração, muitos esforços têm sido realizados com o intuito de aprimorar a tecnologia de produção sustentável do camarão-da-amazônia. Para tanto, em 2000 foi iniciado um programa multi-institucional e multidisciplinar, sob a

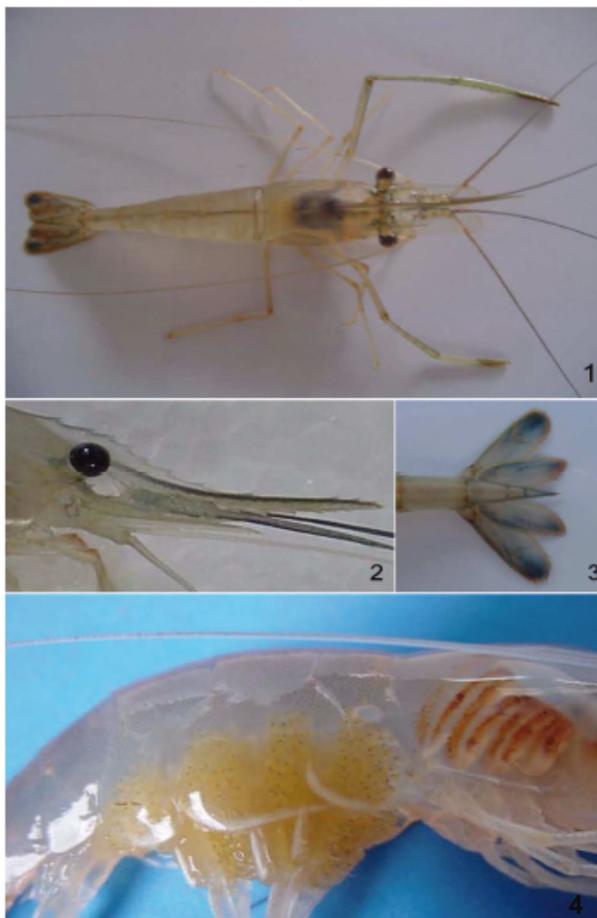
liderança do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista – CAUNESP (VALENTI, comunicação pessoal). Desde então, dentro deste programa, estão sendo desenvolvidos diversos trabalhos priorizando a reprodução, a larviculturura, a engorda e a alimentação e nutrição do *M. amazonicum* (CAUNESP – Rede camarão-da-amazônia). Tais estudos, no entanto, não têm incluído análises genético-moleculares em suas abordagens, sendo estas ainda incipientes e restritas a populações naturais de *M. amazonicum* (GUERRA et al., 2010; GUERRA, 2011; PEIXOTO, 2002; VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011)

Nesse contexto, como a espécie ainda necessita de uma série de aportes científico e tecnológicos para colocá-la em um patamar de plena viabilidade zootécnica e econômica, o presente trabalho surge a fim de investigar de que modo as variações em sequências de DNA de populações naturais e cativas de camarão-da-amazônia que exibem fenótipos divergentes auxiliariam a diferenciar os processos de adaptação. Informações desta natureza se tornam cada vez mais cruciais para se identificar ferramentas capazes de direcionar medidas de manejo da conservação genética e de programas de seleção para aplicação na aquicultura.

1.2. Aspectos Gerais da Espécie *Macrobrachium amazonicum*

O *M. amazonicum* é um crustáceo decápode pertencente à Subordem Pleocyemata e família Palaemonidae. É caracterizado por possuir rostro longo e delgado, voltado para cima, que ultrapassa distintamente a extremidade do escafocerito, com margem superior contendo nove a doze dentes irregularmente distribuídos e margem inferior provida de oito a dez dentes. Possui somente um dente atrás da órbita (CERVIGÓN et al., 1992). A carapaça e o abdômen são lisos e os espécimes quando vivos apresentam-se claros e translúcidos. O telson termina em uma extremidade aguda com dois pares de espinhos póstero-laterais e a segunda pata (pereiópodo) no adulto é a mais forte (HOLTHUIS, 1952; MELO, 2003). Os indivíduos adultos de *M. amazonicum* apresentam uma maior proporção do abdômen em relação ao cefalotórax (ROMERO, 1982), característica morfológica que confere vantagem produtiva (maior aproveitamento da carcaça) frente a outras espécies do gênero como o *M. rosenbergii*. Alguns detalhes das características citadas podem ser verificados na Figura 1.

Figura 1 - Morfologia do camarão-da-amazônia, *Macrobrachium amazonicum*.



(1) macho adulto; (2) vista lateral do rostro; (3) vista lateral do telson; (4) fêmea ovígera.
Fonte: Maciel e Valenti (2009).

Machos e fêmeas de *M. amazonicum* apresentam compleição física semelhante até atingirem a maturidade sexual, quando têm início os processos reprodutivos. A partir deste momento, as fêmeas destinam suas reservas energéticas à produção e à incubação dos ovos, enquanto os machos direcionam o gasto energético ao crescimento somático, fazendo com que se tornem os maiores indivíduos da população (AMMAR et al., 2001). Além do menor tamanho das fêmeas (MACIEL; VALENTI, 2009) outras diferenças entre machos e fêmeas adultos (maduros sexualmente) são marcantes. O macho adulto apresenta o segundo par de pereiópodos grandes, e carpo, própode e mero cobertos por espículos curtos. Essas três últimas estruturas são ausentes na fêmea (CERVIGÓN et al., 1992; MELO, 2003). Ainda, os machos apresentam o segundo par de pleópodos com uma estrutura alongada (apêndice masculino) que auxilia na cópula (CERVIGÓN et al., 1992). As fêmeas possuem menos espinhos no segundo par de pereiópodos (MACIEL; VALENTI, 2009).

Dentre os machos de *M. amazonicum*, existem ainda a variação em morfotipos. Moraes-Riudades e Valenti (2004) confirmaram a existência de quatro diferentes morfotipos machos em *M. amazonicum* mantidos em cativeiro: TC (*Translucent Claw*), CC (*Cinnamon Claw*), GC1 (*Green Claw 1*) e GC2 (*Green Claw 2*). Os quelípodos de camarões TC apresentam-se translúcidos enquanto os de camarões CC geralmente são cor de canela, ambos demonstrando alguns espinhos. Camarões GC1 e GC2 apresentam quelípodos verdes com espinhos longos e robustos (MORAES-RIODADES; VALENTI, 2004). Ainda, segundo estes autores, considerando as diferentes características morfológicas como tamanho e crescimento, a sequência de desenvolvimento parece ser TC -> CC -> GC1 -> GC2, em que a transformação de um morfotipo para outro pode ocorrer através de um processo gradual ou de uma muda, além disso, a passagem por todas as fases não é necessariamente obrigatória. Da mesma forma, baseados nas características morfológicas, Silva et al. (2009) verificaram a mesma estrutura populacional em espécimes de uma população selvagem do Pará.

Esta diferenciação morfotípica causa grande variabilidade no tamanho dos animais, pois o crescimento desacelerado de parte da população resulta em uma grande porcentagem de animais com baixo peso (MORAES-RIODADES; VALENTI, 2004). Este aspecto é um problema para a viabilidade do cultivo do *M. amazonicum*, à medida que os animais menores apresentam menor valor no mercado consumidor.

O *M. amazonicum* é uma espécie endêmica da América do Sul com ampla ocorrência (Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Brasil, Colômbia, Venezuela, Peru, Equador, Bolívia, Paraguai e Argentina). Sua distribuição se estende desde a bacia do Orinoco, passando pelas bacias do rio Amazonas, do rio Tocantins-Araguaia, do rio São Francisco até a bacia do rio da Prata (BIALETZKI et al., 1997; HOLTHUIS, 1952; MAGALHÃES et al., 2005; MELO, 2003; ODINETZ-COLLART; RABELO, 1996; PETTOVELLO, 1996; VALENCIA; CAMPOS, 2007). Como sua distribuição se estende desde regiões costeiras com gradientes variados de salinidade a continentais inteiramente dulcícolas (BIALETZKI et al., 1997; PORTO, 1998), seu desenvolvimento larval é classificado como mais ou menos completo (MAGALHÃES; WALKER, 1988). De acordo com Maciel e Valenti (2009), o *M. amazonicum*, portanto, pode ser separado em dois grupos distintos: (1) populações costeiras, as quais habitam rios de estuário; e (2) populações continentais, as quais vivem em rios, lagos e outros corpos d'água, sem contato com o litoral.

M. amazonicum possui uma significativa amplitude de tolerância às variações físico-químicas da água (MACIEL; VALENTI, 2009). O camarão-da-amazônia pode sobreviver em ambientes cuja temperatura das águas variam entre 20°C (BIALETZKI et al., 1997) e 32,5°C, e com oxigênio dissolvido e pH variando entre 1,7 e 13,2 mg/L e entre 5,0 e 9,6, respectivamente (MONTROYA, 2003; MORAES-RIODADES; KIMPARA; VALENTI, 2006). Os valores destas variáveis podem diferir consideravelmente entre larvas, juvenis e adultos, e entre machos e fêmeas da espécie (DAOUD et al., 2007). Além disso, os limites de tolerância para os fatores ecológicos são população-específicas e podem variar em indivíduos de uma espécie que habita locais diferentes. Tal característica é evidenciada em *M. amazonicum*, que possui elevada tolerância intra-populacional às variáveis ambientais (MACIEL; VALENTI, 2009). Ainda, a espécie possui plasticidade de caracteres morfológicos (tamanho corporal, modo de reprodução, etc.), fato este que parece ser uma resposta adaptativa a estes diferentes ambientes em que o *M. amazonicum* ocorre ao longo de sua distribuição natural (VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011).

Uma visão molecular das adaptações e modificações em resposta às variáveis ambientais é importante para entender a biologia, distribuição e capacidade que este crustáceo possui para se adaptar a diferentes condições e regiões geográficas. Para sobreviver em um habitat particular, os organismos devem ser capazes de resistir a alterações adversas no ambiente físico, consideradas como condições estressantes. Os organismos podem lidar com estas situações se mudando para locais mais adequados ou adaptando-se a elas, seja através de mudanças na composição genética de populações como resultado da seleção, seja pela plasticidade fenotípica (HOFFMANN; SGRO, 2011; SORENSEN; KRISTENSEN; LOESCHCKE, 2003). Sem esta capacidade de adaptação muitas espécies seriam extintas. Sendo assim, dois fatores importantes à adaptação, sobrevivência e crescimento do camarão-da-amazônia são considerados no desenvolvimento desta tese: (1) as Proteínas do Estresse Térmico (*Heat Shock Protein* - HSP), as quais possuem uma estreita relação com os fatores de estresse que acometem os animais em geral; e (2) a variabilidade genética, pois estudos desta natureza podem identificar os alelos com potencial de afetar a capacidade do organismo para sobreviver em seu habitat existente ou pode habilitá-lo para sobreviver nos mais diversos habitats. Informações sobre a diversidade genética e as relações entre os indivíduos e entre as populações, são, portanto, importantes tanto para o melhoramento genético como para a

biologia da conservação e para o estudo da ecologia evolutiva das populações (DURAN et al., 2009).

1.3. As Proteínas do Estresse Térmico

As HSPs e seus genes são altamente conservados ao longo da evolução e são encontrados universalmente desde bactérias até os seres humanos (BOORSTEIN; ZIEGELHOFFER; CRAIG, 1994; HAYWARD; RINEHART; DENLINGER, 2004; MAYER; BUKAU, 2005). Estas proteínas variam em tamanho de 27 a 110 kilodaltons (kDa) e podem ser classificadas em cinco famílias de acordo com sua massa molecular: HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 e pequenas HSPs (GEORGOPOULOS; WELCH, 1993; MOSELEY, 1997).

Entre as diferentes famílias de HSP, a família das proteínas do choque térmico de 70 kDa é a mais conservada (BOORSTEIN; ZIEGELHOFFER; CRAIG, 1994). Sua expressão é regulada por estresses ambientais e fisiológicos e condições não estressantes como o crescimento celular, desenvolvimento e situações fisiopatológicas (SANTACRUZ; VRIZ; ANGELIER, 1997; MORIMOTO, 1998).

As HSP70s possuem cerca de 650 aminoácidos de comprimento (LEIGNEL et al., 2007) e três domínios funcionais: um N-terminal com 44 kDa, que contém o domínio de ligação e hidrólise da adenosina trifosfato (ATP); um domínio C-terminal variável de 18 kDa, que interage com polipeptídeos desdobrados; e um domínio C-terminal altamente conservado de 10 kDa, o qual apresenta a sequência terminal EEVD, presente em todos os membros da família de HSP70 citosólicas em eucariotos (FLAHERTY; DELUCA-FLAHERTY; MCKAY, 1990; KIANG; TSOKOS, 1998). HSP70s citosólicas são identificadas através do *motif* EEVD. Esta sequência *motif* pode facilitar a ligação da HSP70 com co-chaperonas, como a HOP (HSP70-HSP90 *Organizing Protein*) (JOHNSON et al., 1998). Segundo Ramya, Surolia e Rurolia (2006) este *motif* provavelmente desempenha um papel importante na atividade de ligação dos peptídeos.

Os genes que codificam as proteínas HSP70 são considerados a principal família gênica das HSPs e consiste de genes exclusivamente indutíveis (HSP70), exclusivamente constitutivos

(HSC70) e genes simultaneamente indutível e constitutivo (LINDQUIST; CRAIG, 1988; PLACE; HOFMANN, 2001; SORENSEN; KRISTENSEN; LOESCHCKE, 2003).

O gene da HSC70 inicialmente foi descrito como sendo expresso normalmente nas células sem mudar em resposta à situação de estresse (KIANG; TSOKOS, 1998; LINDQUIST; CRAIG, 1988; PLACE; HOFMANN, 2001; YEH; HSU, 2002; YAMASHITA; HIRAYOSHI; NAGATA, 2004), atuando somente como chaperona molecular e no dobramento de proteínas recém-sintetizadas (CHUANG; HO; SONG, 2007). Entretanto, atualmente esta afirmação é controversa, uma vez que há estudos que relatam que tanto a forma induzível quanto a constitutiva do gene da HSP70 tem seus níveis de expressão aumentados sob condição de estresse ou em ambientes diferentes (CHUANG; HO; SONG, 2007; FANGUE, et al., 2006; JESUS; INÁCIO; COELHO, 2013; LO et al., 2004; LUAN et al., 2010; TAVIARA et al., 1996).

Segundo Yost e Lindquist (1986) os íntrons são encontrados nos genes expressos constitutivamente, mas não são encontrados na forma induzível. A falta de íntrons em HSP70s induzíveis é plausível, pois assim permite-se a transcrição rápida e acúmulo de estresse (HUANG; WIMLER; CARMICHAEL, 1999), uma vez que o *splicing* do RNA é desnecessário. Porém, existem relatos sobre a ausência de íntrons também na forma constitutiva deste gene (LIU et al., 2004). Esta perda de íntrons no gene constitutivo da HSP70 pode vir a ser uma resposta evolutiva à forma gênica que tem seus níveis de expressão também aumentados na condição de estresse.

Membros da família das HSP70s (HSC70/HSP70) já foram identificados e caracterizados a partir de vários crustáceos. Entre as espécies contempladas inclui-se os camarões marinhos *Penaeus monodon* (LO et al., 2004; CHUANG; HO; SONG, 2007), *Fenneropenaeus chinensis* (JIAO et al., 2004; LUAN et al., 2010), *Litopenaeus vannamei* (WU et al., 2005; WU et al., 2008), *Rimicaris exoculata* e *Mirocaris fortunata* (RAVAUX et al., 2003; RAVAUX et al., 2007); os caranguejos *Portunus trituberculatus* (CUI et al., 2010), *Bythograea thermydron*, *Cyanagraea praedator* e *Segonzacia mesatlantica* (LEIGNEL et al., 2007); as espécies de lagostim *Procambarus clarkii* (SUN et al., 2009) e *Cherax quadricarinatus* (FANG et al., 2012); e a craca, *Balanus amphitrite* (CHENG et al., 2003). Em camarões de água-doce, os genes da HSP70 e HSC70 foram clonados e sequenciados somente em *M. rosenbergii* (LIU et al., 2004) e *M. nipponense* (XIE, et al., 2006 – sequência do GenBank, dados não publicados).

A partir de estudos como estes supracitados foi possível determinar qual o papel destas proteínas nos crustáceos. McLennan e Miller (1990) sugerem que o principal papel destas HSPs em crustáceos está na recuperação tanto da célula como do organismo como um todo. Isso se dá por meio da recuperação da replicação do DNA e do reparo (ou a remoção) das proteínas e complexos proteicos desnaturados durante o estresse. No que diz respeito especificamente ao papel das HSC70 nos crustáceos, parece que esta isoforma está relacionada à proteção celular durante a aclimação (LUAN et al., 2010), ao crescimento (SPEES et al., 2003) e à espermatogênese e maturação dos espermatozoides (FANG et al., 2012).

1.4. Polimorfismos Genéticos

Os recentes avanços na biologia molecular estão proporcionando novas ferramentas para abordar questões de aspectos evolutivos, ecológicos, taxonômicos e na produção animal. A maior parte da variação em nível dos nucleotídeos, muitas vezes não é visível em nível fenotípico. No entanto, esta variação do DNA é frequentemente explorada em sistemas de marcadores moleculares e tem muitas vantagens sobre os marcadores fenotípicos, uma vez que eles são hereditários, de fácil aplicação e não são afetados pelo ambiente.

De acordo com Vignal et al. (2002), do ponto de vista do mecanismo molecular, ocorrem três principais tipos de variação em nível do DNA: i. Mudanças de um único nucleotídeo, chamado de SNPs, os polimorfismos de nucleotídeo único; ii. Inserções ou deleções (*Indels*) que variam de uma a várias centenas de pares de base; e iii. Variações no número de repetições em *tandem* (VNTR).

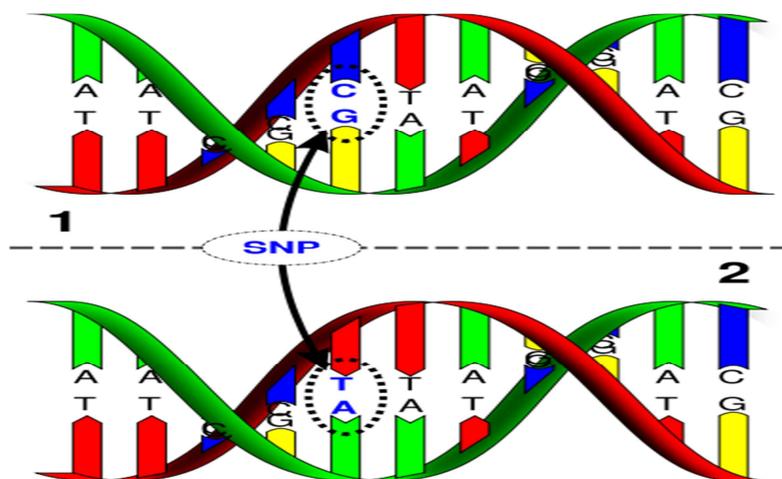
1.4.1. Polimorfismos de Base Única

Conforme sugerido pela sigla, um marcador SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) é apenas uma mudança de base única na sequência de DNA (Figura 2), com uma alternativa usual de dois a quatro nucleotídeos possíveis em uma determinada posição (BROOKES et al., 1999; VIGNAL et al., 2002). Para que um polimorfismo seja considerado, de fato, um SNP, o alelo polimórfico deve ter uma frequência mínima de 1%

na população (BROOKES, 1999; VIGNAL et al., 2002). Esta frequência mínima evita que polimorfismos verdadeiros sejam confundidos com mutações pontuais raras e erros de incorporação de bases durante a manipulação *in vitro* do DNA.

Embora o conceito mencionado acima pareça bastante claro, existe uma divergência entre os conceitos de SNP presentes na literatura. Segundo Kwok (1999) e Kruglyak (1997), SNPs são variações de nucleotídeos ou pequenas inserções/deleções (*Indels*) nas sequências de bases em fragmentos homólogos de DNA. No entanto, Brookes (1999), Rafalski (2002) e Vignal et al. (2002) separam o conceito de SNPs do de *indels*, sendo o primeiro ocasionado por substituições de base e o segundo por inserções e deleções porque muito provavelmente eles são originados por mecanismos genéticos distintos. Neste nosso estudo, assumimos esta segunda proposta de conceito de SNPs.

Figura 2 - Ilustração da variação passível de ser detectada em termos de sequências alélicas pela tecnologia dos marcadores moleculares SNPs.



Fonte: IST 341 Issues in Human Genetics (2011).

A fonte mais abundante de polimorfismo genético são SNPs (BROOKES, 1999). Suas bases moleculares permitem que haja uma distribuição homogênea de SNPs pelo genoma (CAETANO, 2009), entretanto, sua ocorrência é maior em regiões não-codificantes do que em codificantes (THANH et al., 2010).

Como a natureza exata das variantes alélicas é fornecida pela informação da sequência, os SNPs são ditos marcadores diretos. Esta variação da sequência pode ter um

grande impacto sobre a forma como o organismo se desenvolve e responde ao ambiente (DURAN, et al. 2009).

1.4.1.1. Base molecular dos SNPs

Os SNPs podem ser categorizados conforme: i. Natureza química das bases envolvidas na substituição; ii. Número de variantes alélicas para o sítio SNP; e iii. Região de ocorrência da substituição e consequência no produto gênico. A seguir, estas classificações serão abordadas com melhores detalhes.

Na primeira classificação, de acordo com a natureza química das bases envolvidas na substituição, estão inclusas as denominações “transições” e “transversões”. As transições são representadas pelas trocas entre purinas ($G \leftrightarrow A$) ou entre pirimidinas ($C \leftrightarrow T$). Ao passo que as transversões estão representadas pelas trocas entre purinas e pirimidinas ($C \leftrightarrow G$; $T \leftrightarrow A$; $C \leftrightarrow A$ e $G \leftrightarrow T$). Segundo Brookes (1999), pelo menos 2/3 dos SNPs correspondem às trocas do tipo transição. Esta maior proporção de transições está relacionada às reações de desaminação espontânea da 5-metilcitosina para timina, cuja taxa de reação é alta em regiões com dinucleotídeos CG (COULONDRE et al., 1978).

Na segunda classificação, em que se toma o número de variantes alélicas para o sítio SNP, considera-se os SNPs sendo bi, tri ou tetralélicos. Contudo, na prática, geralmente encontra-se somente a forma bialélica dos SNPs. Uma das razões para isso é a baixa taxa de mutação, que em mamíferos é estimada entre 1×10^{-9} e 5×10^{-9} por ano e por nucleotídeos em posições neutras (MARTINEZ-ARIAS et al., 2001). Esta é uma desvantagem dos SNPs em relação aos marcadores multialélicos como os SSR (Sequências Simples Repetidas, ou do inglês *Simple Sequence Repeats*), mas que acaba sendo compensada pela sua abundância relativa nos genomas, o que pode proporcionar uma elevada densidade destes marcadores perto de um local de interesse (por exemplo, um QTL – Locos de Características Quantitativas ou do inglês, *Quantitative Trait Loci*).

E por fim, enquadramos as regiões de ocorrência da substituição e consequência no produto gênico como o terceiro meio de classificação. Os SNPs, portanto, podem ocorrer em regiões codificantes (éxons), não codificantes (íntrons e espaços intergênicos, regiões promotoras ou regulatórias). Aqueles que ocorrem em regiões de éxons podem ser do tipo

não-sinônimo *missense* – causa alteração de um aminoácido, alterando estrutura e/ou função da proteína –, não-sinônimo *nonsense* – introduzindo um *stop codon* e gerando uma proteína encurtada, provavelmente sem função –, sinônima – não altera o aminoácido, mas pode afetar a estrutura e estabilidade do RNA mensageiro e conseqüentemente reduzir a quantidade de produto proteico (GRIFFITHS et al., 2001)– ou silenciosa – causa a troca de aminoácido, porém o novo aminoácido possui propriedades químicas semelhantes ao anterior, de modo que não altera a função e/ou estrutura da proteína –. Os SNPs que ocorrem em regiões não codificantes podem impactar na expressão gênica, pois, segundo Liao e Lee (2010), podem afetar o *splicing* alternativo, gerar ou suprimir códons de terminação ou poliadenilação na molécula de RNA mensageiro e alterar códons de iniciação de tradução. É evidente, portanto, que a localização dos SNPs pode ser de relevância funcional e fisiológica para o organismo.

1.4.1.2. Prospecção dos SNPs

Os SNPs podem ser identificados a um custo e rapidez relativamente baixos através de ferramentas de bioinformática. A descoberta de um SNP envolve, basicamente, o alinhamento das sequências de interesse com uma sequência consenso, e em seguida o encontro de diferenças entre as sequências.

Tradicionalmente, primeiramente é feita a amplificação por PCR de genes/regiões genômicas de interesse a partir de vários indivíduos escolhidos para representar a diversidade na espécie ou população de interesse. E, em seguida, é feito o sequenciamento direto destes *amplicons*, ou realiza-se um método mais custoso, que é a clonagem e em seguida o sequenciamento. Quando se deseja estudar SNPs em uma espécie cujo genoma ainda não foi sequenciado, a amplificação da região alvo pode ser feita adotando *primers* delineados em regiões conservadas de espécies relacionadas.

De posse dos resultados do sequenciamento de nucleotídeos, a descoberta de um SNP consiste na identificação de dois picos sobrepostos em uma mesma posição do eletroferograma, cuja presença é interpretada como um polimorfismo de um indivíduo heterozigoto. Esta metodologia permite a identificação de polimorfismos, pois há a análise dos sinais expressos no sequenciamento do material genético e detecta-se a variação dos sinais de

fluorescência dos cromatogramas, procurando por reduções nas regiões do pico do sinal onde uma segunda base foi detectada (Figura 3).

Figura 3 - Detecção de heterozigotos usando cromatogramas.



Na posição 424 pb pode ser feita a identificação de um SNP para a troca de uma citosina para uma adenina (indivíduo 10, sequências *forward* e *reverse*). Nesta mesma posição, os demais indivíduos correspondem ao homocigoto para o alelo mais frequente na população.

Programas de bioinformática como o *PolyPhred* (que inclui o PHRED, PHRAP, e o CONSED) e o *PolyBayes* foram desenvolvidos para automatizar o máximo possível a fase de análise de dados, permitindo grandes avanços. Esta metodologia de detecção de heterozigotos em eletroferogramas foi usada para detectar grandes conjuntos de SNPs em espécies que tiveram o genoma completo sequenciado, como por exemplo as espécies humana e bovina (CAETANO, 2009). Programas mais recentes, como o *Geneious*, possibilitam o alinhamento dos eletroferogramas e, conseqüentemente, também permitem a identificação de SNPs em sequências genômicas.

1.4.1.3. Haplótipos de SNPs

O conceito de haplótipo está intimamente relacionado à diversidade nucleotídica, e tem como significado, o padrão de associação de SNPs que são herdados conjuntamente e que caracterizam um grupo, população ou espécie. Desta maneira, SNPs juntos caracterizarão um

desequilíbrio de ligação (DL) que é simplificada a falta de segregação independente entre os alelos em dois ou mais locos.

O DL é geralmente dependente da história de recombinações entre os polimorfismos. Fatores tais como deriva genética, seleção entre populações, migração (miscigenação) e a redução do tamanho populacional (*bottleneck*), podem modificar o DL entre os marcadores e as características relacionadas. Os fatores que aumentam o DL são o endocruzamento, tamanho pequeno da população, isolamento genético entre linhagens, subdivisão entre populações, baixa taxa de recombinação, seleção natural e artificial. Por outro lado, alguns fatores que diminuem o DL são a fecundação cruzada, altas taxas de recombinação e mutação (TEMPLETON, 2011).

Na maioria dos casos, os genótipos SNPs inferidos a partir de organismos diploides possuem fase gamética desconhecida, isto quer dizer que, caso um indivíduo seja heterozigoto em mais de um sítio da sequência estudada, não é possível especificar diretamente quais alelos destes sítios ocorrem em um mesmo cromossomo. A atribuição de dados de sequências de cromossomos gerados a partir de organismos diplóides é desconhecida. O método mais comum de atribuição é a inferência de haplótipos usando programas de computador. Estes programas tentam inferir um número mínimo de haplótipos usando as frequências dos sítios polimórficos ou abordagens heurísticas. Stephens et al. (2001) desenvolveram um método bayesiano (algoritmo *Phase*) que atribui probabilidades aos possíveis haplótipos baseado na frequência dos homozigotos na amostra. Este método de inferência de haplótipos é o mais acurado, segundo Balding (2006).

1.4.2. Aplicação dos SNPs na Pesca e Carcinicultura

Os SNPs são amplamente utilizados em estudos de biomedicina devido a alta disponibilidade de conhecimento de variação alélica no genoma humano derivado do projeto *HapMap* (International HapMap Consortium, 2010). Na produção animal, o uso dos SNPs está se tornando mais comum nos últimos anos, onde as espécies de alto valor econômico, como os bovinos já estão incluídos em projetos *HapMap* (Bovine HapMap Consortium, 2009). No entanto, em espécies de organismos aquáticos os estudos de SNPs além de serem incipientes, não possuem os dados depositados nos bancos de dados. Isto pode ser averiguado em uma

breve busca no banco de dados de SNPs do NCBI (dbSNP), onde em espécies de crustáceos, por exemplo, encontra-se informações de SNPs somente em *L. vannamei*, *Tigriopus californicus* e *Daphnia magna*.

As expectativas são de que, com os crescentes avanços e automação nas tecnologias de sequenciamento e genotipagens de SNPs, os organismos aquáticos passem a ser melhor estudados quanto a estes polimorfismos e sua aplicação em estudos evolutivos, de conservação e de melhoramento genético.

Como este trabalho trata de estudos de SNPs em uma espécie de camarão de água-doce, nos subtópicos a seguir, serão abordadas as possibilidades de aplicação dos SNPs em estudos de populações de organismos aquáticos, bem como na seleção assistida por marcadores (MAS, *Marker Assisted Selection*) de espécies de camarão.

1.4.2.1. Aplicação dos SNPs em estudos de populações naturais

Nas últimas décadas, estudos genéticos aplicados à pesca produziram um grande volume de dados com base em marcadores genéticos neutros, os quais contribuíram consideravelmente para a compreensão da estruturação e conectividade entre populações de ambientes aquáticos. No entanto, marcadores moleculares neutros não são necessariamente informativos sobre a extensão ou importância da variação adaptativa, o que pode moldar a estrutura destas populações, mesmo quando os marcadores genéticos neutros sugerem diferenças genéticas fracas (HAUSER; CARVALHO, 2008; LARSEN et al., 2007). Além disso, o ambiente aquático oferece um mosaico de condições ambientais dinâmicas, o que potencialmente provoca alterações genéticas em escala espacial e temporal diferentes (CONOVER et al., 2006). Sendo assim, a adaptação local representa um elemento crucial para o entendimento dos processos ecológicos e evolutivos que influenciam a biodiversidade (GEBREMEDHIN et al., 2009).

A investigação de SNPs em populações de organismos de importância na pesca é relativamente recente, datando de aproximadamente 10 anos (MOEN et al., 2008; SMITH et al., 2005; BRADBURY et al., 2013). Dentro desta perspectiva o desenvolvimento de SNPs em genes candidatos relacionados à adaptação aumentam a possibilidade de se identificar locos sujeitos a seleção (MORIN et al., 2004; NIELSEN et al., 2009) e são úteis no estudo da dinâmica desses

genes nas populações naturais (LUIKART et al., 2003). Pois, SNPs que ocorrem em éxons e íntrons e que estão sob seleção direcional divergente estão previstos para ter frequências alélicas divergentes superiores aos esperados a partir de marcadores neutros (SCHLOÖTTERER, 2002). Além disso, os locos possivelmente influenciados pela seleção são representados como *outliers* (GUINAND; LAMAIRE; BANHOMME, 2004; BRADBURY et al., 2013).

Embora seja de conhecimento o poder dos marcadores SNPs em genes candidatos na resolução de questões ecológicas e de conservação de ambientes aquáticos, a sua aplicação se limita a alguns exemplos em espécies de peixes (FORD, 2000; FREAMO et al., 2011; HESS; NARUM, 2011; BRADBURY et al., 2013). Utilizando esta abordagem, o trabalho de Ford (2000) foi um dos pioneiros em peixes. O autor descreveu a variação da sequência dos genes da transferrina, da somatolactina e do gene p53 em quatro populações de salmão do Pacífico. Desse modo, analisando separadamente o nível de diferenciação a partir de locos sinônimos e também de não-sinônimos, o autor mostrou que não houve maior diferenciação entre as populações.

Em análises mais amplas, envolvendo a análise de SNPs *outliers*, Freamo et al. (2011) estudaram metapopulações de salmão do Atlântico. Eles mostraram que, em análises de atribuição de indivíduos, um painel de 14 SNPs não-neutros foi mais preciso (85% de precisão) do que um painel de 67 SNPs neutros (75% de precisão). Os autores afirmam que identificar e utilizar locos SNPs *outliers* é um passo importante para identificar corretamente as populações de salmão, o que deve ajudar na conservação da espécie. Bradbury et al. (2013) relataram que a inclusão de SNPs *outliers* revelaram a ocorrência de barreiras adicionais ao fluxo de genes de uma espécie de bacalhau, tanto no leste quanto no oeste do Atlântico. Assim como Freamo et al. (2011), estes autores também verificaram a melhora do suporte estatístico no teste de atribuição dos indivíduos nas populações quando incluíram os locos SNPs *outliers* nas análises. Ainda, Bradbury et al. (2013) observaram a ocorrência de um cline adaptativo em bacalhau do Atlântico da região da *Scotian Shelf* que separou em populações do norte e do sul. Este achado resultou em uma revisão do número de unidades de conservação desta espécie em águas canadenses. Hess e Narum (2011) estudaram 92 marcadores SNPs ligados a pelo menos 75 diferentes genes funcionais para testar as correlações com o “tempo de corrida” do salmão do Pacífico. Os autores relataram nove SNPs significativos para traçar a história de vida destes peixes.

No que se refere a crustáceos, a literatura se limita a apenas dois trabalhos (UNAL; BUCKLIN, 2010; UNAL, 2011), dos quais nenhum aborda espécie de interesse econômico. Unal e Bucklin (2010) verificaram a estruturação genética de *Calanus finmarchicus* amostrados em 10 áreas do Atlântico Norte. Os autores examinaram a variação alélica em 24 sítios SNPs em três genes codificadores de proteínas nucleares (citrato sintetase, proteína do choque térmico-70 kDa e AMP-quinase) e relatam que estes SNPs foram úteis na detecção de uma pequena diferenciação entre as localidades. Unal (2011) identificou SNPs no gene da citrato sintetase e os utilizaram para estimar a variação genética interanual dos copépodos (*C. finmarchicus*). Os resultados indicaram a presença de uma variação significativa entre todos os anos, possivelmente como resultado de um transporte diferencial a partir de regiões adjacentes.

1.4.2.2. Aplicação dos SNPs no estabelecimento de correlações fenótipo-genótipo em populações de cativeiro

Segundo Jung et al. (2013), o foco principal do desenvolvimento de tecnologias avançadas de sequenciamento e genotipagens de SNPs é a identificação e caracterização de genes e marcadores que afetam a variação de características economicamente importantes. Estes marcadores, incluindo aqueles que afetam as características relacionadas ao crescimento, podem ser aplicados de forma estratégica para acelerar os programas de melhoramento genético para espécies de crustáceos cultivados através de MAS.

Embora a totalidade de genes candidatos que afetam as características de crescimento e desenvolvimento muscular ainda seja desconhecida, alguns deles já foram identificados em espécies de crustáceos (GLENN et al., 2005; LI et al., 2011; MARTIN-MARTI et al., 2010; SPEES et al., 2003; THANH et al., 2010; YU; CHENG; ROTHSCCHILD, 2006). Entre estes genes inclui-se o genes da actina (*ACTN*), do hormônio hiperglicêmico de crustáceos (*CHH*), da α -amilase (*AMY2*), da catepsina (*CTSL*), do receptor 1 da 5-hidroxitriptamina (*5HT1R*), do tradutor de sinal e ativador da transcrição (*STAT*), do hormônio inibidor da ecdise (*MIH1* e *MIH2*) e das proteínas do choque térmico (*HSC70* e *HSP90*).

A maioria dos estudos de associação de SNPs abrange a espécie de camarão marinho *L. vannamei*, o que é perfeitamente justificável pela sua grande representividade no cenário da carcinicultura mundial. Martin-Marti et al. (2010) analisaram o gene *5HT1R* em uma população

de *L. vannamei*. Os autores verificaram quatro SNPs (A88G, C109T, C395G, C398G) em região de éxon deste gene, sendo que os alelos C dos polimorfismos C109T e C395G se mostraram estar associados com o aumento do peso corporal. Polimorfismos em íntrons dos genes *AMY2* (G351A) e *CTSL* (C681G) também foram testados quanto a sua associação ao peso corporal de *L. vannamei* (GLENN et al., 2005). Os testes estatísticos indicaram não haver associação entre o marcador e o peso corporal. Em *P. monodon*, o SNP G178C no íntron 2 do gene *CTSL* também foi submetido à análise de associação com o peso corporal, porém a associação não foi significativa (GLENN et al., 2005). Os autores relatam que este estudo deve ser repetido nas duas espécies, no entanto, utilizando um número amostral maior. Yu; Cheng; Rothschild (2006), estudando SNPs nos genes *MIH1* e *MIH2* em uma população de *P. monodon* e no gene *CHH* de duas populações *L. vannamei*, não obtiveram efeito significativo no peso corporal. Os autores, entretanto, propõem estudos futuros ampliando o tamanho da população estudada e, ainda, extrapolar estes estudos para outras populações. Além destes genes, SNPs em genes anônimos mostraram associação significativa com ganho de peso, taxa de crescimento e sobrevivência em camarões marinhos (CIOBANU et al. 2010), demonstrando o valor de se ter marcadores localizados dentro dos genes funcionais.

Em camarões de água-doce, SNPs foram identificados a partir de bibliotecas EST de *M. rosenbergii* (JUNG et al., 2011) e *M. nipponense* (MA et al., 2012). Jung et al. (2011) identificaram genes como o da actina, da miosina de cadeias leve e pesada, da tropomiosina e da troponina, todos com papel fundamental no desenvolvimento muscular. Dentre os contigs EST, os autores caracterizaram 834 SNPs. Ma et al. (2012) em seu estudo, validaram 26 SNPs de um total de 18.107.

Embora SNPs em genes funcionais de camarões do gênero *Macrobrachium* já tenham sido identificados, o único estudo de associação de carácter quantitativo a marcadores SNPs disponível na literatura até o momento, é o estudo de Thanh et al. (2010). Os autores descreveram SNPs nos genes da *ACTN* e do *CHH* em três populações de *M. rosenbergii* e os testaram quanto à sua associação ao peso corporal. Este estudo sugere a associação entre quatro SNPs no íntron 3 do *CHH* e o desenvolvimento corporal. Dois destes SNPs (G2402T e A2561G) apresentam alta correlação com as características peso do corpo, comprimento da carapaça e comprimento padrão e outros dois SNPs (G2407A e G2409A) são correlacionados somente com o peso do corpo. Testes de associação entre haplótipos e fenótipos também

foram realizados, sendo que um haplótipo específico (TGAA) também se mostrou com efeito significativo para o crescimento.

Os SNPs detectados nas espécies congênicas ao *M. amazonicum* podem ser transferíveis e aplicáveis às análises de QTL. A transferibilidade satisfatória destes marcadores já foi relatada para outras espécies de crustáceos (GORBACH et al., 2010; KIM; JUNG; GAFFNEY, 2011).

Nos estudos citados acima, verificaram-se SNPs com efeito significativo ocorrendo tanto em regiões codificantes (sinônimos e não-sinônimos) como em regiões não-codificantes. Segundo De Santis e Jerry (2007), a ocorrência de variação alélica na sequência de DNA em qualquer uma destas regiões pode potencialmente alterar a estrutura e a atividade da proteína que eles codificam, ou ainda induzir alterações na regulação dos níveis de transcrição do mRNA. A explicação mais parcimoniosa para os efeitos fenotípicos dos SNPs sinônimos seriam alterações na estrutura do mRNA (WANG et al., 2007). Segundo estes autores, estruturas de mRNAs codificados por haplótipos alternativos do gene da proteína ligadora de odor em *Drosophila* mostram que uma única substituição de base pode ter um efeito profundo sobre a estrutura secundária do mRNA. E isto pode afetar o seu transporte, o *splicing*, a ligação ao ribossomo ou a eficiência da tradução (KIMCHI-SARFATY et al., 2007).

1.5. Estudos Genéticos na Espécie *Macrobrachium amazonicum*

Em *M. amazonicum* os estudos genético-moleculares ainda são incipientes e restritos ao conhecimento sobre a história evolutiva das populações naturais (GUERRA et al., 2010; GUERRA, 2011; PEIXOTO, 2002; VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011).

Peixoto (2002, dados não publicados) evidenciou, utilizando o gene mitocondrial da citocromo oxidase I, que populações provenientes das bacias continentais de Goiânia (GO), de Santarém (PA) e de bacias costeiras do Pará se constituem em três grupos distintos por não apresentarem fluxo gênico entre si. Vergamini, Pileggi e Mantelatto (2011), em uma análise comparativa entre populações costeiras e continentais (com representatividade de todas as bacias de ocorrência da espécie em território brasileiro, bem como de estoques cativos) usando marcadores no gene mitocondrial COI, encontraram que o *M. amazonicum* parece apresentar

uma alta diversidade genética. Contudo, esta variabilidade genética para a espécie pode ser bastante variável. Em populações naturais, esta variabilidade dependerá do rio, da localização no rio e das pressões existentes em cada ambiente, ao passo que em estoques cativos, dependerá principalmente do efeito fundador e do manejo reprodutivo realizado. Os autores ainda identificaram divergência genética significativa entre as populações avaliadas. Esta divergência estruturou as populações brasileiras em três grupos: (1) continental da Amazônia; (2) bacias do Paraná e Paraguai (Mato Grosso do Sul); e (3) sistemas costeiros do norte e nordeste (Amapá, Pará e Ceará). Esta estruturação foi atribuída pelos autores ao isolamento geográfico existente entre as populações, a qual impede a dispersão e conectividade entre elas.

Guerra et al. (2010) e Guerra (2011) estudaram a espécie *M. amazonicum* sob um aspecto taxonômico e filogenético, utilizando marcadores do tipo RAPD e mitocondriais COI e 16S. Nestes estudos, verificou-se que o *M. amazonicum* (coletado em três municípios do estado de São Paulo) é pouco divergente do *M. jelskii*. Além disso, constatou-se que as três populações de *M. amazonicum* se mantêm estruturadas geneticamente e ainda, que a espécie não foi introduzida em São Paulo a partir de espécimes oriundos do estado do Pará. Desse modo, a literatura é unânime no que se trata da condição de estruturação genética das populações de *M. amazonicum* oriundas de sistemas hidrogeográficos diferentes.

No tocante aos estudos genéticos em *M. amazonicum* mantidos em condições de cultivos, o presente trabalho é pioneiro. Atualmente está em andamento um trabalho paralelo a este, o qual visa a amplificação e sequenciamento do gene da β -actina na espécie (SASAMOTO et al., 2013), bem como a prospecção de SNPs no referido gene em populações naturais e de cativeiro (SASAMOTO, 2013 – comunicação pessoal).

1.6. Estudos de Associação de Polimorfismos de Genes das HSP70s à Características de Interesse Econômico

Em espécies aquícolas, polimorfismos no gene da HSP70 e sua associação à características de interesse para aplicação em programas de melhoramento foram realizados somente no camarão *L. vannamei* (ZENG et al., 2008). Estes autores, identificaram cinco SNPs

ao longo de um fragmento 1.119 pb do gene *HSP70* e verificaram que um deles pode estar associado a resistência ao Vírus da Síndrome de Taura (TSV).

Em animais de produção terrestres, SNPs no gene da *HSP70* se mostraram associados a características reprodutivas (HUANG et al., 2000; HUANG et al., 2002; ROSENKRANS JR et al., 2010). Em suínos, Huang et al. (2002) verificaram que SNPs no gene da *HSP70* estavam associados à redução na taxa de prenhes das fêmeas e à qualidade do sêmen dos machos avaliados durante o inverno e o verão. Durante o inverno, suínos com o genótipo A/A para o SNP C232A apresentaram maior mobilidade espermática do que aqueles com o genótipo C/C. Ainda, suínos heterozigotos C/A apresentaram maior número de espermatozoides por ejaculato do que os animais homozigotos. Durante a estação quente, os animais heterozigotos para o SNP C232A e o indel 250 exibiram maior número de espermatozoides por ejaculato do que o sêmen vindo de animais homozigotos. Para bovinos, segundo Rosenkrans Jr et al. (2010), as vacas que eram homozigotas para o alelo polimórfico para os SNPs G1128T e A1125C apresentaram menor taxa de partos do que as vacas que eram homozigotas para o alelo principal (48 *versus* 75%). Zeng et al. (2013) encontraram dois SNPs (C1476T e C1596T) no gene *HSP70* de patos. A análise de associação mostrou que a produção de ovos dos indivíduos portadores do genótipo C/C para o SNP C1476T foi significativamente mais elevada do que para indivíduos com os genótipos C/T e T/T.

Características de produção como qualidade da carne e do leite e o crescimento também foram verificadas em organismos terrestres (BROWN JR et al., 2010; HUANG et al., 2004; MAAK et al., 1998). Maak et al. (1998) estudaram SNPs na região promotora do gene *HSP70* e verificaram a influência da transição C232A no peso ao nascer em suínos. De mesma maneira, Huang et al. (2004) concluíram em sua pesquisa que polimorfismos na região promotora do gene da *HSP70* podem causar diferentes níveis de deposição de gordura em suínos da raça Duroc avaliados em diferentes estações do ano. Homozigotos para o haplótipo h1 tiveram melhor desempenho para deposição de gordura na estação fria. Em bovinos, Brown Jr et al. (2010) sugeriram que as variantes alélicas existentes no gene da *HSP* possuem algum efeito sobre o conteúdo de proteína e gordura no leite.

De acordo com os relatos destes estudos, fica claro o potencial que os polimorfismos em genes da família das *HSP70s* possuem para a aplicação em programas de melhoramento

genético. Assim como estes marcadores possuem efeitos significativos em características de importância econômica em organismos de produção terrestres, acredita-se que eles também possam causar efeito de interesse no *M. amazonicum*, e em longo prazo, serem aplicados em programas de seleção.

Sob o aspecto do uso destes polimorfismos na genética de populações, a possibilidade está menos fundamentada cientificamente, onde a literatura está baseada quase que somente em investigações dos níveis de expressão destes genes conforme a região de distribuição das espécies e conforme desafios bacterianos (JESUS; INÁCIO; COELHO, 2013; WEI et al., 2012) ou na análise de estruturação genética (UNAL; BUCKLIN, 2010).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Devido a grande importância econômica do camarão-da-amazônia (principalmente nas regiões norte e nordeste do Brasil) e a intensa interferência humana que esta espécie vem sofrendo ao longo dos anos, quer seja devido à pesca exploratória quer seja pela modificação de seus habitats (construção de barragens, poluição, etc.), o estudo genético, ainda bastante limitado, assume grande relevância para o conhecimento desses animais.

Com vistas a contribuir com as primeiras informações genéticas para serem aplicadas em duas vertentes de pesquisa abrangendo o camarão-da-amazônia, a conservação e manejo genético de populações naturais e a seleção artificial de estoques cativos, os objetivos no presente estudo foram:

- (1) Amplificar, sequenciar e descrever um fragmento do gene constitutivo da Proteína do Choque Térmico de 70 kiloDalton (HSC70) na espécie *M. amazonicum*, através da utilização de pares de *primers* delineados para a espécie congênica *M. rosenbergii*;
- (2) Identificar e caracterizar polimorfismos do tipo Polimorfismos de Base Única (SNPs) no gene da HSC70 em três populações de *M. amazonicum*: uma população experimental, proveniente do Centro de Aquicultura da UNESP; uma população nativa proveniente do rio Tocantins, coletada no município de Mocajuba-PA; e uma população nativa oriunda do rio Paracauari, amostrada no município de Soure-PA;
- (3) Associar os polimorfismos no gene da HSC70 validados na população experimental à características de interesse econômico da espécie *M. amazonicum* cultivada sob duas densidades de estocagem diferentes, uma considerada a ideal para o cultivo e outra considerando níveis de intensificação e estresse; e
- (4) Caracterizar a diversidade e estrutura genética, a partir dos SNPs validados no gene da HSC70, de duas populações naturais de *M. amazonicum*.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de Material Biológico

3.1.1. Prospecção de SNPs no gene da HSC70 do camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*)

A identificação e validação dos polimorfismos do tipo SNPs no gene da HSC70 foram conduzidas em uma população experimental de *M. amazonicum*. Para tanto, foram utilizados 48 exemplares da espécie de camarão de água-doce, obtidos no Setor de Carcinicultura do CAUNESP (Centro de Aquicultura da UNESP – Jaboticabal-SP) cujo estoque foi fundado em 2001, a partir de 2000 juvenis nativos coletados no Furo das Marinhas (1°139250S, 48°179400W), nordeste do estado do Pará.

3.2.2. Associação de SNPs do gene HSC70 à características de interesse zootécnico do camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*)

Para a obtenção de material biológico e informações fenotípicas para as análises de associação com polimorfismos no gene da HSC70, um experimento de desempenho zootécnico de camarão-da-amazônia em fase final de crescimento foi conduzido no setor de Carcinicultura do CAUNESP. Este experimento foi realizado entre os meses de agosto e dezembro de 2010.

Juvenis de dois meses de idade (970 indivíduos; peso médio 0,705 g), obtidos da desova de 260 fêmeas, foram distribuídos em dois tratamentos diferentes, com cinco repetições cada. O grupo 1 foi submetido à densidade ideal de estocagem proposta por Moraes-Valenti e Valenti (2007): 40 camarões por metro quadrado de lâmina d'água (32 camarões por unidade experimental, totalizando 160 indivíduos deste tratamento). O grupo 2 foi exposto à uma condição estressante (162 camarões por unidade experimental, totalizando 810 indivíduos deste tratamento): 200 camarões por metro quadrado de lâmina d'água. Os animais foram cultivados durante 120 dias, cujo período é de prática comercial para a fase de engorda do camarão da Malásia, *M. rosenbergii*.

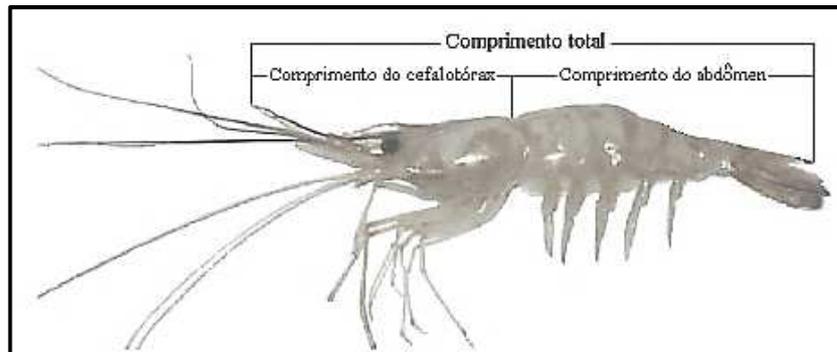
Cada unidade experimental foi composta por uma caixa de fibrocimento de 1.000 L (com área de lâmina d'água de 0,80 metros quadrados) alojadas em estufa, de modo que as condições de qualidade de água fossem melhor controladas, assim reduzindo o efeito do erro residual nas análises estatísticas. Cada caixa permaneceu vinculada a um filtro biológico (VALENTI; DANIELS, 2000), no qual foi empregado conchas de moluscos como substrato para o desenvolvimento da população de bactérias nitrificantes nos biofiltros. Além disso, as caixas foram providas de aeração constante e termostatos.

Após o povoamento dos tanques (dia 18/08/2010), os camarões foram alimentados com dieta comercial para camarões marinhos "*Aquamarão Engorda I*" (Poli-nutri). Para o fornecimento, a ração foi moída e peneirada nas granulometrias de 0,75 mm, 1,1 mm e 1,8 mm do primeiro ao terceiro mês e 0,75 mm, 1,1 mm, 1,8 mm e 2,38 mm no quarto mês de cultivo. A taxa diária de arraçoamento de cada tanque foi 9% da biomassa no primeiro mês, sendo reduzida em 2% a cada mês, atingindo a taxa de 3% da biomassa ao término do experimento. A ração foi dividida em duas porções iguais e fornecida entre 08-09 horas e entre 16-17 horas.

Diariamente, foi monitorado o oxigênio dissolvido (oxímetro YSI-55), temperatura e fluxo de renovação de água pelo biofiltro. A cada dois dias foi realizada a leitura de pH (pHmetro digital YSI-63). As concentrações de amônia (SOLORZANO, 1969) e nitrito (BENDSCHNEIDER; ROBINSON, 1952) foram determinadas quinzenalmente. Além disso, três vezes ao dia, cada tanque era verificado quanto à existência de animais mortos. Essa prática deixou de ser realizada ao longo do experimento devido à baixa mortalidade e ao comportamento de canibalismo da espécie, o qual impossibilitou a inferência de possível associação de polimorfismos no gene da HSC70 à sobrevivência.

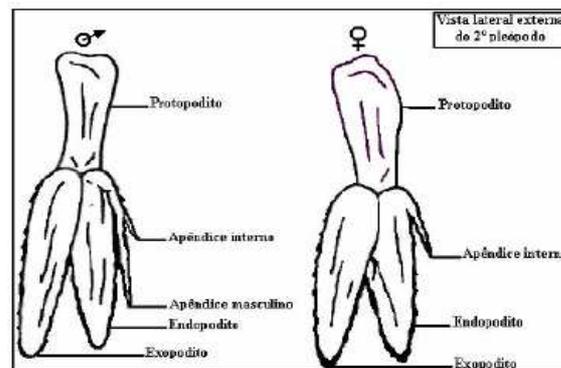
Biometrias foram realizadas mensalmente para realizar o controle da biomassa em cada unidade experimental (para fins de cálculo da taxa de arraçoamento) e para acompanhar o comportamento da estrutura populacional ao longo do experimento. Foram amostrados cinco camarões dos tanques com densidade de estocagem igual a 40.m⁻² e 15 dos tanques com densidade igual a 200.m⁻². Durante as biometrias os animais foram medidos quanto ao comprimento total e pós-orbital (abdominal)(Figura 4), pesados, sexados (CERVIGÓN et al., 1992)(Figura 5) e separados conforme o grupo demográfico de fêmeas e morfotipos masculinos (MORAES-RIODADES; VALENTI, 2004)(Figura 6). Depois da biometria, os camarões eram devolvidos aos tanques.

Figura 4 - Desenho esquemático das dimensões usadas nas análises biométricas do *M. amazonicum*.



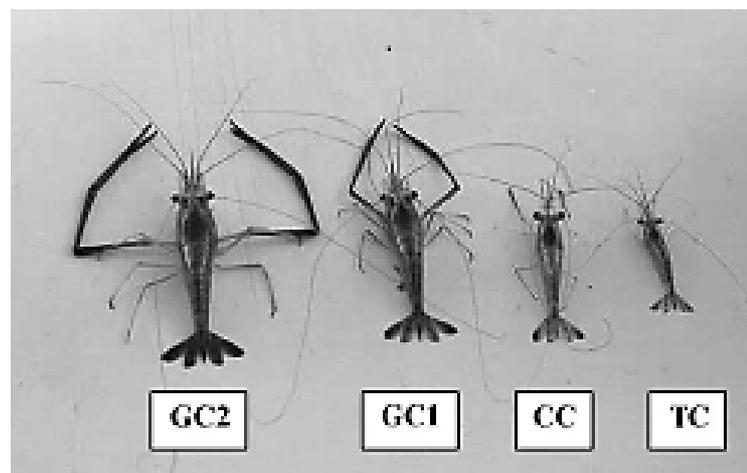
Fonte: Silva (2006).

Figura 5 - Desenho esquemático da diferenciação sexual de machos e fêmeas da espécie *M. amazonicum*.



A diferenciação é realizada pela verificação do apêndice masculino e interno localizados no segundo par de pleópodos. As fêmeas apresentam apenas o apêndice interno. Fonte: Valenti (1996).

Figura 6 - Morfotipos dos machos da espécie *M. amazonicum*.



Fonte: Moraes-Riudades e Valenti (2004).

Ao final de quatro meses (dia 17/12/2010) de cultivo, foi realizada a despesca total dos tanques, quando os animais foram abatidos em água e gelo na proporção 1:1. Para análise

genético-molecular foram coletados todos os animais da densidade 40 (n=136; considera-se a existência de mortalidade e perda de dados fenotípicos) e 15% do total de animais da densidade 200 (n=133; considera-se a perda de alguns dados fenotípicos). As amostras foram individualizadas, identificados conforme o tratamento e a repetição ao qual foram submetidos e mensurados os seguintes parâmetros biométricos: comprimento total (C_T), comprimento abdominal (C_P), peso inteiro (P_{INT}), peso abdominal (P_{ABD}) e peso do hepatopâncreas (P_{HEP}). O peso abdominal e de hepatopâncreas foram usados para determinar o rendimento corporal (RC) e o índice hepatossomático (IHS), respectivamente. Estes dois parâmetros foram calculados conforme as equações 1 e 2 abaixo:

$$RC(\%) = \frac{\text{peso abdominal (g)}}{\text{peso total ao abate (g)}} \times 100 \quad \text{Eq. 01}$$

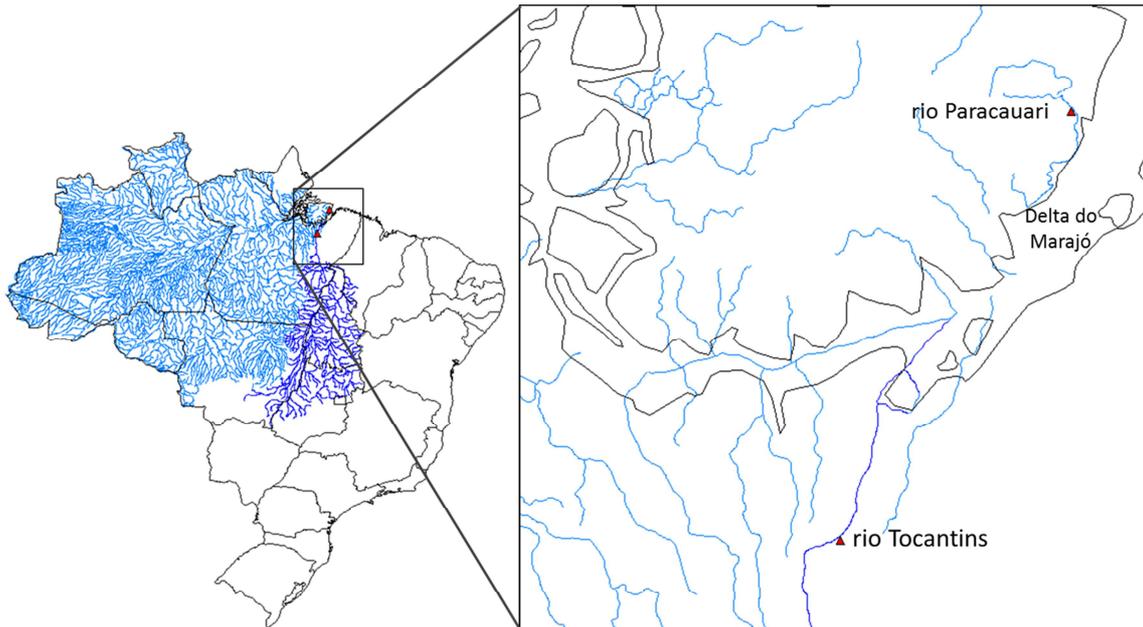
$$IHS(\%) = \frac{\text{peso do hepatopâncreas (g)}}{\text{peso total ao abate (g)}} \times 100 \quad \text{Eq. 02}$$

Todas as amostras foram congeladas e encaminhadas ao Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação da UFSCar para a extração de DNA, genotipagem e posterior associação de SNPs no gene da HSC70 aos caracteres fenotípicos mensurados.

3.2.3. Diversidade e Estruturação Genética de Populações de Camarão-da-Amazônia (Macrobrachium amazonicum) Baseada em SNPs no Gene da HSC70

A identificação de SNPs também foi realizada em duas populações naturais de camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*), das quais uma foi coletada no rio Tocantins (bacia do rio Tocantins), à jusante da UHE de Tucuruí, no município de Mocajuba-PA (n=47) e outra no rio Paracauari (bacia do rio Amazonas; sub-bacia do Marajó Oriental), em Soure-PA (n=30). Estas bacias apresentam conectividade ao passo que o rio Tocantins desemboca no rio Pará, o qual corre ao Sul da Ilha de Marajó, pertencente ao estuário do rio Amazonas (EPE, 2007). Ambos os rios desembocam no delta do Marajó (Figura 7).

Figura 7 - Pontos de coletas de duas populações naturais de *M. amazonicum*.



No mapa a esquerda está representado o a extensão territorial brasileira, contendo as duas bacias hidrográficas de onde foram obtidas as amostras. Em azul claro corresponde à bacia do rio Amazonas e em azul escuro a bacia do rio Tocantins. O mapa à direita representa a visualização em zoom do recorte destacado na figura ao lado. Os pontos de coleta são indicados pelo triângulo fechado em vermelho e estão separados por aproximadamente 250 km de distância.

3.2. Extração de DNA

As extrações do material genômico foram realizadas a partir de tecido muscular dos camarões-da-amazônia utilizando fenol/clorofórmio (1:1), conforme protocolo proposto por Sambrook e Russel (2001), com modificações. Para tanto, porções de aproximadamente 0,05g de tecido foram colocados em microtubos, adicionando-se 550 μL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100mM de NaCl), 40 μL de SDS 20% e 10 μL de proteinase K (20 mg/ml). As amostras foram homogeneizadas em *vortex* e incubadas a 55°C *overnight* em termobloco (Eppendorf). Após a digestão do material biológico, realizou-se a desproteíntização e purificação dos ácidos nucleicos, adicionando-se 275 μL de fenol e 275 μL de clorofórmio nas amostras, cujas fases foram misturadas por inversão dos tubos e centrifugadas por 30 minutos a 10483 x g (12000 rpm). Após a centrifugação, o máximo possível de sobrenadante de cada amostra (porção onde se encontra os ácidos nucleicos) foi retirado e transferido para um tubo novo, no qual foi adicionado igual volume de clorofórmio. As fases foram remisturadas por

inversão dos tubos e as amostras centrifugadas por 30 minutos com a mesma rotação. O sobrenadante foi recuperado, transferido para um tubo novo e adicionado 1/10 do volume recuperado de acetato de sódio 3M (pH 7,0) e 1000 μL de etanol absoluto gelado. Cuidadosamente as fases foram misturadas até que os *pellets* de DNA fossem visualizados. Em seguida, as amostras foram incubadas até a manhã seguinte (*overnight*) a -20°C para completa precipitação dos ácidos nucléicos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a $10483 \times g$ (12000 rpm) e o etanol cuidadosamente vertido, de modo a evitar a perda do *pellet* de DNA. Duas lavagens do DNA foram realizadas em seguida. Cada lavagem foi composta pela adição de 1000 μL de etanol 70°GL e centrifugação por mais cinco minutos a $15306 \times g$ (14500 rpm). As amostras de DNA foram mantidas em estufa a 37°C até a completa evaporação do etanol e, posteriormente, ressuspendidas em 50 μL de tampão TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA). Para a completa eluição, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por três dias.

As amostras de DNA completamente eluídas foram quantificadas por meio da análise da densidade óptica em biofotômetro (Eppendorf), método pelo qual o DNA absorve o comprimento de onda de 260nm e as proteínas, de 280nm. A pureza das amostras foi determinada pela razão 260nm/280nm, sendo os valores ideais da razão entre ácidos nucléicos/proteínas, aqueles que estavam entre 1,8 e 2,2 (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A integridade das amostras de DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8%, revelado com o intercalante GelRed™ (1:300). A eletroforese foi conduzida em cuba horizontal, a 110 volts por 50 minutos, usando tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA). As imagens foram visualizadas e capturadas em transluminador com luz ultravioleta do sistema DNR MiniBis Pro (*GelCapture* versão 6.6). Posteriormente, alíquotas de todas as amostras foram padronizadas a $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de DNA e estocadas a -20°C até o momento das ampliações.

3.3. Amplificação dos Fragmentos do Gene da HSC70

3.3.1. Delineamento dos Oligonucleotídeos

Para a amplificação e sequenciamento do gene da HSC70 do camarão *M. amazonicum* foram testados dois pares de *primers* construídos a partir da sequência do gene da HSC70 da espécie congênica *M. rosenbergii* (camarão da Malásia), descrita por Liu et al. (2004) e disponível no GenBank sob o número de acesso AY466445. Esta sequência foi utilizada como referência, pois, conforme uma intensa busca nos bancos de dados genômicos, a sequência do gene da HSC70 do camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*) ainda não havia sido descrita até o momento do início deste estudo.

Os pares de *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *Primer 3* (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Como a região escolhida para o estudo é maior do que 700 pb (tamanho próximo ao limite para um bom sequenciamento), a sequência foi dividida em duas regiões, o que permitiu a construção de dois pares de *primers*. Para tanto, teve-se o cuidado de manter regiões de sobreposição dos fragmentos, para garantir que, durante a edição das sequências, fosse possível concatená-las sem que ocorresse a perda de parte da sequência (Figura 8).

A qualidade dos oligonucleotídeos foi checada com auxílio do programa *OligoAnalyzer* 3.1. Para a seleção dos *primers* alguns critérios foram seguidos como: o conteúdo de bases CG deveria compreender entre 40-60%; temperatura de *melting* ideal deveria corresponder a aproximadamente 60°C; as extremidades dos *primers* deveriam conter CG; a diferença da temperatura de anelamento entre os *primers forward* e *reverse* não deveria ser maior que 3°C e a escolha de *primers* que formassem estruturas como *hairpins*, heterodímeros e/ou homodímeros deveriam ser evitadas. Com relação a estas estruturas, a ferramenta *OligoAnalyzer* fornece valores de ΔG (energia livre de Gibbs, que determina a espontaneidade da reação) e de ΔH (entalpia, que determina a energia liberada ou absorvida durante a reação). Para ambos os parâmetros, o ideal é que os valores sejam próximos ou maiores que zero, indicando que a formação das estruturas não ocorrem espontaneamente ($\Delta G \geq 0$) ou que necessitam receber energia para a sua formação ($\Delta H \geq 0$). Como nem sempre é possível atender a todas as exigências, portanto permitiu-se o uso de *primers* com estas estruturas desde que estas fossem formadas a uma temperatura em torno de 30°C menor que a T_m (temperatura de

melting) do *primer* desenhado, de modo que as reações para a formação das estruturas não competissem com a reação de anelamento entre a fita molde e os *primers*.

Depois de escolhidos os pares de *primers* (Quadro 1) checkou-se a especificidade de modo a garantir que estas sequências se hibridizem na região de interesse. A especificidade dos *primers* foi verificada com o auxílio da ferramenta *Nucleotide BLAST* (ALTSCHUL et al., 1990).

Figura 8 - Estrutura do gene da HSC70 do camarão da Malásia (*M. rosenbergii*), descrita por LIU et al. (2004).

```

1 aaaagtcgct ctcgctcagt tgtacgaggc acgtcggttg ttgaaggtgt tgttggtcgg
61 tttgtgTTTT ccatcgTTTT aaagtcgaaa catcatggcg aaatcagctg ctgttgggat
121 tgatctagga actacatact cgtgtgctgg agtgttccag catggcaaaag ttgagatcat
181 tgccaacgac cagggcaacc gaaccacccc ttcgtatgtc gccttcacag acacagagcg
241 ccttattggg gatgctgcca agaatcaggt ggccatgaac cccaacaaca ctgtatttga
301 tgccaaacgg ctcaattggcc gaaagtttga tgacgggtgt gttcagctcg acatgaagca
361 ttggcctttt actgtcataa atgataatac taagccaaaa attcaagtag attacaaggg
421 tgaaacgaaa acatTTTTcc cagaagaaat ttcataatg gttctaatta aaatgaaaga
481 aactgcagag gcattcctgg gcagcactgt gaaagatgct gttattactg ttcctgccta
541 cttcaatgat tctcagcgtc aagctaccaa agatgcaggg acaatctctg gtctgaatgc
601 ccttcggatc attaatgagc ctactgctgc tgccatcgct tatggcttag acaaGAAGGT
661 TGGAGGAGAA cgcaatgTTT tgatcTTTga tcttgggtggg ggcactTTTT atgtgtcaat
721 tctaaccatt gaggatggaa tttttgaggt aaaatccaca gctggtgata ctcaactggg
781 tgggtaagat tttgataaca gaatggtaaa tcacttcatt caagagttca agcgaaagta
841 caaaaaagat ccctctgaga acaaacgtgc tcttcgcgct ctccgtactg cttgtgagcg
901 tgcaaacgac actctttcag cctctgccc agcaagtatt gaaattgatt ctttgtatga
961 ggttactgat ttttacacat cgttactctg tgcaaggttt gaggatttgt gtygtgactt
1021 gttccgtggg acccttgagc ctgtagagaa atccctgaga gatgccaaaa tggataaggc
1081 acagattcat gacattgttc ttgttggagg atccactagg attccaaga ttcagaaatt
1141 actgcaagat ttcttcaatg ggaagaact gaataaatct atCAATCCAG ATGAAGCTGT
1201 AGCatgtggg gtgctgtAC AGGCAGCTAT TTTGTGTGgt gataaatctg aggcgtgtgca
1261 agatctgctt ctcttggatg ttacacctct gtctcttggg attgaaactg ctggaggagt
1321 tatgacggca ctcaattaac gtaacaccac aatccaacc aagcagactc agacattcac
1381 cacttattca gacaatcagc ctgggtgtgtt aattcaagtt tatgaaggag agcgtgcaat
1441 gacaaaggat aacaacctcc tgggtaaaatt tgaactctct ggtattctc cagctccacg
1501 aggagtgcc acaattgaag tgacttttga tattgatgcc aatggtatcc tgaatgtgtc
1561 tgctgaggac aagtcaactg gtaaggagaa caaaatcaca atcacaatg acaagggctc
1621 cctcagtaaa gaagaaattg aacgtatggt tcaagaagct gaaagtaca aagctgatga
1681 tgagaagcaa cgtgatcgca ttgcagcaaa gaatagtttg gaatcttact gcttcaacat
1741 gaagtccacc gtggaagatg acaaGTTTAA GGACAAGGTG CCagaggagg atcgcaacaa
1801 gataatggaa gcttgcaatg atgccatcaa atggctggat tctaatacagc tgggagagaa
1861 ggaagagtat gagcataaat tgaaggaaat agaacaaatc tgcaatocca tcatcaca
1921 aatgtatcaa gcagctgggtg gtgccctcc aggtggatg ccaggtggct tcccaggtgc
1981 accaggtggg ggtgctgcac ctgggtgggg ttctctctggc ccaaccattg aagaagtaga
2041 ttaaattatt ttccttaaca aacaatctct ttggcttttg cagtttatt ataaattta
2101 ctttatttgt atcattattt tatttctgaa tatgcagttg tcttgaatgt cgtgccaat
2161 tattgaatga gttttgatat acatgttttg ttttgtaatc tttcattata taatattac
2221 acatTTTTat tgtttgttaa gatatgcaga ttttcaaact tcaaattatt aatcatattt
2281 tggctgtaga tagcctatac aaagcagagt acttaggtat ttgtttctt caccaaagaa
2341 ctgttattga gttttcagaa aacttggac tacttgattt tcagcatatt agcaattact
2401 atgttcattc aaaaataaat tttttagtaa tcaaaaaaaaa aaaaaaaa

```

Região em negrito e caixa alta: par de *primers* HSC70-P1; região grifada e em caixa alta: par de *primers* HSC70-P2; região sombreada em cinza claro: região amplificada equivalente aos dois fragmentos; região sombreada em cinza escuro: região de sobreposição dos fragmentos.

Quadro 1 - Sequências dos *primers* delineados para as amplificações de PCR dos fragmentos do gene da HSC70 de *M. amazonicum* e suas respectivas posições de complementariedade na sequência-referência, tamanho esperado do fragmento e temperatura de anelamento (T_a).

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Posição na sequência referência	Tamanho do fragmento (pb)	T_a (°C)
HSC70-P1F	GAAGGTTGGAGGAGAACGCA	655	584	55
HSC70-P1R	CACACAAAATAGCTGCCTGT	1239		
HSC70-P2F	CAATCCAGATGAAGCTGTAGC	1182	600	55
HSC70-P2R	GGCACCTTGTCTTAAAC	1782		

3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Os *primers* delineados a partir da sequência do gene da HSC70 do *M. rosenbergii*, foram utilizados para descrever parte da sequência do referido gene no *M. amazonicum*, através da amplificação cruzada. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 25 μ L, com *mix* de PCR constituído por tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2,0 mM de $MgCl_2$ (50 mM), 0,35 μ M de *primers*, 0,25 mM de dNTPs, 0,5 unidade de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Invitrogen) e 50 ng de DNA molde.

As amplificações por PCR foram conduzidas em termociclador (Veriti - Applied Biosystems) programado para 35 ciclos, com um passo inicial de desnaturação a 95°C por cinco minutos e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos. Cada ciclo foi constituído por: 30 segundos a 94°C; 45 segundos na temperatura de hibridização de cada par de *primers* (Quadro 1); e, finalmente, um minuto a 72°C.

Todos os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (1:300) e comparados com o padrão de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). A eletroforese foi conduzida em cuba horizontal, a 90 volts por 40 minutos, com meio condutor de corrente elétrica tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA). Em seguida, os géis foram expostos à luz ultravioleta e as imagens foram capturadas pelo sistema DNR MiniBis Pro (*GelCapture* versão 6.6).

3.4. Sequenciamento dos Fragmentos do Gene da HSC70

3.4.1. Purificação dos Produtos de PCR

Os produtos da amplificação dos fragmentos do gene da HSC70 foram submetidos à purificação com Polietileno Glicol 8000 (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2001), a fim de retirar os componentes da PCR que poderiam interferir na qualidade do sequenciamento destes produtos. Para tanto, foi adicionado 25 μL de solução PEG (PEG 8000 20% NaCl 2,5M) ao produto de PCR (volume/volume), o qual foi incubado em termobloco (Eppendorf) por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 1268 x g (3000 rpm) durante 30 minutos e todo o sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Adicionou-se 125 μl de etanol 80°GL gelado aos *pellets* e uma nova centrifugação a 1268 x g foi realizada por 30 minutos. As amostras foram colocadas para secagem em estufa a 37°C por tempo suficiente para evaporação completa do etanol. Em seguida, adicionou-se 20 μL de água ultrapura autoclavada e as amostras foram deixadas em temperatura ambiente *overnight* para a total eluição dos *pellets*.

Os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose 1,0%. Sendo assim, 1,0 μL de cada amostra foram ladeados com o padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) para comparação. Depois destes procedimentos, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o envio para sequenciamento.

3.4.2. Sequenciamento dos Produtos de PCR

Os produtos da amplificação dos fragmentos do gene da HSC70 foram submetidos ao sequenciamento direto (concentração mínima de 30 ng/ μL) das fitas senso e antissenso, realizado pela técnica de terminação em cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa sul-coreana Macrogen Inc., a qual utiliza o sequenciador automático 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

3.5. Análises *in silico* das Sequências

3.5.1. Sequências Nucleotídicas

Os eletroferogramas obtidos a partir do sequenciamento automático foram editados no programa *Geneious* 5.6.4, no qual é possível verificar a viabilidade dos fragmentos sequenciados através da qualidade dos picos dos eletroferogramas apresentados, bem como utilizar-se de ferramentas de alinhamento e concatenação de sequências (obtenção de “contigs”) e obtenção de sequências consenso.

Durante a edição, primeiramente obteve-se a sequência reversa complementar para aqueles sequenciamentos que foram realizados com o *primer reverse*, ou seja, a fita antissenso (3'-5') foi convertida em fita senso (5'-3'). De posse de todas as sequências dispostas no sentido 5'-3', foi feito o alinhamento múltiplo de todas as amostras a fim de verificar possíveis erros de sequenciamento e eliminá-los. Para tal procedimento, lançou-se mão do uso da ferramenta *ClustalW* (HIGGINS; SHARP, 1988), implementada no pacote *Geneious*. Além disso, as sequências dos *primers* foram localizadas nas sequências, e a região anterior ao *primer forward* e a posterior ao *primer reverse* foram excluídas. O passo seguinte foi obter uma sequência consenso e o contig para cada amostra. E então, finalmente gerou-se uma sequência consenso para a região a ser estudada do gene da HSC70 do camarão-da-amazônia. Esta última etapa da edição corresponde à forma como a sequência foi depositada no banco de dados do NCBI, *GenBank*.

O procedimento *Nucleotide BLAST* (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado como uma primeira verificação se as sequências obtidas para o *M. amazonicum* neste estudo tratavam-se do gene HSC70.

Depois de uma primeira estimativa de identidade da sequência obtida neste trabalho, as sequências do gene da HSC70 de *M. amazonicum* foram comparadas com outras espécies através do programa *ClustalW*. Nesta análise comparativa utilizou-se a espécie-referência *M. rosenbergii* e a sequência do camarão de água-doce *M. nipponense*.

A sequência parcial do gene da HSC70 do camarão-da-amazônia foi depositada no banco de dados genéticos *GenBank*, cujo número de acesso é indicado no Quadro 2.

3.5.2. Sequências Peptídicas

A sequência consenso gerada para o gene HSC70 foi traduzida através da ferramenta BLASTx (ALTSCHUL et al., 1990). Além da tradução virtual, este procedimento forneceu o frame de leitura da sequência.

A sequência de aminoácidos predita foi alinhada com a sequência da proteína HSC70 de *M. rosenbergii* (*ClustalW*) a fim de comparar a região sequenciada com a proteína da espécie congênica, confirmando a identidade do produto gênico em questão.

Embora neste trabalho não esteja sendo trabalhado com a sequência completa de aminoácidos da HSC70 do camarão-da-amazônia, procedeu-se uma análise que prevê os locais funcionais ou domínios na sequência de aminoácidos. Esta previsão foi realizada com o auxílio do software *Motif Search*.

Além da comparação por alinhamento múltiplo entre as espécies do gênero *Macrobrachium*, buscou-se confirmar a identidade da sequência trabalhada neste estudo através da dedução de relações genéticas destas sequências com 10 sequências peptídicas dos genes da HSP70 e da HSC70 de crustáceos. O grupo externo utilizado foram as sequências peptídicas da *Drosophila melanogaster*. Todas estas sequências foram obtidas no *GenBank*, cujos números de acessos estão disponíveis no Quadro 2.

Nesta análise, os dendrogramas foram produzidos usando o programa MEGA 5. (TAMURA et al., 2011). As árvores de relações genéticas foram determinadas utilizando o método de distância de *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987) e as distâncias genéticas calculadas pelo modelo de p-distância. A importância relativa da ordem de ramificação foi avaliada por *bootstrapping* (1000 repetições).

Quadro 2 - Sequências dos genes de membros da família da HSP70 utilizadas no presente trabalho.

Espécie	Molécula HSP70	Número de acesso no <i>GenBank</i>	Referência
<i>M. rosenbergii</i>	Constitutiva	AY466445	LIU et al. (2004)
<i>M. rosenbergii</i>	Induzível	AY466497	LIU et al. (2004)
<i>M. nipponense</i>	Constitutiva	DQ660140	XIE et al. (2006)- não publicado
<i>M. amazonicum</i>	*	JX948079	Presente trabalho
<i>M. ensis</i>	Constitutiva	DQ486134	XIE et al. (2006)-não publicado
<i>P. monodon</i>	Constitutiva	EF472918	LO et al., (2004)
<i>L. vannamei</i>	Constitutiva	EF495128	WU et al. (2008)
<i>F. chinensis</i>	Induzível	FJ167398	LUAN et al. (2010)
<i>F. chinensis</i>	Constitutiva	AY748350	JIAO et al. (2004)
<i>C. quadricarinatus</i>	Induzível	HM800921	FANG et al. (2012)
<i>P. trituberculatus</i>	Induzível	FJ830635	CUI et al. (2010)
<i>D. melanogaster</i>	Constitutiva	L011500	RUBIN et al. (1993)
<i>D. melanogaster</i>	Induzível	AE014297	---

(*)Sequência proveniente do presente estudo.

3.5.3. Prospecção dos SNPs

A descoberta de um SNP por análise de resultados de sequenciamento de nucleotídeos consiste na identificação de dois picos sobrepostos em uma mesma posição do eletroferograma, cuja presença é interpretada como um polimorfismo de um indivíduo heterozigoto. Esta metodologia permite a identificação de polimorfismos, pois há a análise dos sinais expressos no sequenciamento do material genético e detecta-se a variação dos sinais de fluorescência dos cromatogramas, procurando por reduções nas regiões do pico do sinal onde uma segunda base foi detectada.

As sequências obtidas neste trabalho foram analisadas com o auxílio do programa *Geneious*. Neste programa está implementado o algoritmo de nomeação de bases do *Phred* (EWING, et al. 1998; EWING; GREEN, 1998), o qual, a partir dos dados brutos do sequenciador,

atribui a chance de cada base estar incorreta. Um valor de qualidade de *Phred* igual a 10 representa que aquela base tem uma chance em dez de estar incorreta (10%). Como o valor está em escala logarítmica, um valor de *Phred* 20, significa que aquela base tem uma chance em cem de estar incorreta (1%) e um valor de 30 representa uma chance em mil (0,1%). Frequentemente, aceita-se que um valor de *Phred* igual a 20 é suficiente para aceitar uma base como real.

De posse desta ferramenta de bioinformática, primeiramente as sequências foram alinhadas par a par (sequência senso com a antissenso, de cada indivíduo e de cada fragmento separadamente) e analisadas individualmente para checar a qualidade dos dados brutos. As amostras que apresentaram sequência com baixa qualidade (*High Quality* HQ<80%) foram ressequenciadas.

As sequências também foram editadas retirando-se as extremidades onde o sinal de sequenciamento é ruim e em seguida, os eletroferogramas da região HSC70-1 e HSC70-2 foram concatenados de modo a reduzir o trabalho durante as análises visuais das sequências. Durante esta edição das sequências, as bases que continham picos sobrepostos foram codificadas com código de degeneração de bases (IUPAC), conforme mostrado no Quadro 3.

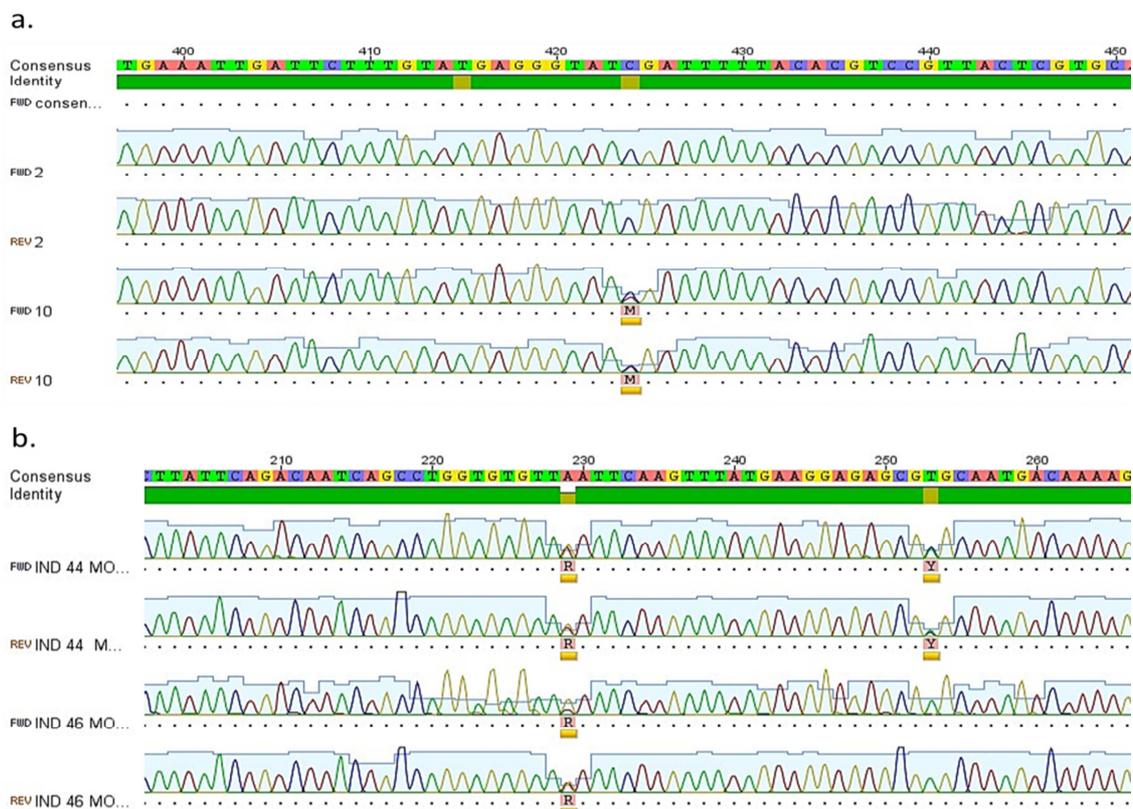
Quadro 3 - Código de degeneração de bases, conforme discriminação da *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC.

Código de degeneração das bases	
Código	Variação
A	A
T	T
C	C
G	G
R	A,G
Y	C,T
M	A,C
K	G,T
S	G,C
W	A,T
H	A,C,T
B	G,T,C
V	G,C,A
D	G,A,T
N	A,C,G,T

A comparação das sequências do gene *HSC70* e busca por SNPs na população de camarão-da-amazônia foi feita por similaridade com a sequência consenso de parte do gene da *HSC70* do *M. amazonicum* obtida neste trabalho. Este procedimento consiste no alinhamento múltiplo e global das sequências (*ClustalW*), o qual possibilitou também a verificação e descrição do posicionamento dos SNPs.

Desse modo, em cada indivíduo, os polimorfismos foram buscados por meio de minuciosa inspeção visual. Cada par de bases na qual ocorreu a sobreposição de pico no eletroferograma da fita senso foi conferido na fita antissenso e vice-versa. Sendo assim, se a sobreposição de picos estivesse presente em somente uma das fitas, considerou-se um artefato de sequenciamento e não um polimorfismo. Na Figura 9 estão representados os eletroferogramas dos segmentos HSC70-1 (a) e HSC70-2 (b), contendo um polimorfismo na sequência *forward* e a sua confirmação na sequência *reverse*.

Figura 9 - Identificação dos SNPs através de alinhamento dos eletroferogramas e busca por picos de sobreposição de sinais de fluorescência em *M. amazonicum*.



(a) Representa o eletroferograma parcial do fragmento amplificado com o par de *primers* Hsc70-P1, podendo ser observado um heterozigoto para a troca de uma citosina para uma adenina na posição 424 pb. (b) Representa o eletroferograma parcial do fragmento amplificado com o par de *primers* Hsc70-P2, podendo ser observado um heterozigoto para a troca de uma adenina para uma guanina na posição 229 pb e um para a troca de uma timina para uma citosina na posição 253 pb. Em a e b a confirmação dos SNPs é feita na sequência *reverse*.

Identificados os SNPs e o seu posicionamento conforme a sequência descrita para o gene da HSC70 padronizou-se a nomenclatura destes SNPs. Esta denominação foi feita de acordo com as bases nucleotídicas envolvidas na substituição e a posição de ocorrência do SNP. Sendo assim, por exemplo, um SNP constituído pela troca de uma adenina por uma guanina na posição 295 da sequência foi nomeado como A295G.

Uma sequência hipotética contendo as variantes polimórficas para parte do gene da HSC70 foi criada. Esta sequência foi submetida à tradução (*Geneious*) e então, o segmento proteico obtido foi alinhado (*ClustalW*) contra a sequência de aminoácidos descrita anteriormente. Este procedimento permitiu verificar se os SNPs são sinônimos ou não-sinônimos.

3.6. Análises Estatísticas

3.6.1. Prospecção de SNPs no gene da HSC70 do camarão-da-amazônia (Macrobrachium amazonicum)

As frequências alélicas dos SNPs identificados nas populações de *M. amazonicum* foram determinadas através do programa *GenAlEx* 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Este programa, no caso de dados codominantes, determina a frequência dos alelos por contagem da proporção dos diferentes alelos.

O cálculo de eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi obtido pelo algoritmo Cadeia de Markov-MonteCarlo (MCMC), feito por meio do programa *Genepop* (RAYMOND; ROUSSET, 1995). A correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989) foi utilizada para corrigir os intervalos de significância para o teste de desvios do EHW.

*3.6.2. Associação de SNPs do Gene HSC70 à Características de Interesse Zootécnico do Camarão-da-Amazônia (*Macrobrachium amazonicum*)*

3.6.2.1. Variáveis da qualidade da água

Os dados de cada variável de qualidade de água obtidos nas cinco unidades experimentais de cada tratamento foram agrupados e, a partir daí, determinou-se a média, o desvio-padrão e os valores mínimo e máximo. As médias foram comparadas por Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F, ao nível de 5% de significância ($P \leq 0,05$).

3.6.2.2. Estatística descritiva das informações fenotípicas

3.6.2.2.1. Estrutura demográfica

Foram determinadas as frequências absoluta e relativa de cada morfotipo de machos e de cada grupo demográfico de fêmeas em cada biometria ao longo do cultivo e na despesca. Então, foram calculadas a média e o desvio padrão para cada tratamento. A variação temporal da frequência relativa de cada grupo foi estudada por análise gráfica, enquanto que a frequência relativa de cada grupo na população no momento da despesca foi submetida à ANOVA pelo teste F. Ressalta-se que, para a realização da ANOVA, os dados foram previamente testados quanto à normalidade de sua distribuição e, quando este critério não foi satisfeito, realizou-se a transformação arco seno \sqrt{x} . Contudo, os valores originais são apresentados para facilitar a interpretação.

3.6.2.2.2. Desempenho zootécnico

Após quatro meses de cultivo foi realizada a despesca. Para a análise dos dados fenotípicos, utilizaram-se todos os animais da densidade 40 e cerca de 30 animais da densidade 200, totalizando um tamanho amostral de $n=266$. A sobrevivência em cada tratamento foi estimada pelo quociente entre o número de animais despescados e o número de animais estocados. Os valores de sobrevivência foram submetidos à transformação arco seno \sqrt{x} para a realização da ANOVA. O valor de significância considerado foi $P \leq 0,05$.

Foram determinadas a média geral da população para cada um dos caracteres avaliados, a média dos caracteres de cada tratamento e a média dos caracteres de cada morfotipo dos machos e de cada grupo demográfico de fêmeas. Os efeitos da densidade de estocagem (equação 03), bem como dos morfotipos masculinos e dos grupos demográficos de fêmeas (equação 04) foram estimados através do procedimento *Proc. Mixed* do pacote SAS (SAS Institute Inc., 2000), pelos modelos lineares mistos:

$$y_{ij} = \mu + D_i + T_j + e_{ij} \quad \text{Eq. 03}$$

$$y_{ij} = \mu + GD_j + T_j + e_{ij} \quad \text{Eq. 04}$$

Em que y_{ij} é a característica mensurada de n th indivíduos; μ é a média global para a característica; D_i é o efeito fixo da densidade de estocagem i ($i = 1, 2$), GD_i é o efeito fixo da classe demográfica i ($i = 1, 2$) e T_j é o efeito aleatório da réplica j ($j = 1, 2, \dots, 10$); e e_{ij} é o erro residual de n th indivíduos. As declarações de diferenças significativas foram baseadas na aceitação de $P \leq 0,05$.

Para a determinação das relações existentes entre as variáveis, utilizou-se o teste estatístico de correlação de Pearson (r), tendo como objetivo determinar até que ponto os valores de uma variável estão correlacionados com os de outra variável.

3.6.2.2.3. Genotipagem dos SNPs e frequências alélicas

Conforme já descrito na seção 3.6.1, as frequências alélicas dos SNPs foram calculadas através do programa *GenAlEx* 6.5. e os desvios do EHW foram calculados no programa *Genepop*. A correção sequencial de Bonferroni foi utilizada para corrigir os intervalos de significância para o teste de desvios do EHW.

Os valores de frequência alélica foram determinados também de acordo com a densidade de estocagem e com a classe demográfica. As diferenças estatísticas entre os grupos foram testadas pelo teste F, considerando-se o nível de significância de $P \leq 0,05$.

3.6.2.2.4. Reconstrução dos haplótipos e frequências haplotípicas

Como os genótipos inferidos no presente trabalho possuem fase gamética desconhecida, isto quer dizer que, caso um indivíduo seja heterozigoto em mais de um sítio da sequência estudada, não é possível especificar diretamente quais alelos destes sítios ocorrem em um mesmo cromossomo. Para tanto, na definição da fase utilizou-se a inferência estatística dos haplótipos implementada através do algoritmo *Phase* (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001) incluso no software *DnaSP* 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). O *Phase* usa a estatística Bayesiana associada aos conceitos da teoria da coalescência para reconstruir os haplótipos mais prováveis para cada genótipo da amostra. Assim como outros métodos de estimativa de frequências haplotípicas, o algoritmo do *Phase* usa as frequências dos homozigotos presentes na amostra. Entretanto, baseado na teoria da coalescência o programa também considera a semelhança ao nível de sequência de DNA de toda a amostra ao calcular as probabilidades dos haplótipos serem reais (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001). A aceitação dos pares de haplótipos reconstruídos para cada indivíduo foi baseada em valores de probabilidade superiores a 70%.

Anteriormente à reconstrução dos haplótipos foi verificada a possibilidade de eventos de recombinação na região do gene estudada, os quais poderiam vir a interferir na determinação dos haplótipos. Essa verificação foi feita através do programa *RPD4* (MARTIN et al., 2010). O algoritmo implementado neste software compara as sequências e avalia se as substituições são uniformemente distribuídas. A não uniformidade na distribuição das substituições é assumida como evidência de recombinação.

Determinou-se, por contagem direta, a frequência absoluta e depois calculou-se a frequência relativa dos haplótipos para cada densidade e cada classe demográfica. Assim como para as frequências alélicas, a diferença estatística para as frequências haplotípicas foi testada pelo teste F ($P \leq 0,05$).

3.6.2.2.5. Associação dos genótipos SNPs com as características fenotípicas

Testes de análise de variância (ANOVA) para a associação dos genótipos com as características de produção do camarão-da-amazônia foram ajustadas a partir do seguinte modelo misto, a partir do procedimento *Proc Mixed* do pacote SAS (SAS Institute Inc., 2000):

$$y_{ijkl} = \mu + D_i + GD_j + T_k + G_l + e_{ijkl} \quad \text{Eq. 05}$$

Em que y_{ijkl} é a característica mensurada de nth indivíduos; μ é a média global para a característica; D_i , GD_j e G_l são os efeitos fixos da densidade de estocagem i ($i = 1, 2$), dos grupos demográficos j ($j = 1, 2, \dots, 5$) e dos genótipos SNPs l ($l = 1, 2$ ou 3 correspondendo a e.g. G/G, G/A, ou A/A), respectivamente; T_k é o efeito aleatório da réplica k ($k = 1, 2, \dots, 10$); e e_{ijkl} é o erro residual de nth indivíduos.

As classes demográficas e os genótipos (homozigotos para o alelo variante) que foram pouco representados no estudo foram excluídos das análises estatísticas. Os efeitos estatísticos dos SNPs foram baseados na aceitação de $P \leq 0,05$.

3.6.2.2.6. Associação dos haplótipos SNPs com as características fenotípicas

Para as análises de associação entre as características e os haplótipos foi usado um modelo misto similar, também analisados através do *Proc Mixed* do SAS:

$$y_{ijkl} = \mu + D_i + GD_j + T_k + H_l + e_{ijkl} \quad \text{Eq. 06}$$

Em que H_l é o efeito fixo dos haplótipos l ($l = 1, 2, \dots, 12$). As demais variáveis estão descritas junto ao modelo anterior.

Os haplótipos que foram pouco representados no estudo foram excluídos da análise. O efeito estatístico dos haplótipos foi baseado na aceitação de $P \leq 0,05$.

3.6.3. Diversidade e Estruturação Genética de Populações de Camarão-da-Amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) Baseada em SNPs no Gene da HSC70

Para analisar a variabilidade intrapopulacional, primeiramente, utilizou-se o número de alelos (N_a), frequências alélicas e os valores da heterozigosidade esperada (H_e) e observada

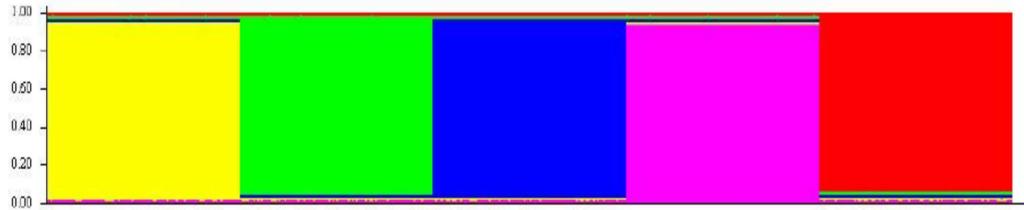
(H_0), todos calculados no programa *GenAlex* 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). As probabilidades para os eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrios de ligação entre os pares de locos SNPs foram obtidas através do programa *Genepop* (RAYMOND; ROUSSET, 1995). O teste de EHW para deficiência de heterozigotos foi calculado usando o algoritmo Cadeia de Markov de Monte Carlo (MCMC) e a correção sequencial de Bonferroni foi utilizada para corrigir os intervalos de significância. Os cálculos para os desequilíbrios de ligação entre os pares de SNPs foram baseados na estatística *log-likelihood ratio*, também usando o método da Cadeia de Markov. Além destes dois testes, os desvios puderam ser analisados pelo cálculo do índice de endocruzamento F_{IS} , juntamente com os valores de probabilidade para o excesso (p_L) e para o déficit de heterozigotos (p_S). O F_{IS} é a correlação de genes dentro de indivíduos dentro de populações (WRIGHT, 1951, 1965). Uma vez que, quando F_{IS} é negativo, existe um excesso de heterozigotos e quando é positivo existe uma deficiência de heterozigotos na população, essa estatística descreve a intensidade e o sinal do desvio ao equilíbrio. A hipótese nula (p_L e $p_S > 0,05$) nesse tipo de análise é a de que o loco analisado encontra-se em equilíbrio. O índice de endocruzamento e os valores p_L e p_S foram obtidos através do programa *FSTAT* 2.9.3 (GOUDET, 2001) e os valores p_L e p_S foram corrigidos conforme a correção sequencial de Bonferroni.

Em segundo, a variabilidade intrapopulacional foi analisada através da estimativa da frequência dos haplótipos, valores de diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) de cada população. A reconstrução dos haplótipos foi conduzida através do algoritmo *Phase* (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001) incluso no software *DnaSP* 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). A aceitação dos pares de haplótipos reconstruídos para cada indivíduo foi baseada em valores de probabilidade superiores a 70%. Anteriormente a este procedimento, foram realizados os testes de recombinação no programa *RPD4* (MARTIN et al., 2010). As frequências haplotípicas foram calculadas com o auxílio do programa *Arlequin* 2.1 (EXCOFFIER et al., 2005). Os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica foram obtidos pelo programa *DnaSP* 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Realizou-se o teste Z ($Z = \frac{\mu_1 - \mu_2}{SE}$, em que: SE representa a erro padrão; e $Z \geq 1,96$ é significativo ao nível de 5%) para determinar a significância das diferenças dos valores de diversidade (haplotípica e nucleotídica) entre as duas populações.

Para a análise de estrutura populacional, calculou-se o índice de fixação de Wright (F_{ST}) no *Arlequin 2.1* (EXCOFFIER et al., 2005). Este índice verifica a diferenciação genética entre as populações definidas a priori. O F_{ST} é definido como a correlação entre gametas tirados ao acaso da mesma subpopulação em relação ao total (WRIGHT, 1951, 1965). Um alto valor de F_{ST} indica que há baixa variação genética em uma população local em relação à população total, enquanto que valores pequenos indicam muita variação local em relação ao total (TEMPLETON, 2011). Nas análises a seguir, a magnitude de fixação genética entre as duas populações foi determinada segundo a definição de Wright (1978), que caracteriza como baixa a diferenciação com valores de F_{ST} entre 0 e 0,05, moderada o F_{ST} entre 0,05 e 0,15, alta com F_{ST} entre 0,15 e 0,25 e muito alta com $F_{ST} > 0,25$. Ainda para verificar a estruturação populacional, realizou-se a Análise de Variância Molecular (AMOVA) no *Arlequin 2.1* (EXCOFFIER et al., 2005). Esta análise permite verificar a partição da variância entre e dentro das populações.

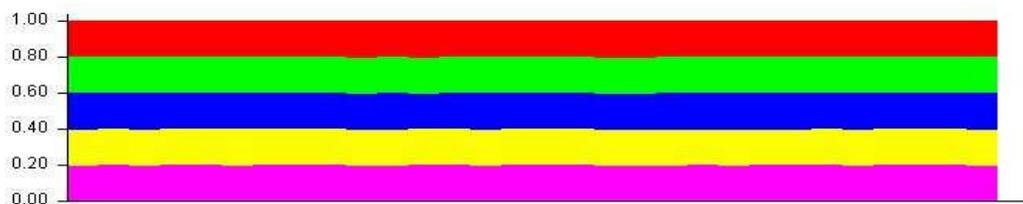
E por fim, efetuou-se uma análise de agrupamento bayesiana no software *Structure 2.3* (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) para inferir, sem informação a priori, o número mais provável de subpopulações. Este programa utiliza o método bayesiano de agrupamento, juntamente com o algoritmo MCMC. A análise para a inferência do número de populações tem como premissas o equilíbrio de Hardy-Weinberg e a ausência de desequilíbrio de ligação dentro das populações. Testes de atribuição são realizados, para que cada indivíduo seja alocado em diferentes grupos independentemente. A partir destes testes, o número de populações (K) é definido de forma que os desequilíbrios de HWE e de ligação sejam mínimos. Após as análises, o programa nos fornece gráficos de barra que variam entre dois extremos: a representação de uma população estruturada (Figura 10) e de uma população não estruturada (Figura 11). Os gráficos são interpretados da seguinte forma: cada cor representa uma população e finas barras verticais representam os indivíduos. Em uma população estruturada, os indivíduos têm uma probabilidade elevada de pertencer a apenas uma das populações, enquanto que em uma população não estruturada, os indivíduos possuem probabilidades semelhantes de pertencer a qualquer uma dessas populações.

Figura 10 - Exemplo de um teste de atribuição, obtido pelo *Structure*, representando uma população estruturada, com K=5.



Os indivíduos são representados por barras verticais e as populações por cores distintas.

Figura 11 - Exemplo de um teste de atribuição, obtido pelo *Structure*, representando uma população não estruturada, com K = 5.



Cada indivíduo, representado por uma barra vertical, possui a mesma probabilidade de pertencer a qualquer uma das populações, representadas pelas cores distintas.

O número de populações (K) foi estimado pelo modelo *admixture*, o qual é apropriado para populações que apresentaram ou ainda apresentam fluxo gênico em taxas suficientes para que os indivíduos possam ter ancestrais de mais de uma população. E, simultaneamente, o modelo de alelos correlacionados, que pressupõe que as populações divergiram de um ancestral comum e que as diferenças em suas frequências alélicas são o resultado de deriva que ocorreu desde sua divergência (MARTIEN et al., 2007). Foram realizadas seis corridas independentes de 1.000.000 gerações de MCMC e 100.000 gerações de *burnin*, variando K de 1 a 5. O número real de populações foi escolhido pelo valor de K que maximiza a probabilidade de os dados pertencerem ao número estimado de populações, que, de acordo com Pritchard, Stephens e Donnelly (2000), equivale ao maior valor de $\ln(P(X|K))$ (probabilidade de observar os dados (X) condicionada ao número de populações (K)).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PROSPECÇÃO DE SNPs NO GENE DA HSC70 DO CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA (*Macrobrachium amazonicum*)

4.1. Prospecção de SNPs no Gene da HSC70 do Camarão-da-Amazônia (*Macrobrachium amazonicum*)

4.1.1. Descrição do Fragmento do Gene da HSC70

O DNA extraído do tecido muscular do camarão-da-amazônia apresentou razão entre as absorbâncias de 260nm e 280nm variando de 1,6 a 2,3. Estes valores estão próximos aos recomendados por Ferreira e Grattapaglia (1998) e indicam que não houve excesso de proteína que pudesse interferir a amplificação e sequenciamento das amostras.

Conforme a análise em gel de agarose, o DNA apresentou-se integro, não havendo degradação do mesmo na maioria das amostras.

Dois pares de oligonucleotídeos desenhados especificamente para amplificar regiões (HSC70-1, HSC70-2) da forma constitutiva do gene da proteína do estresse térmico de 70 KDa no *M. rosenbergii* foram eficientes na amplificação de dois fragmentos correspondentes do referido gene no *M. amazonicum*. A amplificação com estes pares de primers não resultou em bandas espúrias.

A utilização de ferramentas de bioinformática para o delineamento de *primers* e verificação da qualidade dos mesmos é de grande valia para pesquisas em biologia molecular, sendo o passo chave para a amplificação satisfatória durante a PCR. Este é um procedimento relativamente simples, levando um pouco mais de tempo somente na etapa de buscas de sequências-referência no banco de dados de interesse.

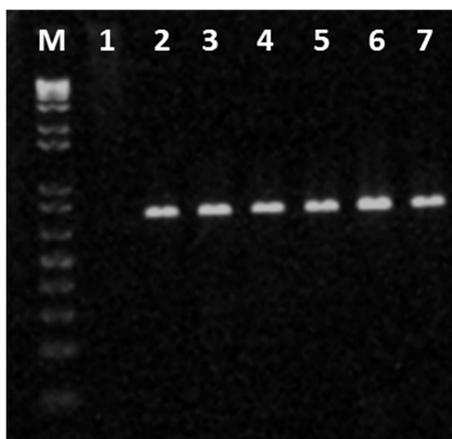
A disponibilidade de excelentes programas gratuitos na internet, torna o trabalho de construção de *primers* mais fácil e com resultados consistentes, fazendo com que seu uso possa ser implementado de maneira rápida, economizando tempo e recursos.

De posse destas ferramentas de bioinformática, no presente trabalho, teve-se o cuidado de evitar a formação espontânea de estruturas secundárias nos *primers*, produzidas por interações intermoleculares (*self-dimer*) ou intramoleculares (*hairpin*). Estas estruturas podem afetar a temperatura de anelamento e conseqüentemente a amplificação, reduzindo a

disponibilidade de *primers* para a reação. Desse modo, destaca-se que a escolha adequada de *primers* é um fator que influencia diretamente a qualidade da PCR e prejuízos consideráveis ocorrem quando são empregados indevidamente, acarretando resultados inespecíficos, perda de reagentes químicos e horas de trabalho desperdiçadas (RYCHLIK, 1993).

A amplificação com os dois pares de *primers* foi positiva nas 48 amostras usadas para descrever parte do gene da HSC70 no camarão-da-amazônia. Conforme esperado, baseando-se no posicionamento dos *primers* na sequência-referência deste estudo, os *amplicons* obtidos com os pares de *primers* HSC70-P1 e HSC70-P2 foram de aproximadamente 600 pb (Figura 12).

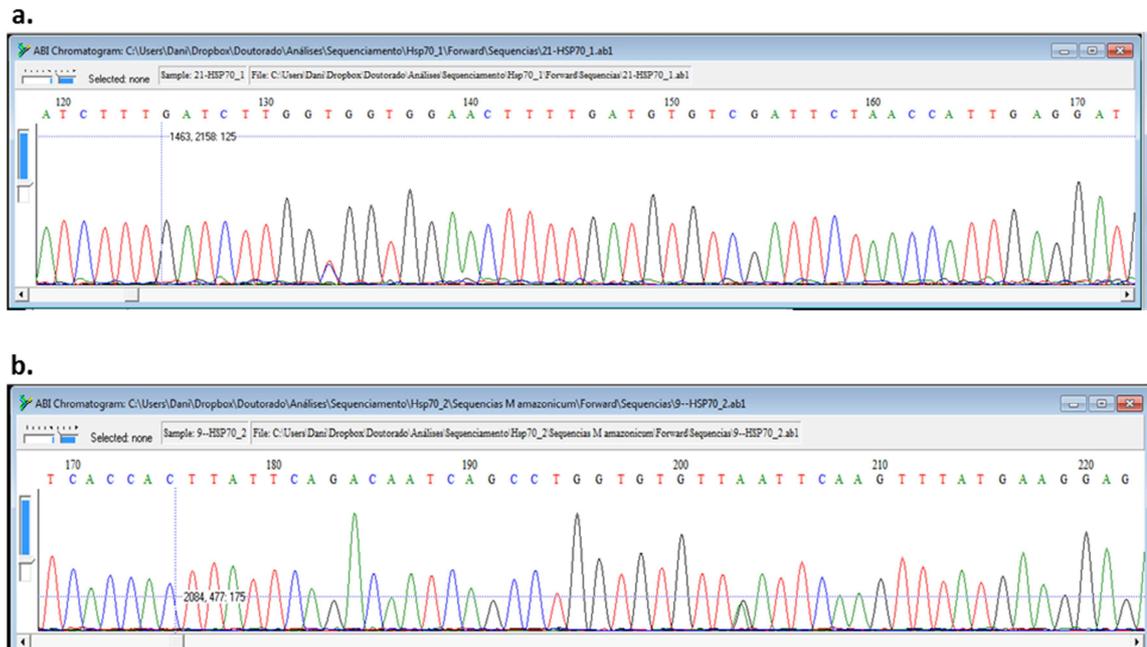
Figura 12 - Gel de agarose a 1,5% corado em GelRed, contendo os fragmentos do gene da HSC70 em *M. amazonicum*.



As canaletas 2 a 4 representam a amplificação do fragmento HSC70-1; canaletas 5 a 7 representam a amplificação do fragmento HSC70-2; M representa o padrão de peso molecular de 1 Kb Plus – Invitrogen; e 1 representa um dos controles negativos (primer HSC70-P1). As incongruências referentes ao tamanho de fragmento se devem à interferência que o GelRed exerce na corrida eletroforética (diferença de aproximadamente 100 pb).

Ambos os fragmentos foram sequenciados e editados, originando um fragmento consenso de 1128 pb. Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento direto dos produtos de PCR dos *primers* HSC70-P1 e HSC70-P2, podem ser observados na Figura 13 (a) e 13 (b), respectivamente.

Figura 13 - Eletroferogramas parciais referentes ao sequenciamento de fragmentos do gene HSC70 em *M. amazonicum*.



(a) Trecho da sequência destacando a posição entre 120 e 170 pb do fragmento amplificado com o primer HSC70-P1; e (b) trecho da sequência destacando a posição entre 170 e 222 pb do fragmento amplificado com o primer HSC70-P2.

Com base na qualidade das sequências mostradas na Figura 13, pode-se afirmar que não há dúvidas com relação às sequências obtidas, uma vez que os eletroferogramas se apresentam sem “ruídos”, os quais poderiam causar confusão no momento da leitura. Além disso, para evitar que o fragmento fosse descrito erroneamente, fez-se réplicas de sequenciamento das fitas senso e antissenso.

Como a HSC70 faz parte de uma família de proteína altamente conservada entre as espécies, era esperado que o gene fosse identificado através do processo de amplificação cruzada. WU et al. (2005) utilizaram com sucesso a mesma estratégia que o presente estudo para a obtenção da sequência do gene completo da HSP70 em *L. vannamei*. Os autores utilizaram a sequência da HSP70 do *P. monodon* (disponível no *GenBank*) e delinearão pares de *primers* que amplificassem um *amplicon* de tamanho esperado de 1983 pb no *L. vannamei*. A amplificação cruzada utilizando *primers* para o gene HSP70 de galinhas domésticas (*Gallus gallus*) também foi satisfatória em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) (GAVIOL et al., 2008).

Devido ao tamanho dos fragmentos amplificados no camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*) ser correspondente aos fragmentos que se esperaria amplificar no camarão da Malásia (*M. rosenbergii*) (conforme sequência depositada no *GenBank*), permite-se sugerir ainda que, o fragmento estudado do gene da HSC70 do *M. amazonicum* seja constituído somente por éxons. Esta sugestão diverge de literaturas clássicas sobre o assunto, onde se cita que na família das HSP70s, os íntrons são encontrados nos genes expressos constitutivamente, mas não são encontrados na forma induzível (YOST; LINDQUIST, 1986). A falta de íntrons em HSP70s induzíveis é plausível, pois permite a transcrição rápida e acúmulo de estresse (HUANG; WIMLER; CARMICHAEL, 1999), uma vez que o *splicing* do RNA é desnecessário. Em contrapartida, não se sabe o significado evolutivo para esta ausência de íntrons na forma constitutiva deste gene, fato este que foi relatado pela primeira vez no trabalho de Liu et al. (2004), com a espécie-referência deste estudo, o *M. rosenbergii*.

A identidade do fragmento gênico estudado neste trabalho foi primeiramente checada através do alinhamento pelo procedimento *Nucleotide BLAST*. Uma alta similaridade genética foi verificada entre a sequência consenso da HSC70 do camarão-da-amazônia e a sequência-referência da HSC70 do camarão-gigante (97%) e com o camarão oriental, *M. nipponense* (89%).

Como pode ser observado nas Figuras 14 e 15, 100% da sequência “questionada” (HSC70 do camarão-da-amazônia) foi alinhada tanto com a sequência-referência quanto com a sequência do camarão oriental (*M. nipponense*), disponíveis no *GenBank*. O *E-value* destes alinhamentos foi zero. Este valor de *E-value* nos indica que não há probabilidade de cada um dos alinhamentos ter ocorrido ao acaso.

Este alinhamento BLAST realizado aumenta a consistência das informações de que se trata realmente de parte do gene HSC70 do camarão-da-amazônia. Além disso, observando a saída dos resultados do BLAST (Figura 15), é importante chamar a atenção para o fato de que não foi encontrada nenhuma sequência de HSP70 para espécies de camarões nativos do Brasil, o que demonstra a necessidade de estudos moleculares para o melhor detalhamento do potencial genético e conhecimento de nossas espécies.

Figura 14 - Resultado da análise de BLAST mostrando alta similaridade da região sequenciada neste trabalho com outras sequências do banco de dados *GenBank*.

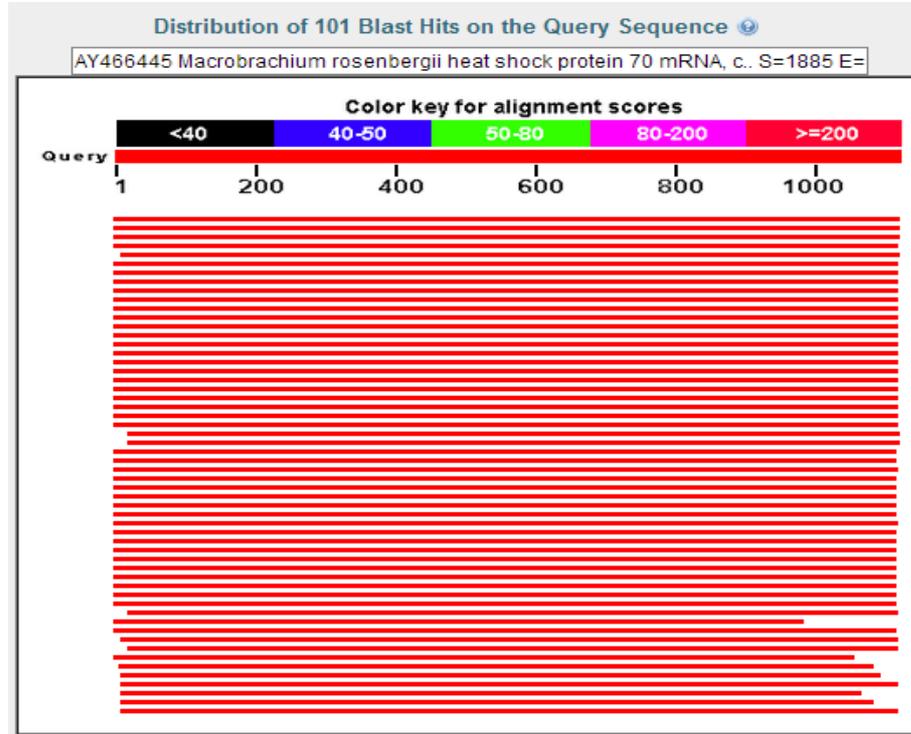


Figura 15 - Resultado da análise de BLAST mostrando valores de identidade e acurácia do alinhamento realizado com outras sequencias do *GenBank*.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Macrobrachium rosenbergii heat shock protein 70 mRNA, complete cds	1885	1885	100%	0.0	97%	AY466445.1
<input type="checkbox"/> Macrobrachium nipponense heat shock coonate 70 (hsc70) mRNA, complete cds	1494	1494	100%	0.0	89%	DQ680140.1
<input type="checkbox"/> Palaeomonetes varians 70 kDa heat shock protein form 2 mRNA, partial cds	1113	1113	99%	0.0	82%	FJ875279.1
<input type="checkbox"/> Rimicaris exoculata 70 kDa heat shock protein form 3 mRNA, complete cds	1068	1068	99%	0.0	81%	FJ356149.1
<input type="checkbox"/> Portunus sanquinolentus hsp70 gene for heat shock protein 70 kDa	1043	1043	99%	0.0	81%	AM410077.1
<input type="checkbox"/> Mirecaris fortunata 70 kD heat shock protein mRNA, complete cds	1032	1032	99%	0.0	80%	DQ534064.1
<input type="checkbox"/> Scylla paramamosain isolate S6 heat shock protein 70 (hsp70) gene, complete cds	1031	1031	99%	0.0	80%	JX913782.1
<input type="checkbox"/> Portunus trituberculatus isolate N2 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	1031	1031	99%	0.0	80%	GQ385970.1
<input type="checkbox"/> Portunus trituberculatus isolate N1 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	1031	1031	99%	0.0	80%	GQ385969.1
<input type="checkbox"/> Scylla paramamosain isolate S5 heat shock protein 70 (hsp70) gene, complete cds	1025	1025	99%	0.0	80%	JX913781.1
<input type="checkbox"/> Scylla paramamosain isolate S4 heat shock protein 70 (hsp70) gene, complete cds	1025	1025	99%	0.0	80%	JX913780.1
<input type="checkbox"/> Scylla paramamosain isolate S3 heat shock protein 70 (hsp70) gene, complete cds	1025	1025	99%	0.0	80%	JX913779.1
<input type="checkbox"/> Scylla paramamosain isolate S2 heat shock protein 70 (hsp70) gene, complete cds	1025	1025	99%	0.0	80%	JX913778.1
<input type="checkbox"/> Scylla paramamosain isolate S1 heat shock protein 70 (hsp70) gene, complete cds	1025	1025	99%	0.0	80%	JX913777.1
<input type="checkbox"/> Scylla paramamosain heat shock protein 70 (hsp70) gene, complete cds	1025	1025	99%	0.0	80%	JX913776.1
<input type="checkbox"/> Portunus trituberculatus isolate K2 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	1025	1025	99%	0.0	80%	GQ385972.1
<input type="checkbox"/> Portunus trituberculatus heat shock protein 70 mRNA, complete cds	1025	1025	99%	0.0	80%	FJ527835.1
<input type="checkbox"/> Scylla paramamosain heat shock protein 70 (HSP70) mRNA, complete cds	1025	1025	99%	0.0	80%	EU754021.1
<input type="checkbox"/> Portunus trituberculatus isolate K1 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	1021	1021	99%	0.0	80%	GQ385971.1
<input type="checkbox"/> Homarus americanus heat shock protein 70 mRNA, complete cds	1021	1021	99%	0.0	80%	DQ173923.1
<input type="checkbox"/> Callinectes sapidus heat shock protein 70 (hsc70) mRNA, complete cds	1016	1016	99%	0.0	80%	DQ663760.1

Nota-se os valores *E-value* e Máxima Identidade de cada alinhamento e o número de acesso no canto direito de cada sequência similar encontrada na busca.

Das mutações de ponto observadas, as transições se apresentam em maior número, sendo responsáveis por 73,3% das alterações interespecíficas (26,7% de transversões) ao compararmos o *M. amazonicum* com o *M. rosenbergii*. Na Figura 16 pode ser observado o alinhamento das sequências nucleotídicas do fragmento da HSC70 das três espécies de *Macrobrachium*.

O alinhamento entre as sequências de aminoácidos revelou que a maioria das alterações pontuais é sinônima, fazendo com que poucas diferenças na sequência da HSC70 fossem encontradas entre as espécies. Neste sentido, tomando a sequência do *M. rosenbergii* como referência, encontrou-se a alteração de apenas dois aminoácidos ao compará-la com as demais espécies (uma troca de treonina (T) para isoleucina (I) no códon 104 e uma troca de cisteína (C) para tirosina (Y) no códon 184). No *M. nipponense* observou-se uma troca de uma isoleucina (I) para valina (V) no códon 95 e de uma valina (V) para uma isoleucina (I) no códon 110. O alinhamento das sequências de aminoácidos da HSC70 para as três espécies do gênero *Macrobrachium* pode ser conferido na Figura 17.

Como era de se esperar, a maioria das substituições de base que ocorre no camarão-da-amazônia em relação às demais espécies do gênero *Macrobrachium* é sinônima. Devido à redundância do código genético, nem todas as alterações de pares de base acarretarão alterações dos aminoácidos da proteína, principalmente quando ocorrem na terceira base do *codon* (ALBERTS et al., 2002).

Dentre as mutações não sinônimas, nenhuma gerou *stop codons* prematuros, o que poderia resultar em uma proteína anormalmente encurtada. Isso muitas vezes causa uma perda de função da proteína, uma vez que partes críticas da cadeia de aminoácidos deixam de ser traduzidas.

A sequência de aminoácidos correspondente ao fragmento gênico amplificado neste estudo contém 375 resíduos de aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 42 kDa. Duas assinaturas altamente conservadas foram identificadas na sequência de aminoácidos (Figura 17): IFDLGGGTFDVSIL, nos resíduos 10 a 23 (assinatura 2) e IVLVGGSTRIPKIQK, nos resíduos 147 a 161 (assinatura 3). Conforme Shonhai; Boshoff; Blatch (2005) são estas regiões

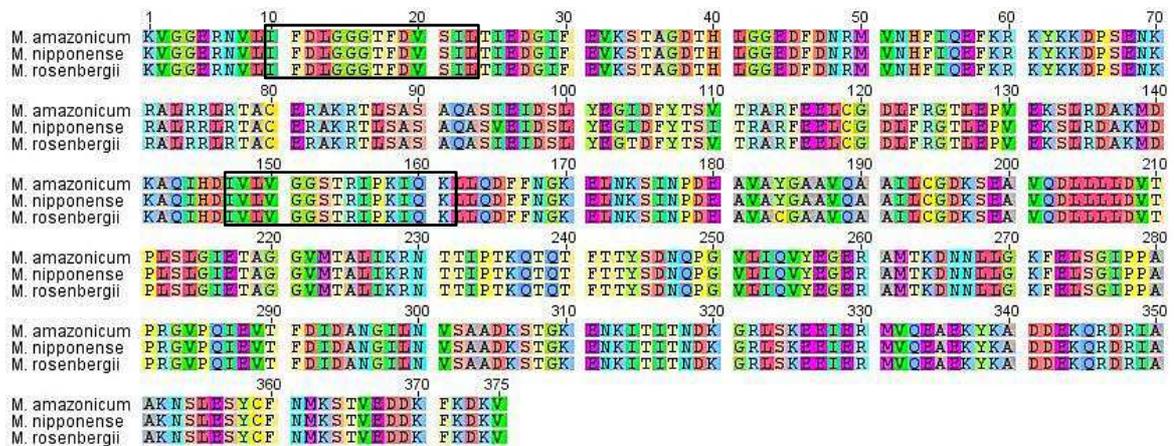
de assinatura que asseguram a função das HSP70s na sua estrutura tridimensional. O sinal de localização nuclear não foi encontrado a partir do uso ferramentas de bioinformática.

Figura 16 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos de um fragmento do gene da HSC70 de três espécies de *Macrobrachium*.



Os pontos simbolizam a correspondência de nucleotídeos entre as espécies e as letras representam a base nitrogenada originada na mutação pontual (A: adenina; T: timina; C: citosina; e G: guanina).

Figura 17 - Alinhamento das sequências de aminoácidos de uma parte da proteína HSC70 de três espécies de *Macrobrachium*.



Trocas de aminoácidos podem ser verificadas nas posições dos códons 104, 110, 184, 360 e 361. Os boxes abertos abrangendo os resíduos 10-23 e 147-161 correspondem as assinaturas 2 e 3, respectivamente

Como não foi sequenciado o gene completo da HSC70, não foi possível concluir se este segmento proteico corresponde de fato de uma HSP70 citosólica. HSP70s citosólicas são identificadas na sequência conservada próximo à extremidade C-terminal contendo o *motif* EEVD. Esta sequência *motif* pode facilitar a ligação da HSP70 com co-chaperonas, como a HOP (HSP70-HSP90 *Organizing Protein*) (JOHNSON et al., 1998). Segundo Ramya; Surolia; Rurolia (2006) este *motif* provavelmente desempenha um papel importante na atividade de ligação dos peptídeos.

Uma árvore de relações genéticas foi construída para verificar a possibilidade de se estar inferindo erroneamente a identidade da sequência obtida no presente estudo (Figura 18). Desse modo, analisaram-se sequências de aminoácidos de HSP70 e HSC70 em espécies de camarões marinhos, camarões de água-doce, lagostin e caranguejo, conforme números de acesso no *GenBank* disponíveis no Quadro 2.

Houve a formação de dois clados agrupando cada um dos membros da família das HSP70s. Esse agrupamento corrobora as informações previamente obtidas na análise BLAST, e por fim reduz as possibilidades de que a sequência que se está trabalhando possa ser do gene da forma induzível da HSP70 e não da forma constitutiva. A proximidade entre os membros da HSP70 reitera a natureza altamente conservativa desta família multigênica.

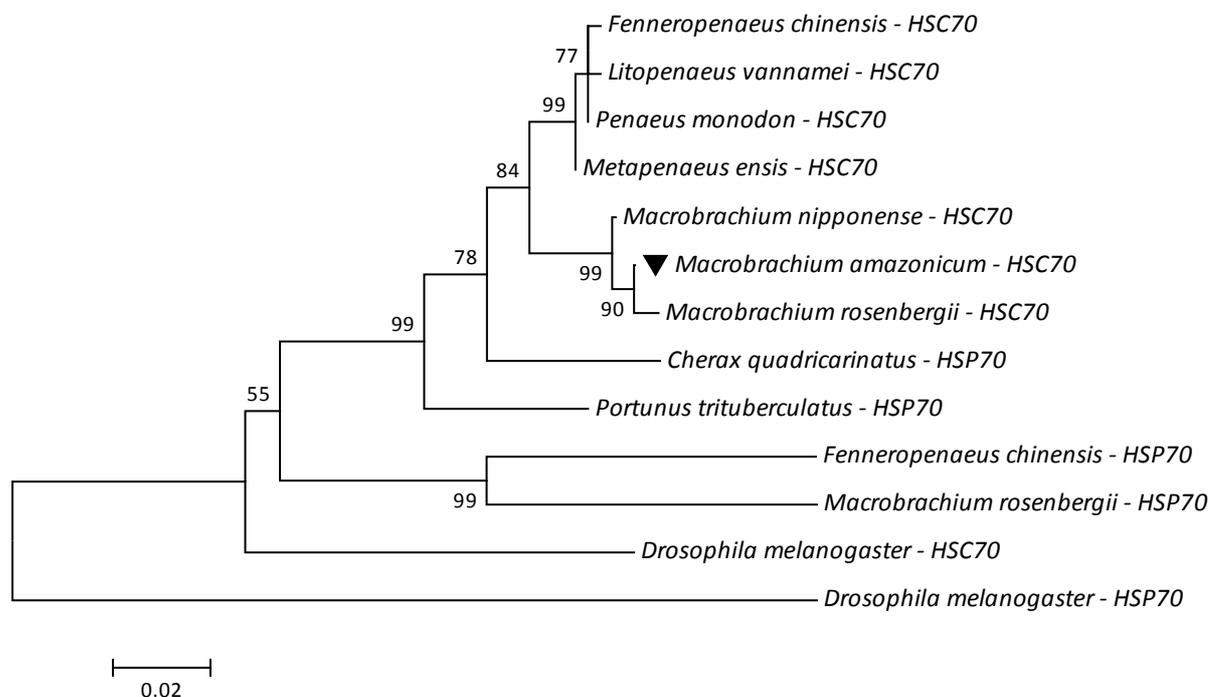
A presença/ausência de íntrons poderia ser sugerida para distinguir as formas da HSP70 e HSC70. Porém, as exceções como a existência de HSP70 com íntron (KAPOOR; CURLE;

RUNHAM, 1995; QIN et al., 2003; SNUTCH; HESCHL; BAILLIE, 1988; STEPHANI; GOMES, 1995) e HSC70 sem íntrons como no *M. rosenbergii* (LIU et al. 2004) inviabilizam esta diferenciação por simples dedução das sequências dos genes, fazendo-se necessário outras abordagens.

Assim como em nosso estudo, outros trabalhos (FANG et al., 2012; LO et al., 2004; LUAN et al., 2010; RAVAUX et al., 2007) utilizaram satisfatoriamente a mesma abordagem de relações genéticas para concluir a identidade de membros da família HSP70. Entretanto, o melhor critério para esta distinção seriam os estudos de expressão gênica.

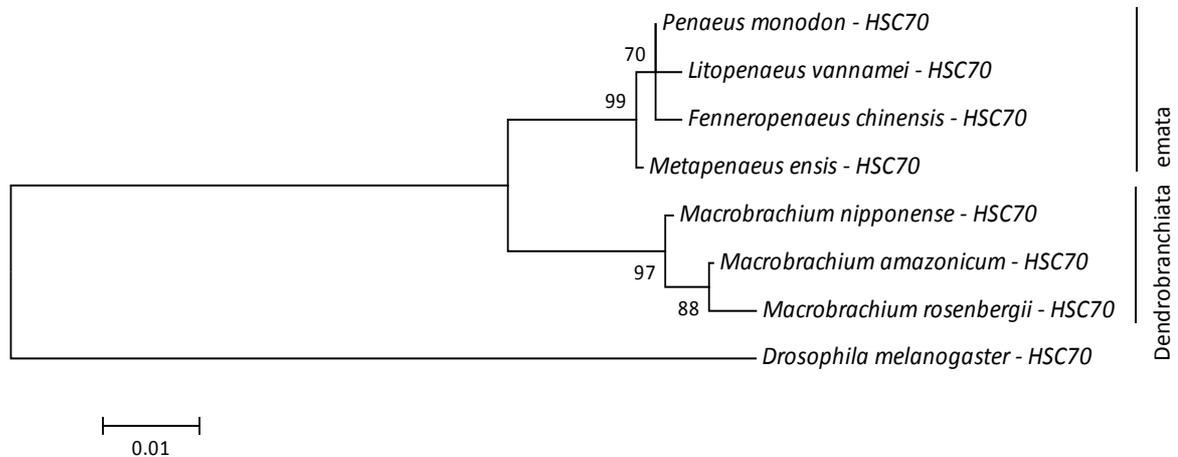
Ainda com relação à reconstrução das árvores de distância, nota-se claramente a separação das sequências de HSC70 de espécies de camarões marinhos (subordem Dendrobranchiata) e de água-doce (subordem Pleocyemata). Desse modo, a árvore foi reconstruída enfatizando somente as sequências aminoacídicas da HSC70 das espécies de camarões e permitindo a melhor visualização destes dois agrupamentos. Este dendrograma pode ser visualizado na Figura 19.

Figura 18 - Árvore de distância das sequências de aminoácidos de HSP70 e HSC70 de algumas espécies de crustáceos.



Os números indicam a frequência em porcentagem na qual a topologia do dendrograma foi representativa para 1000 réplicas de *bootstrap*.

Figura 19 - Árvore de distância das sequências de aminoácidos da HSC70 de camarões marinhos e de camarões de água-doce.



Os números indicam a frequência em percentagem na qual a topologia do dendrograma foi representativa para 1000 réplicas de *bootstrap*.

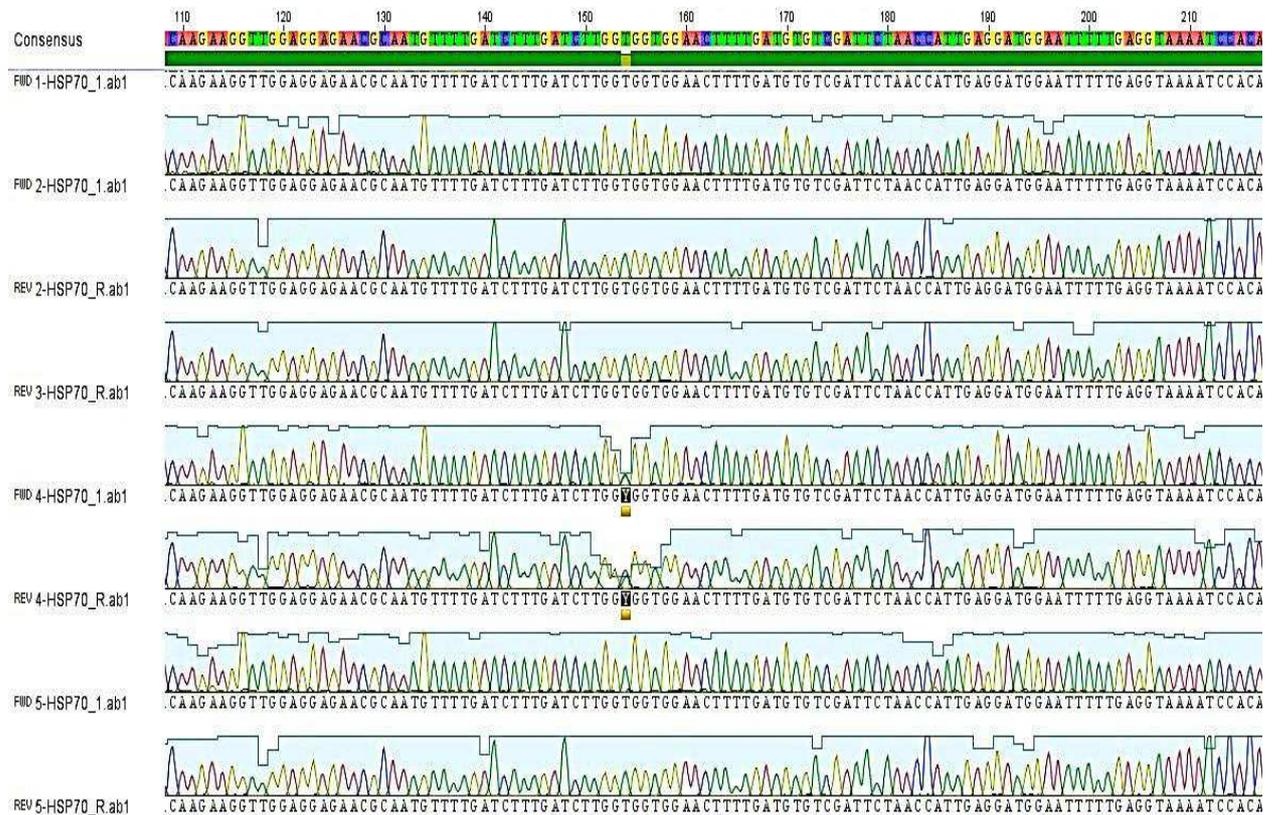
Cui et al. (2010) caracterizaram o gene da HSP70 na espécie de caranguejo *P. trituberculatus* e em sua análise filogenética também verificaram que o *M. rosenbergii* se apresenta em clado diferente das espécies marinhas *L. vannamei*, *P. monodon*, *M. japonicus*, *M. ensis* e *F. chinensis*. Esta clusterização em clados diferentes concorda totalmente com os táxons tradicionais (no caso, subordem). E, assim como Cui et al. (2010), reafirma-se os membros da família da HSP70 como uma ferramenta útil para a evolução e análise filogenética. Contudo, deve-se chamar atenção ao fato de que, a princípio, estudos neste sentido parecem ser aplicáveis somente na separação em níveis taxonômicos acima de subordem, uma vez que se trata de sequências altamente conservadas ao longo da evolução dos organismos.

4.1.2. Prospecção de SNPs em um Fragmento do Gene da HSC70

A identificação de SNPs em parte da região codificante da HSC70 do camarão-da-amazônia foi realizada através do sequenciamento direto dos produtos de PCR. O método consiste no alinhamento dos eletroferogramas obtidos deste sequenciamento, seguido por inspeção visual buscando picos de fluorescência sobrepostos em uma determinada posição da sequência, representando os heterozigotos. Os eletroferogramas gerados demonstraram qualidade adequada para utilização na prospecção de SNPs (Figura 20).

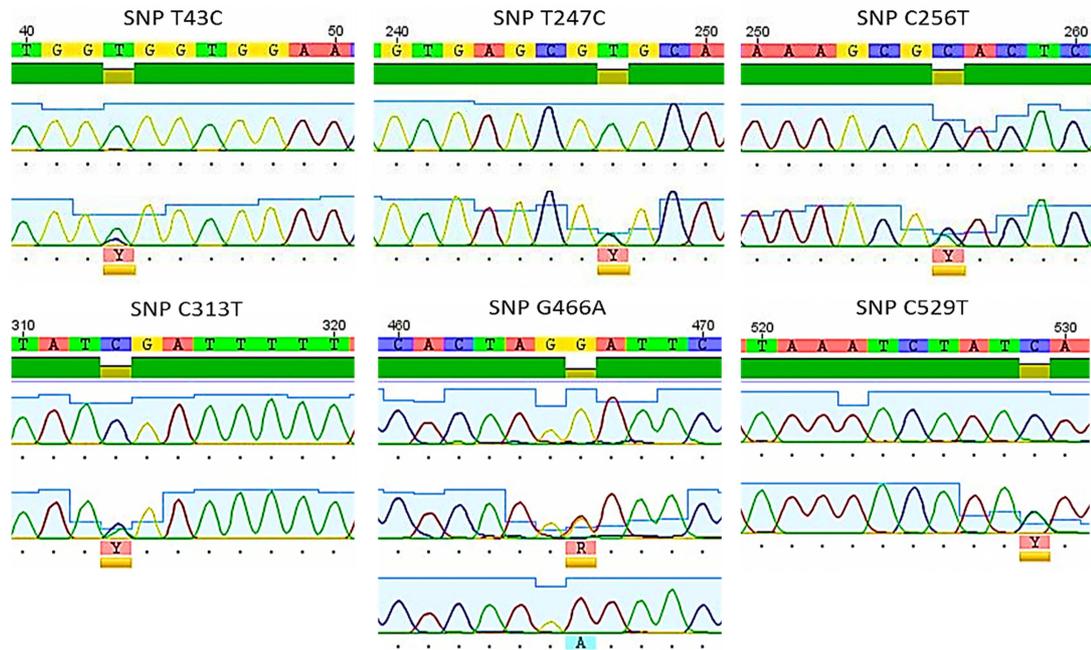
No total, foram analisados 1128 sítios nucleotídicos de uma população experimental de camarão-da-amazônia (CAUNESP – Jaboticabal-SP). Nas sequências foram caracterizados 13 SNPs (Tabela 1). Doze destes sítios variáveis são parcimoniosamente informativos, pois o polimorfismo ocorre mais de uma vez na população. Somente o SNP T997C ocorreu uma vez na população. Todos os polimorfismos validados são bialélicos e encontram-se sem desvios do EHW. Além disso, estes SNPs deverão ser depositados no banco de dados de SNPs do *National Center for Biotechnology Information* (dbSNP-NCBI). Nas Figuras 21 e 22 dispõe-se parte dos eletroferogramas contendo os genótipos referentes a cada um dos SNPs identificados.

Figura 20 - Eletroferogramas parciais referentes ao sequenciamento de fragmentos do gene HSC70 em *M. amazonicum*.



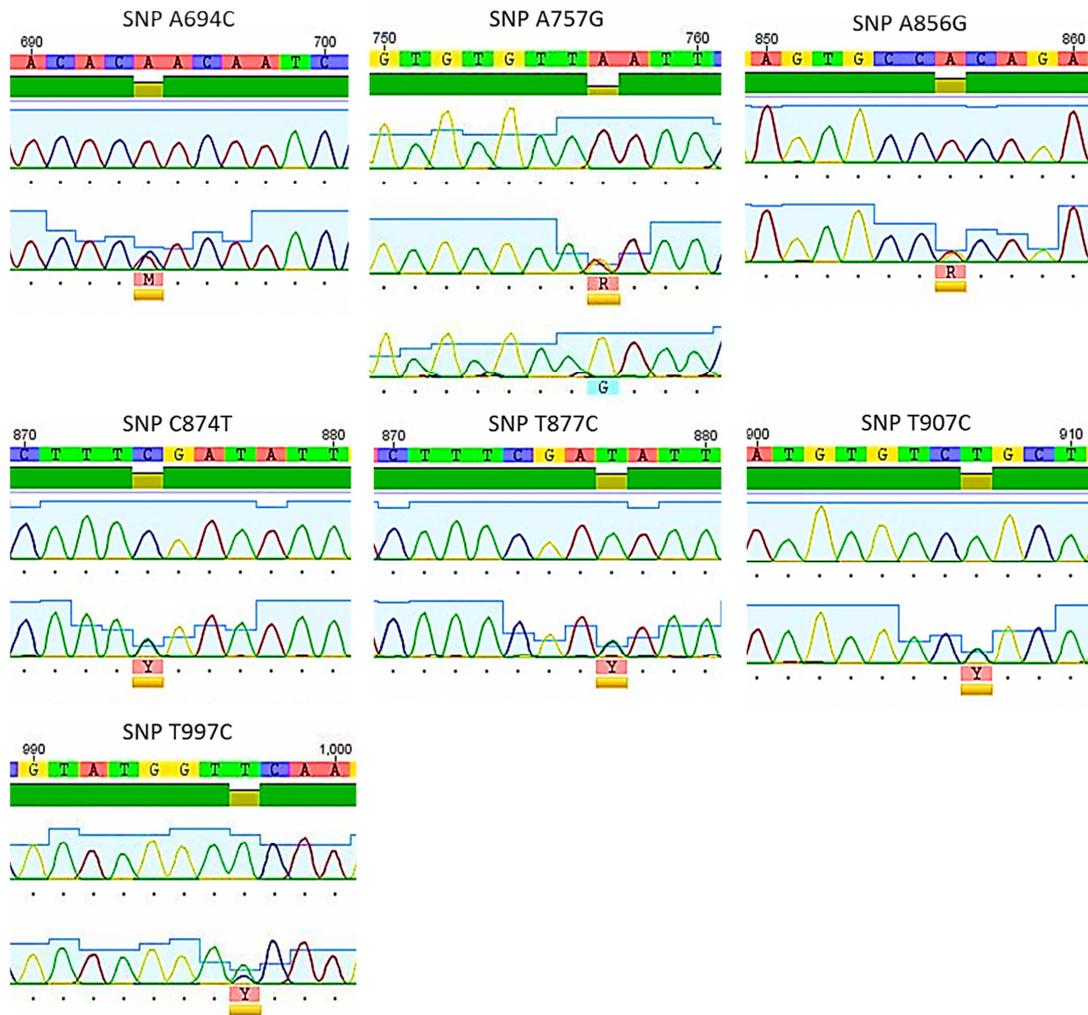
A região destacadas em azul claro, com variações de amplitudes, representa a qualidade dos eletroferogramas.

Figura 21 - Eletroferogramas parciais demonstrando os genótipos dos SNPs identificados no fragmento HSC70-1 do gene da HSC70 em uma população experimental de *M. amazonicum*.



Os SNPs T43C, T247C, C256T, C313T e C529T estão representados somente pelo genótipo homocigoto para a variante alélica mais comum (primeira linha de eletroferograma de cada SNP) e pelo genótipo heterocigoto, onde observa-se a sobreposição de picos e a codificação com a base degenerada (segunda linha de eletroferograma de cada SNP). Somente o SNP G466A está representado pelos três genótipos possíveis.

Figura 22 - Eletroferogramas parciais demonstrando os genótipos dos SNPs identificados no fragmento HSC70-2 do gene da HSC70 em uma população experimental de *M. amazonicum*.



Os SNPs A694C, A856G, C874T, T877C, T907C e T997C estão representados somente pelo genótipo homocigoto para a variante alélica mais comum (primeira linha de eletroferograma de cada SNP) e pelo genótipo heterocigoto, onde observa-se a sobreposição de picos e a codificação com a base degenerada (segunda linha de eletroferograma de cada SNP). Somente o SNP A757G está representado pelos três genótipos possíveis.

Tabela 1 - Descrição dos SNPs identificados em uma população de *M. amazonicum*, suas variantes alélicas, frequência dos alelos e valores de probabilidade para teste de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

SNP	Alelo	Frequência alélica	EHW ¹
T43C	T	0,875	1,000
	C	0,125	
T247C	T	0,844	0,577
	C	0,156	
C256T	C	0,948	1,000
	T	0,052	
C313T	C	0,938	1,000
	T	0,063	
G466A	G	0,802	0,664
	A	0,198	
C529T	C	0,979	1,000
	T	0,021	
A694C	A	0,862	0,575
	C	0,138	
A757G	A	0,787	1,000
	G	0,213	
A856G	A	0,904	1,000
	G	0,096	
C874T	C	0,979	1,000
	T	0,021	
T877C	T	0,936	1,000
	C	0,064	
T907C	T	0,979	1,000
	C	0,021	
T997C	T	0,989	s.i. ²
	C	0,011	

EHW: desvios de equilíbrio de Hardy-Weinberg ($0,00384 < \alpha < 0,05$), após a correção sequencial de Bonferroni.
s.i.: sem informação, provavelmente pela baixa frequência do alelo C.

A metodologia de detecção de SNPs por sequenciamento direto foi utilizada com sucesso em genes da família das HSPs de espécies de crustáceos (CUI et al., 2010; UNAL; BUCKLIN, 2010; ZENG et al., 2008;), peixes (KANG et al., 2011; WEI et al., 2010), suínos (HUANG et al., 2002), aves (GAVIOL et al., 2008; NAGAHORI et al., 2010) e bovinos (ROSENKRANS JR et al., 2010). Contudo, deve ser ressaltado que este método é viável para detecção de SNPs em pequena escala (VIGNAL et al., 2002), como é o caso do presente estudo e dos estudos supracitados.

A validação dos SNPs caracterizados neste trabalho está de acordo com Brookes (1999) e Vignal et al. (2002), pois os alelos polimórficos ocorrem em pelo menos 1% da população testada (com frequência variando de 1,1 a 21,3%). Quanto à consideração dos SNPs, é importante ressaltar ainda que os picos sobrepostos, nos quais os SNPs foram indicados, foram verificados quanto ao padrão de qualidade no sequenciamento das fitas senso (*forward*) e antissenso (*reverse*) para evitar a prospecção incorreta do polimorfismo, que pode ocorrer devido a artefatos de sequenciamento.

No fragmento da sequência do gene da HSC70 (1128 pb) a frequência de ocorrência de SNPs encontrada foi em média um a cada 87 pb. Esta ocorrência de SNPs encontrada no presente estudo é maior do que os relatos de outros trabalhos que caracterizaram SNPs em genes de membros da família de HSP70s. Zeng et al. (2008) encontraram uma média de um SNP a cada 224 pb no gene da HSP70 de *L. vannamei*. Wei et al. (2012) e Cui et al., (2010) também estudaram o gene da HSP70 induzível na corvina *Miichthys miiuy* e em *P. trituberculatus*, respectivamente. Em ambos os estudos, a média de distribuição foi de aproximadamente um a cada 480 pb. Dois estudos com o gene da HSP70, um em copépodos (UNAL; BUCKLIN, 2010) e outro em pepinos-do-mar (KANG et al., 2011) verificaram uma maior ocorrência de polimorfismos ao longo deste gene: um SNP a cada 65 pb e a cada 40 pb, respectivamente.

WEI et al. (2012) discutem que o baixo conteúdo polimórfico do gene encontrado em seu estudo está relacionado à natureza conservativa dos membros da família da HSP70. Porém, no presente trabalho, consideramos que o conteúdo polimórfico em um fragmento do gene da HSC70 em *M. amazonicum* foi alto em se tratando de uma região codificadora de um gene altamente conservado ao longo da evolução das espécies.

Conforme foi descrito acima, observa-se que a distribuição de SNPs é bastante variável entre as espécies. Outros exemplos de distribuição de SNPs que denotam a abundância variável desses polimorfismos em espécies de camarões envolvendo outros genes são encontrados: nos genes *AMY2* (α -amilase) e *CTSL* (catepsina) em *L. vannamei* (GLENN et al., 2005) – um SNP a cada 135 pb e a cada 775 pb, respectivamente para estes dois genes; a partir da prospecção de SNPs a partir de EST (*Expressed Sequence Tag*) de *L. vannamei* (CIOBANU et al., 2010) – um SNP a cada 285 pb (em 479 genes potencialmente diferentes); nos genes *5HT1R* (receptor 1 da 5-hidroxitriptamina) e *STAT* (tradutor de sinal e ativador da transcrição) de *L. vannamei* – um SNP

a cada 132 pb e um a cada 800 pb, respectivamente (MARTI et al., 2010); e nos genes da β -actina e do *CHH* (hormônio hiperglicêmico de crustáceos) de *M. rosenbergii* (THANH et al., 2010) – um SNP a cada 140 pb e 51 pb, respectivamente. Vale ressaltar, que a densidade destes SNPs ainda variam conforme a região do genoma (região promotora, éxons, íntrons).

Os SNPs aqui prospectados foram classificados de acordo com o tipo de variação do nucleotídeo: transição, purina-purina ou pirimidina-pirimidina (duas possibilidades) ou transversões, purina-pirimidina (quatro possibilidades). Dentre os SNPs identificados, somente o SNP A694C representa uma transversão (7,7%). Este número de transversões detectadas neste trabalho está muito aquém de outros estudos. Por exemplo, Ciobanu et al. (2010) prospectaram SNPs de banco EST de *L. vannamei* e encontraram 63,3% de transições 36,6% de transversões.

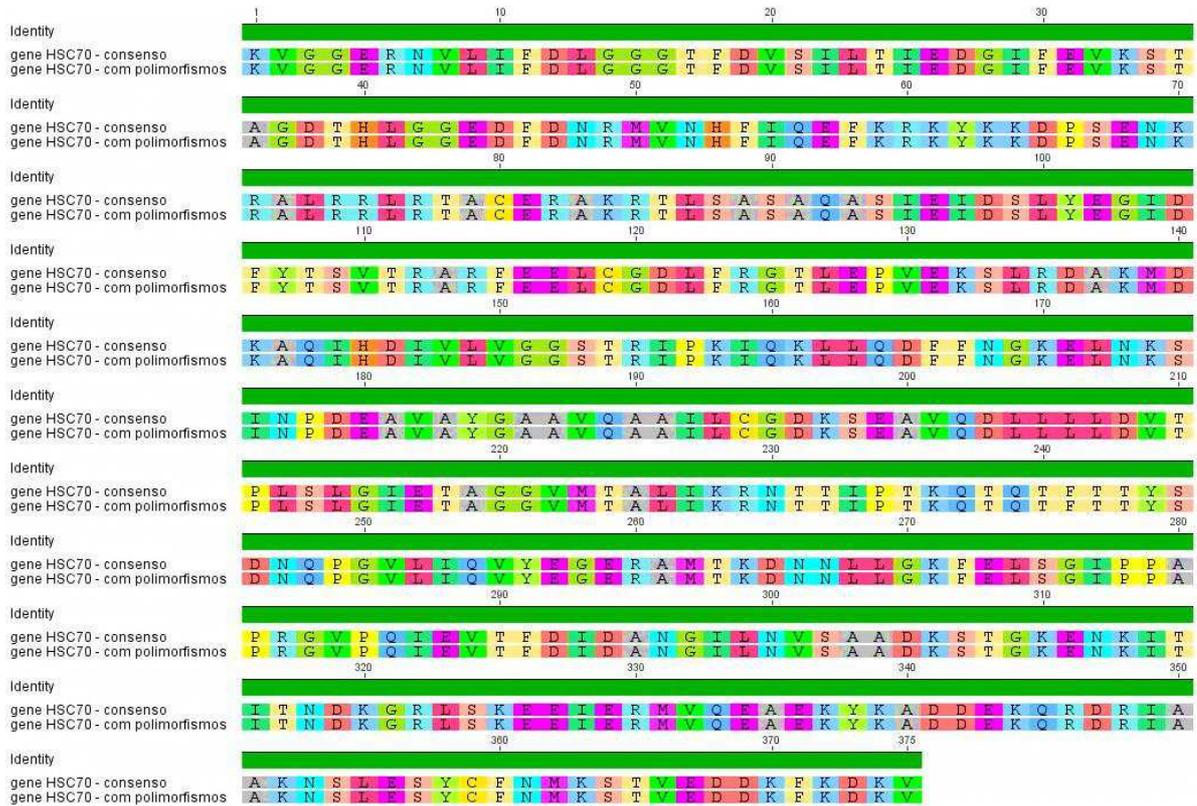
Brookes (1999) menciona que cerca de 75% das substituições são representadas por transições. O alto nível de transições pode estar relacionado à riqueza de ilhas de dinucleotídeos CpG, uma vez que estas regiões são predispostas às reações de desaminação espontânea da 5-metilcitosina em timina (COOPER; KRAWCZAK, 1989). No nosso estudo, estas substituições representadas por C \leftrightarrow T(G \leftrightarrow A) correspondem a 41,7% das transições (do total de transições – 92,7%).

Uma análise investigatória a respeito do tipo de mutação a que se refere cada um dos polimorfismos foi realizada. Para tanto, criou-se um segmento hipotético do gene contendo os alelos alternativos identificados e realizou-se a tradução destas sequências. Verificou-se, portanto, que nenhum dos SNPs gerou alteração da sequência de aminoácidos para parte da proteína HSC70, ou seja, todos os polimorfismos representam alterações sinônimas. A tradução e o alinhamento das duas sequências peptídicas estão apresentados na Figura 23.

Assim como no presente trabalho, os SNPs caracterizados no gene de membros da HSP70 em *L. vannamei* (ZENG et al., 2008), *P. trituberculatus* (CUI et al., 2010), *Apostichopus japonicus* (KANG et al., 2011) e *Miichthys miiuy* (WEI et al., 2012) também são sinônimos. Dentre os oito SNPs selecionados para os estudos de Unal e Bucklin (2010), somente um é não-sinônimo. Segundo Genissel et al. (2004) menos que 1% dos SNPs geram troca de aminoácidos na proteína resultante. Essa predominância de SNPs sinônimos verificados nos trabalhos está

de acordo com a redundância do código genético e a importante função das proteínas HSP70 no desenvolvimento e adaptação dos organismos.

Figura 23 - Alinhamento dos fragmentos proteicos da HSC70 de *M. amazonicum*. A sequência “gene HSC70 – consenso” foi gerada a partir da sequência consenso de parte do gene HSC70 do camarão-da-amazônia depositada no *GenBank*.



A sequência “gene HSC70 – com polimorfismos” foi gerada a partir de uma sequência de nucleotídeos hipotética, na qual foi realizada a substituição das bases detectada em cada sítio polimórfico. A barra gráfica “Identity” sem interrupções demonstra que os SNPs são sinônimos, pois não há diferença de aminoácidos entre as duas sequências proteicas.

O presente estudo abre novas possibilidades de pesquisas que usam estes SNPs como marcadores moleculares de populações de camarão-da-amazônia. Estes SNPs, portanto, podem ser aplicados com vistas a duas linhas de pesquisa. A primeira, baseada na associação destes polimorfismos com caracteres fenotípicos da espécie, sendo aplicados na aquicultura através da seleção assistida por marcadores. E, a segunda, baseada na análise de variabilidade deste gene em populações naturais, de modo a contribuir no entendimento de aspectos biológicos e na determinação de medidas de manejo de conservação da espécie.

**ASSOCIAÇÃO DE SNPs DO GENE HSC70 À CARACTERÍSTICAS DE
INTERESSE ZOTÉCNICO DO CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA
(*Macrobrachium amazonicum*)**

4.2. Associação de SNPs do Gene HSC70 à Características de Interesse Zootécnico do Camarão-da-Amazônia (*Macrobrachium amazonicum*)

4.2.1. Variáveis Físico-Químicas da Qualidade da Água

As variáveis de qualidade da água nos tanques experimentais de camarão-da-amazônia foram rigorosamente controlados ao longo de todo o experimento (Tabela 2). Deste modo, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), evidenciando que o controle das variáveis foi realizado adequadamente a fim de reduzir os efeitos residuais nas análises estatísticas de associação das informações fenotípicas aos marcadores SNPs estudados.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão das variáveis físico-química da água conforme a densidade de estocagem de *M. amazonicum*.

Variável físico-química da água	Densidade de estocagem		Total
	40.m ⁻²	200.m ⁻²	
Temperatura (°C)	26,39 ± 1,11	26,35 ± 1,11	26,40 ± 1,11
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	7,08 ± 0,52	6,97 ± 0,56	7,00 ± 0,54
pH	8,01 ± 0,50	7,93 ± 0,48	7,97 ± 0,48
Nitrogênio amoniacal total (mg.L ⁻¹)	0,0239 ± 0,0110	0,0357 ± 0,0179	0,0298 ± 0,0159
Nitrito (mg.L ⁻¹)	0,0078 ± 0,0057	0,0160 ± 0,0142	0,0119 ± 0,0115
Taxa de recirculação diária (vezes)	12,64 ± 3,45	10,47 ± 3,07	11,50 ± 3,40

(1) Médias ± desvio-padrão seguidos de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A temperatura da água tem um efeito direto sobre a cinética das reações químicas nas estruturas proteicas e funções enzimáticas dos organismos. Portanto as atividades biológicas dos organismos aquáticos sofrem constantes alterações decorridas das frequentes modificações ambientais, como quando da elevação da temperatura, que no caso os condiciona a um consumo maior de oxigênio (ARAÚJO; SANTOS; ARAÚJO, 2007).

Em nosso estudo, os termostatos foram controlados diariamente objetivando uma temperatura ideal de 28°C em todas as caixas de cultivo. Esta temperatura foi selecionada por

estar entre a faixa ideal para o cultivo do *M. rosenbergii* (26 a 32°C) (BOYD; ZIMMERMAN, 2000), haja vista que não há informações literárias sobre a faixa adequada das variáveis da água para o cultivo de *M. amazonicum*. Como o *M. amazonicum* é uma espécie tropical e ocorre em abundância nos rios da Amazônia (MORAES-RIODADES, 2005), pressupõe-se que a temperatura média (26,4°C) induzida em nosso experimento foi adequada ao seu desenvolvimento.

O oxigênio dissolvido é um dos principais fatores limitantes à intensificação da carcinicultura. Com o aumento da densidade populacional, deve-se aumentar a alimentação. Com isso, a respiração da espécie alvo e dos microorganismos presentes na água e nos sedimentos aumenta, podendo reduzir o oxigênio dissolvido a níveis muito baixos (MORAES-RIODADES, 2005). Desse modo, para que seja possível a intensificação do cultivo do camarão-da-amazônia, devem-se adotar estratégias eficientes que mantenham os níveis ideais de oxigênio dissolvido.

O pleno desenvolvimento de organismos aquático ocorre em níveis de oxigênio dissolvido superiores a 5,0 mg.L⁻¹ (TIMMONS et al., 2002). Em nosso experimento, os tanques foram mantidos com aeradores de aquário, de modo a garantir os níveis recomendados desta variável (média 7,0 mg.L⁻¹). O valor mínimo de oxigênio mensurado ao longo do experimento foi de 2,32 mg.L⁻¹. Este valor é tolerado sem estresse pelo *M. rosenbergii* por curtos períodos de tempo, sendo que a mortalidade ocorre comumente em níveis menores que 1,0 mg.L⁻¹ (BOYD; ZIMMERMAN, 2000). Assim como estes níveis são tolerados para o *M. rosenbergii*, espera-se que também sejam tolerados pelo *M. amazonicum*.

O pH regula a velocidade de uma série de reações e de processos químicos e biológicos (determinação da amônia gasosa e das formas químicas do enxofre presentes na água, processos relacionados à muda dos camarões, velocidade de decomposição da matéria orgânica, etc.) em um sistema aquático (BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2002). Segundo Boyd e Zimmerman (2000) a faixa ideal do pH para a produção de *M. rosenbergii* é de 7,0 a 8,5. No presente trabalho, o pH variou entre 6,18 e 8,98, sendo a média (7,97 ± 0,48) mantida dentro dos limites propostos para a espécie congênica, *M. rosenbergii*.

Os principais compostos tóxicos na água são o nitrogênio amoniacal e o nitrito (SHISHEHCHIAN et al., 1999). O nitrogênio amoniacal (amônia) é o principal resíduo nitrogenado excretado pelos camarões tendo origem nos processos metabólicos de

transformação e oxidação da proteína (aminoácidos) obtida nos alimentos, enquanto o nitrito é a forma intermediária entre o nitrogênio amoniacal e o nitrato (MIDLEN; REDDING, 2000). Recomenda-se níveis inferiores a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (em pH 9,5) de nitrato de amônia e inferiores a $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de nitrito para *M. rosenbergii* (NEW, 2000). Os valores obtidos no presente experimento foram sempre menores ($0,0298 \pm 0,0159$ para nitrato de amônia e $0,0119 \pm 0,0115$ para nitrito) que estes e, portanto, não devem ter afetado o desenvolvimento do *M. amazonicum*. Além disso, os baixos níveis destes compostos na água indicam o bom funcionamento do sistema de recirculação através do uso dos biofiltros, o qual, por sua vez abriga as populações dos microrganismos nitrificantes.

4.2.2. Estatística Descritiva das Informações Fenotípicas

4.2.2.1. Estrutura demográfica

A diferenciação sexual em machos e fêmeas foi possível somente na segunda biometria, aos 60 dias de cultivo. A maturidade das fêmeas pôde ser verificada ao segundo mês de cultivo nas duas densidades de estocagem testadas. Fêmeas ovígeras (FO) puderam ser identificadas no segundo mês de cultivo somente na densidade $40.\text{m}^{-2}$. No terceiro mês houve ocorrência de FO somente na densidade $200.\text{m}^{-2}$. No momento da despesca, FO ocorreram nas duas densidades de estocagem sem haver diferença significativa entre elas ($P > 0,05$).

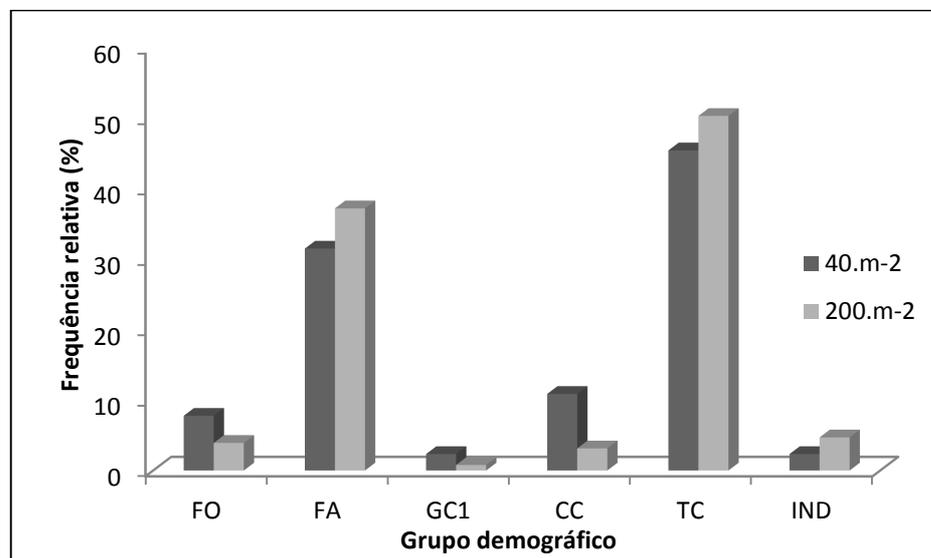
As fêmeas adultas não ovígeras (FA) foram mais frequentes dentre todas as classes demográficas durante o experimento, exceto no terceiro mês de cultivo no qual os machos TC foram mais frequentes. Não houve diferença significativa entre as frequências de FA nas densidades diferentes ao longo do experimento ($P > 0,05$).

O morfotipo TC foi o grupo demográfico mais frequente a partir do terceiro mês de cultivo, na densidade $40.\text{m}^{-2}$. No momento da despesca, não se detectou diferença estatística entre as densidades para este morfotipo ($P > 0,05$).

O morfotipo CC foi verificado já ao terceiro mês de cultivo, sendo, ao final do experimento, mais frequente na densidade $40.\text{m}^{-2}$ ($P \leq 0,05$). O morfotipo GC1 foi verificado à despesca, estando presente a uma frequência bastante baixa ($P > 0,05$). O morfotipo GC2 não foi identificado neste experimento. Ao longo do experimento, conforme o crescimento dos

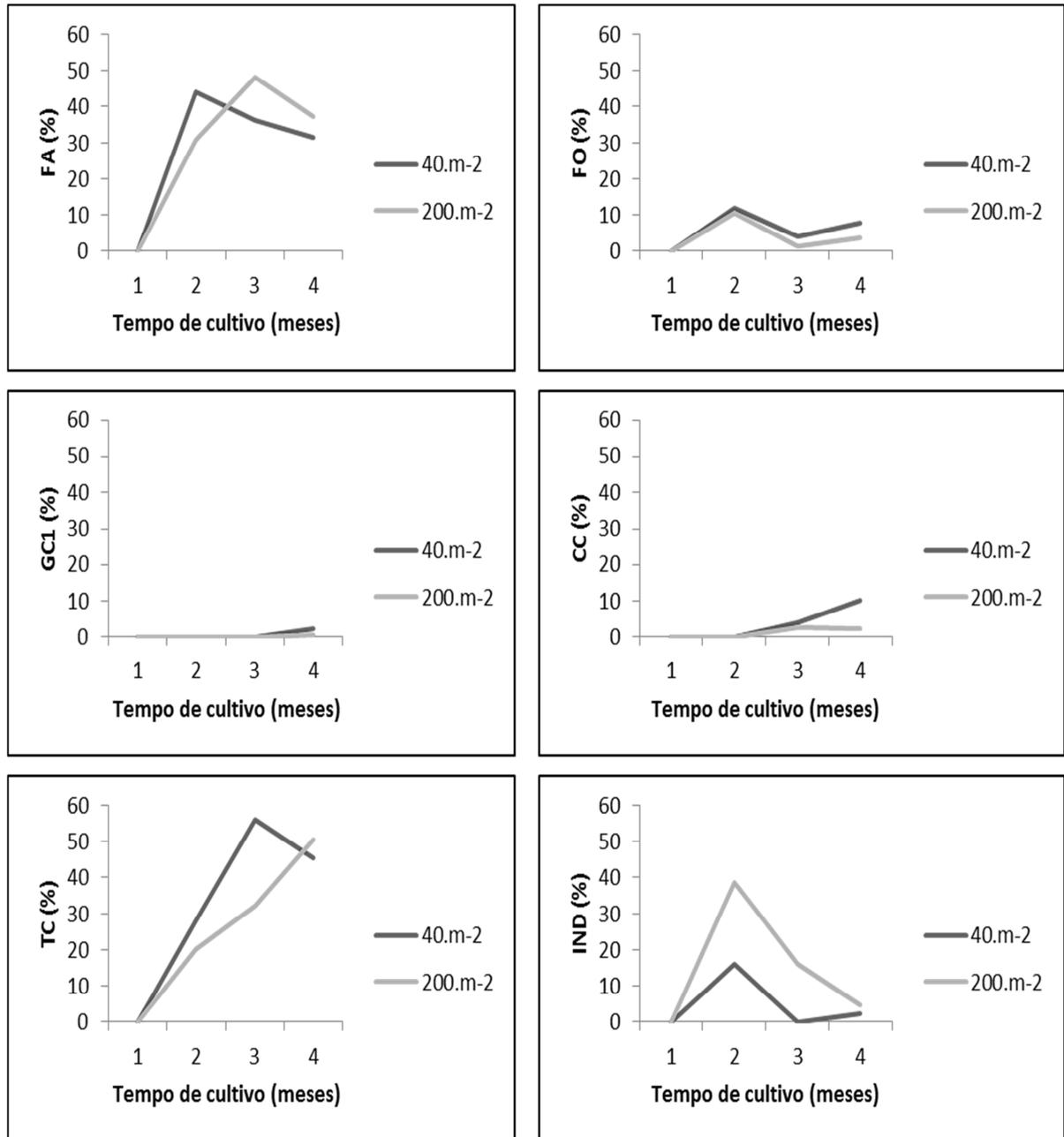
animais, a frequência de animais indiferenciados foi reduzindo. Contudo, a maior frequência destes indivíduos foi significativamente maior na densidade $200.m^{-2}$ ($P \leq 0,05$) somente até o terceiro mês de cultivo. Visto a baixíssima frequência dos morfotipos GC1 e CC e dos indivíduos indiferenciados sexualmente, estes foram desconsiderados para as análises de associação de SNPs às características zootécnicas. Os gráficos que descrevem as frequências das classes demográficas no momento da despesca e ao longo do experimento podem ser observados nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

Figura 24 - Frequência relativa de cada classe demográfica de *M. amazonicum* cultivados em duas densidades de estocagem ao momento da despesca.



FA, fêmeas adultas não ovígera; FO, fêmeas adultas ovígeras; GC1, morfotipo masculino *Green Claw1*; CC, morfotipo masculino *Cinnamon Claw*; TC, morfotipo masculino *Translucid Claw*; IND, indivíduos sexualmente indeterminados.

Figura 25 - Frequência relativa de cada classe demográfica de *M. amazonicum* ao longo do experimento cultivados em duas densidades de estocagem.



FA, fêmeas adultas não ovígera; FO, fêmeas adultas ovígeras; GC1, morfotipo masculino *Green Claw1*; CC, morfotipo masculino *Cinnamon Claw*; TC, morfotipo masculino *Translucid Claw*; IND, indivíduos sexualmente indeterminados.

Os quelípodos são apontados como estruturas fundamentais para o sucesso reprodutivo das espécies do gênero *Macrobrachium*. Em *M. rosenbergii*, os machos BC (machos dominantes; com quelas mais desenvolvidas) utilizam seus quelípodos durante a corte, para virar a fêmea com o ventre para cima na hora da cópula (para depositar o espermatóforo) e

para protegê-la logo após a postura dos ovos (ISMAEL; NEW, 2000; VALENTI, 1985). Baseados neste pressuposto, Moraes-Riodades e Valenti (2004) também sugeriram que os machos GC de *M. amazonicum* apresentam maior atividade reprodutiva. Contudo, baseado nos achados de nosso estudo, em que verificou-se a fêmeas ovígeras na presença de machos exclusivamente do morfotipo TC (no segundo mês de cultivo), e nos estudos de Papa et al. (2004), em que foram verificados comportamento sexual ativo de machos TC, sugerimos que novos estudos sobre o comportamento reprodutivo da espécie sejam conduzidos.

Neste trabalho não foi possível determinar um padrão da estrutura populacional ao longo do experimento, pois a diferença entre as frequências de cada um dos morfotipos não foi significativamente diferente entre as densidades. Esta abordagem foi esclarecida para a mesma população de *M. amazonicum* no estudo de Moraes-Valenti et al. (2010). Estes autores afirmam que a intensificação no cultivo altera a estrutura populacional de *M. amazonicum*, pois o aumento da densidade de estocagem no interior dos viveiros de cultivo reduz a frequência e o tamanho dos morfotipos maiores, retarda a maturação das fêmeas e desloca a distribuição de frequência de peso no sentido dos animais menores. Ainda, segundo os autores, esta mudança pode ser devido a mecanismos de regulação intrínsecas da espécie, competição intraespecífica por espaço e alimento, e/ou interferência direta do comportamento agonístico.

4.2.2.2. Desempenho zootécnico

A sobrevivência final dos camarões submetidos às densidades de 40 e 200.m⁻² foi, respectivamente, 87,8% e 84,6%, sem diferença significativa entre elas ($P > 0,05$) e pode ser considerada alta. A ocorrência de canibalismo ou outros problemas não afetou gravemente a sobrevivência, contudo desfavoreceu a coleta dos animais mortos para análise de associação dos polimorfismos à variável sobrevivência. Este parâmetro varia de 50 a 80% em viveiros de engorda de *M. rosenbergii* (VALENTI, 1996). A sobrevivência esperada para cultivo de camarões *Macrobrachium* é de 40 a 60% em 3-5 meses de cultivo, enquanto que para camarões peneídeos é de 60-80% em 3-4 meses de cultivo (WICKINS; LEE, 2002). Essa alta sobrevivência no presente estudo provavelmente se deve ao povoamento dos tanques com juvenis ao invés de pós-larvas e pela ausência da ação de predadores.

A média geral, média para cada densidade de estocagem e média para cada morfotipo para cada uma das características fenotípicas avaliadas estão apresentadas nas Tabelas 3, 4 e 5. A correlação existente entre as características está apresentada na Tabela 6.

Tabela 3 - Estatística descritiva geral das variáveis fenotípicas estudadas em *M. amazonicum*.

Caracter	n	Média	Desvio Padrão	Máximo	Mínimo
C _T (cm)	259	6,11	0,83	9,10	3,90
C _{ABD} (cm)	259	3,33	0,44	5,00	2,40
P _{INT} (g)	259	1,59	0,77	6,80	0,54
P _{ABD} (g)	255	0,91	0,40	3,24	0,32
P _{HEP} (g)	252	0,06	0,04	0,30	0,01
RC (%)	255	58,97	7,88	89,20	31,40
IHS (%)	252	4,04	1,67	14,70	0,99

C_T, comprimento total; C_{ABD}, comprimento abdominal; P_{INT}, peso inteiro; P_{ABD}, peso abdominal; P_{HEP}, peso do hepatopâncreas; RC, rendimento corporal; IHS, índice hepatossomático.

Tabela 4 - Estatística descritiva das variáveis fenotípicas (média ± erro padrão) estudadas em *M. amazonicum*, considerando-se os efeitos da densidade de estocagem.

Caracter	Densidade	
	40 . m ⁻² (n=130)	200 . m ⁻² (n=129)
C _T (cm)	6,84 ± 0,11a	6,22 ± 0,11b
C _{ABD} (cm)	3,64 ± 0,07a	3,42 ± 0,07b
P _{INT} (g)	2,41 ± 0,10a	1,99 ± 0,10b
P _{ABD} (g)	1,29 ± 0,06a	1,16 ± 0,06b
P _{HEP} (g)	0,10 ± 0,01a	0,09 ± 0,01a
RC (%)	55,70 ± 1,26b	63,58 ± 1,23a
IHS (%)	3,85 ± 0,27b	4,87 ± 0,26a

C_T, comprimento total; C_{ABD}, comprimento abdominal; P_{INT}, peso inteiro; P_{ABD}, peso abdominal; P_{HEP}, peso do hepatopâncreas; RC, rendimento corporal; IHS, índice hepatossomático.

(1) Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 5 - Estatística descritiva das variáveis fenotípicas (média \pm erro padrão) estudadas em *M. amazonicum*, considerando-se os efeitos da classe demográfica.

Caracter	Grupo demográfico				
	Fêmeas (n=104)	GC1 (n=4)	CC (n=18)	TC (n=124)	IND (n=9)
C _T (cm)	6,23 \pm 0,08a	8,53 \pm 0,27	7,26 \pm 0,14	5,86 \pm 0,08b	4,78 \pm 0,19
C _{ABD} (cm)	3,38 \pm 0,05a	4,40 \pm 0,16	3,93 \pm 0,09	3,18 \pm 0,05b	2,76 \pm 0,12
P _{INT} (g)	1,68 \pm 0,07a	4,67 \pm 0,25	2,62 \pm 0,13	1,29 \pm 0,07b	0,73 \pm 0,18
P _{ABD} (g)	0,99 \pm 0,04a	2,42 \pm 0,14	1,50 \pm 0,07	0,75 \pm 0,04b	0,46 \pm 0,10
P _{HEP} (g)	0,07 \pm 0,01a	0,20 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01b	0,03 \pm 0,01
RC (%)	59,75 \pm 0,93a	56,30 \pm 3,38	58,20 \pm 1,74	59,57 \pm 0,89a	64,37 \pm 2,35
IHS (%)	4,55 \pm 0,20a	5,14 \pm 0,79	4,61 \pm 0,39	4,21 \pm 0,19a	3,95 \pm 0,55

FA, fêmeas adultas não ovígera; FO, fêmeas adultas ovígeras; GC1, morfotipo masculino *Green Claw1*; CC, morfotipo masculino *Cinnamon Claw*; TC, morfotipo masculino *Translucid Claw*; IND, indivíduos sexualmente indeterminados; C_T, comprimento total; C_{ABD}, comprimento abdominal; P_{INT}, peso inteiro; P_{ABD}, peso abdominal; P_{HEP}, peso do hepatopâncreas; RC, rendimento corporal; IHS, índice hepatossomático.

(1) Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

(2) Classe demográfica em que as médias que não se seguem por letras indicando significância estatística, foram excluídos das análises por não apresentar frequência representativa na amostragem.

Tabela 6 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) determinada entre as características fenotípicas estudadas na espécie *M. amazonicum*. Abaixo da diagonal estão apresentados os valores de probabilidade para cada correlação.

	C _T	C _{ABD}	P _{INT}	P _{ABD}	P _{HEP}	RC	IHS
C _T	-	0,897	0,887	0,863	0,713	-0,377	-0,104
C _{ABD}	<0,0001	-	0,830	0,829	0,648	-0,304	-0,127
P _{INT}	<0,0001	<0,0001	-	0,954	0,796	-0,382	-0,099
P _{ABD}	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	0,787	-0,118	-0,050
P _{HEP}	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	-0,170	0,461
RC	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0589	0,0070	-	0,276
IHS	0,0992	0,0446	0,1178	0,4309	<0,0001	<0,0001	-

C_T, comprimento total; C_{ABD}, comprimento abdominal; P_{INT}, peso inteiro; P_{ABD}, peso abdominal; P_{HEP}, peso do hepatopâncreas; RC, rendimento corporal; IHS, índice hepatossomático.

O desempenho médio do camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*) obtido neste trabalho (1,59 g) foi aquém do obtido em outros estudos para a mesma população de *M. amazonicum* (MORAES-VALENTI; VALENTI, 2007; KIMPARA et al., 2011; PRETO, 2012). Nestes trabalhos foram obtidos pesos médios que variaram de 2,79 a 4,90 g. Porém, vale salientar que,

nestes estudos, o cultivo foi realizado em viveiros de terra em que há a disponibilidade de alimento natural.

Em nosso estudo, a quantidade de ração fornecida aos camarões durante os quatro meses de experimento foi abundante e certamente suficiente, uma vez que a taxa de arraçoamento foi calculada mensalmente de acordo com a biomassa de cada tanque. Além disso, a tentativa de se prolongar o tempo de cultivo no presente trabalho até que os camarões atingissem pesos comerciais não seria suficiente, uma vez que o ganho de peso médio para o tempo de cultivo praticado foi baixo ($0,22 \text{ g.mês}^{-1}$).

Outro fator importante foi que o cultivo foi realizado em um galpão fechado com pouca incidência de luz e com tanques experimentais abastecidos com água de abastecimento urbano. Esta condição limitou o aparecimento de algas, as quais podem ser utilizadas na dieta do *M. amazonicum*. Como foi demonstrado para o *M. rosenbergii* (SCHRÖEDER, 1983), o *M. amazonicum* deve depender do alimento natural presente nos viveiros (MORAES-RIODADES, 2005). Como exemplo dessa dependência de alimento natural por parte dos crustáceos, tomamos ainda os trabalhos de Anderson, Parker e Lawrence (1987) e Epp (2002). Os primeiros autores apontaram que 53-77% do crescimento de juvenis de *L. vannamei*, criados em viveiros de terra é devido à assimilação da biota natural. Epp (2002) estimou que mais de 31% do nitrogênio assimilado por *L. vannamei* foi obtido da produção natural. É possível que o alimento natural atenda melhor as exigências da dieta do *M. amazonicum*, se comparado à dieta artificial (PENTEADO, 2012), uma vez que esta última não é específica para a espécie e nem foi elaborada para camarões de água doce.

Dietas específicas para *Macrobrachium* são inexistentes no Brasil (PENTEADO, 2012). Esta observação pode justificar o fato de que, embora os trabalhos de Moraes-Valenti e Valenti (2007), Kimpara (2011) e Preto (2012) tenham revelado médias de peso superiores ao presente trabalho, estes também são inferiores ao que se espera pelo potencial da espécie, em que os indivíduos chegam a atingir 10 g no ambiente natural (LOBÃO; ROJAS, 1991). No entanto, uma abordagem que pode ser utilizada em condições de cultivo em laboratório em trabalhos futuros seria simular a produtividade natural do viveiro, a fim de fornecer recursos para uma suplementação alimentar da espécie. Em sistemas intensivos sem renovação de água, os microrganismos colonizam detritos orgânicos formando os flocos microbianos e estes

complementam a dieta dos camarões reduzindo custos com alimentação (WASIELESKY et al. 2006). Otoshi et al. (2006) relataram o efeito da suplementação da dieta com flocos bacterianos, estudo este que revelou que 70-80% do ganho de peso do *L. vannamei* criados em condições de laboratório foi atribuído à suplementação da dieta artificial.

A densidade menor originou uma frequência maior de camarões grandes, resultando em médias significativamente maiores para as características morfométricas C_T , C_{ABD} , P_{INT} e P_{ABD} , em que somente os índices RC e IHS foram menores. Estes resultados são condizentes com os relatados para muitas outras espécies de camarões cultivados. Estudos apontam para uma relação inversa entre a densidade de estocagem e o desempenho zootécnico (crescimento e sobrevivência) em todas as fases do cultivo (larvicultura, berçário e engorda) de espécies de camarões marinhos e de água-doce (KRUMMENAUER et al. 2006; MORAES-VALENTI; VALENTI, 2007; MORAES-VALENTI et al., 2010; MOSS; MOSS, 2004; OTOSHI et al., 2007; PRETO et al., 2005; SILVA, 2009; WASIELESKY et al., 2001; WILLIAMS; DAVIS; ARNOLD, 1996).

Segundo Otoshi et al. (2007), a principal causa desta relação inversa entre densidade de estocagem e desempenho ainda é desconhecida devido à dificuldade de separar os efeitos do comportamento dos camarões e da qualidade da água nas diferentes densidades de estocagem (MOSS; MOSS 2004). Porém, em nosso estudo as variáveis de qualidade de água foram controladas, o que pode atribuir esta relação inversa principalmente aos efeitos comportamentais da espécie. Especula-se que este fenômeno seja resultante do aumento da competição por recursos vitais como alimento e espaço e por eventos de canibalismo (ARNOLD et al. 2006; KRUMMENAUER et al. 2006; PRETO et al. 2005). Desse modo, é possível que, o crescimento seja reduzido tanto pela carência de recursos, como pelo maior gasto de energia motivado pelo estresse decorrente da competição (VALENTI; MELLO; CASTAGNOLI, 1993).

Vista a possibilidade de que a redução do crescimento pode se dar em função de um estresse gerado no ambiente, a relação entre o peso do hepatopâncreas e o peso total do camarão, ou seja, o índice hepatossomático (IHS), acaba por ser considerado como um bom indicador de variação na taxa de crescimento dos camarões. Este índice indica se o animal está sofrendo alguma condição que imponha um maior gasto energético ou uma maior retenção lipídica hepática. Desse modo, uma vez que o hepatopâncreas dos crustáceos é o maior centro de reservas orgânicas e inorgânicas (GARCIA; GONZÁLEZ-BARÓ; POLERO, 2002; GIBSON;

BARKER, 1979) e que haja de fato uma condição de estresse imposta ao animal, é esperado que ocorra uma retenção dessas reservas energéticas na maior densidade de estocagem, pois é quando a condição de estresse é maior. Nesta condição, aponta-se que os valores dos IHS e de crescimento são antagônicos.

O antagonismo entre as variáveis que indicam crescimento corporal e o IHS pode ser verificado no presente trabalho. Aqui, verificamos que na densidade na qual o crescimento foi menor (densidade de $200.m^{-2}$), o IHS foi maior (IHS=4,87). Além disso, esta relação inversa poderia ser confirmada pela análise de correlação de Pearson, pois, para estas variáveis, os valores de correlação (r) são negativos.

No que tange ao crescimento, Dall (1986) afirma que o crescimento dos camarões varia não apenas conforme a densidade de estocagem, mas também conforme o sexo e o tamanho do animal. Em nosso estudo também testamos o efeito de sexo no crescimento do camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*). Foi verificado que as fêmeas apresentaram médias superiores em relação aos machos TC para todas as características corporais (C_T , C_{ABD} , P_{INT} e P_{ABD}). Vale a pena lembrar que em nossas análises, os machos GC2, GC1 e CC foram desconsiderados por apresentar-se sob frequência muito reduzida. Contudo, sabe-se que estes morfotipos, com exceção dos machos CC, apresentam maiores taxas de crescimento em relação aos demais.

Ainda, a determinação do tamanho dos indivíduos depende tanto de fatores intrínsecos da população, tais como características genéticas e competição intraespecífica, quanto de fatores extrínsecos, tais como fatores ambientais físicos e químicos, a competição interespecífica e predação, que atuam sobre os camarões durante desenvolvimento ontogenético (MORAES-VALENTI et al., 2010). Como as variáveis de qualidade de água foram monitorados rotineiramente e não apresentaram diferenças entre os tratamentos, os juvenis foram distribuídos aleatoriamente nas caixas experimentais e a competição interespecífica e predação eram inexistentes, presume-se que o efeito observado no crescimento deva-se em grande parte em função da densidade de estocagem. Os fatores genéticos também devem ser levados em consideração, desse modo nos tópicos 4.2.5 e 4.2.6 desta tese será feita uma abordagem que busque verificar o efeito de polimorfismos genéticos sobre o crescimento do camarão-da-amazônia.

O maior IHS das fêmeas (IHS=4,55) em relação aos machos TC (IHS=4,21) poderia sugerir que estes animais estejam acumulando reservas de nutrientes e lipídeos para a reprodução, contudo, a diferença não é estatisticamente significativa. Esse resultado para o IHS de fêmeas e morfotipos TC de *M. amazonicum* corrobora novamente a indicação de Papa et al. (2004), que sugerem que os machos TC da espécie apresentam atividade sexual. Além disso, ainda baseando-se somente no IHS semelhante nas fêmeas e machos TC aqui verificado, os resultados divergem da afirmação de Moraes-Valenti et al. (2010) que sugerem que o morfotipo TC representa uma classe demográfica que presumivelmente não gasta energia para crescimento e reprodução. Para esta afirmativa ser completamente verdadeira, o IHS do morfotipo TC deveria ser significativamente menor em relação aos das fêmeas, haja vista que, como já citado, as fêmeas necessitam de um acúmulo energético devido ao direcionamento desta energia para as funções reprodutivas. Evidentemente, estudos detalhados que contemplem, simultaneamente, a análise dos sistemas reprodutor e hepatossomático feminino e masculino devem ser realizados para confirmar esta suposição.

No presente estudo, verificou-se 56 e 64% de rendimento corporal nas densidades de estocagem de 40 e 200 camarões.m⁻², respectivamente. Não houve diferença estatística para este índice quando testado o efeito da classe demográfica. De acordo com Silva, Souza e Cintra (2002) e Flexa et al. (2005), uma relação entre peso abdominal e total de aproximadamente 55% é o esperado para o camarão *M. amazonicum*.

A redução do RC na menor densidade de estocagem é explicada por uma relação existente entre o comprimento do cefalotórax e o C_T. Nessa relação há um aumento na proporção do cefalotórax à medida que os animais crescem. Provavelmente isto ocorra porque nesta porção do corpo estão concentrados os órgãos vitais do camarão (MORAES-RIODADES; VALENTI, 2002). Espera-se que com o desenvolvimento desses órgãos, o cefalotórax aumente proporcionalmente (KURIS et al., 1987). Essa característica, não é considerada boa para o cultivo, pois quanto maior for o animal, menor será o rendimento em carne, uma vez que apenas o abdômen é consumido.

4.2.3. Genotipagem dos SNPs e Frequências Alélicas

As sequências da região codificante do gene da HSC70 foram amplificadas nas amostras obtidas do experimento de desempenho de camarões-da-amazônia cultivados sob duas densidades de estocagem. Duas regiões no gene foram amplificadas (primer HSC70-1 e HSC70-2) e deram origem a uma sequência nucleotídica contígua de 1.128 bp (seção 4.1.1).

Doze SNPs foram identificados e genotipados no presente trabalho (Tabela 7). A maioria deles correspondem aos validados anteriormente na seção 4.1.2 deste trabalho. O SNP C160T foi identificado pela primeira vez neste trabalho. Além disso, os SNPs C529T e T997C anteriormente validados (seção 4.1.2), não foram constatados aqui. Todos os polimorfismos são constituídos por mutações sinônimas. E, mesmo tratando-se de mutações sinônimas, estes polimorfismos podem influenciar na estabilidade termodinâmica do mRNA, resultando em variação fenotípica (WANG et al., 2007).

Tabela 7 - Frequências alélicas dos polimorfismos no gene da HSC70 nas densidades de estocagem e grupos populacionais de *M. amazonicum*.

Loco	Alelo/n	Frequências alélicas				Total	EHW
		Densidade		Classe demográfica			
		40 . m ⁻²	200 . m ⁻²	Fêmeas	Macho TC		
T43C	n	126	118	97	118	244	0,119
	T	0,833	0,746	0,799	0,792	0,791	
	C	0,167	0,254	0,201	0,208	0,209	
C160T	n	128	124	101	120	252	1,000
	C	0,980	0,984	0,980	0,983	0,982	
	T	0,020	0,016	0,020	0,017	0,018	
T247C	n	128	124	101	120	252	0,187
	T	0,840	0,883	0,866	0,858	0,861	
	C	0,160	0,117	0,134	0,142	0,139	
C256T	n	128	124	101	120	252	0,077
	C	0,922	0,948	0,936	0,925	0,935	
	T	0,078	0,052	0,064	0,075	0,065	
C313T	n	128	124	101	120	252	1,000
	C	0,977	0,980	0,980	0,979	0,978	
	A	0,023	0,020	0,020	0,021	0,022	
G466A	n	128	124	101	120	252	0,107
	G	0,859	0,815	0,842	0,833	0,837	

A694C	A	0,141	0,185	0,158	0,167	0,163	0,190
	n	130	129	104	124	259	
A757G	A	0,835	0,895	0,870	0,863	0,865	0,766
	C	0,165	0,105	0,130	0,137	0,135	
A856G	n	130	129	104	124	259	1,000
	A	0,708	0,705	0,659	0,750	0,707	
C874T	G	0,292	0,295	0,341	0,250	0,293	0,750
	n	129	129	104	124	258	
T877C	A	0,907	0,853	0,865	0,875	0,880	1,000
	G	0,093	0,147	0,135	0,125	0,120	
T907C	n	129	129	104	124	258	1,000
	T	0,097	0,124	0,077	0,121	0,110	
	C	0,903	0,876	0,923	0,879	0,890	
	T	0,097	0,124	0,077	0,121	0,110	
	n	129	129	104	124	258	1,000
	T	0,950	0,946	0,938	0,964	0,948	
	C	0,050	0,054	0,063	0,036	0,052	
	n	129	129	104	124	258	
	T	0,950	0,965	0,966	0,948	0,957	
	C	0,050	0,035	0,034	0,052	0,043	

EHW, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($0,00417 < \alpha < 0,05$) depois da correção sequencial de Bonferroni.

Pode-se verificar que a maioria dos marcadores apresentou boa distribuição alélica, com frequências superiores a 5,0%. Somente os alelos polimórficos dos SNPs C160T, C313T e T907C foram menos frequentes. Contudo, a frequência com que estes alelos se apresentam ainda está de acordo com o preconizado (BROOKES, 1999; VIGNAL et al., 2002) para se aceitar como um SNP e não uma mutação rara (>1,0%).

As frequências alélicas encontradas entre as densidades de estocagem não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$), com exceção do SNP T43C ($P \leq 0,05$). Para este SNP, o alelo C teve uma frequência de 16,70% para a menor densidade e 25,40% para a maior densidade. Entre os grupos populacionais (fêmeas e machos TC) as frequências alélicas foram semelhantes ($P > 0,05$) para todos os polimorfismos. Nenhum dos SNPs apresentou-se sob desvio do EHW, após a correção sequencial de Bonferroni. Logo, todos foram considerados nas análises de associação.

4.2.4. Reconstrução dos Haplótipos e Frequências Haplótípicas

Um haplótipo é um rearranjo físico dos alelos SNPs ao longo de um cromossomo (OLIVIER, 2003). Anteriormente à reconstrução dos haplótipos, testes de verificação quanto à presença de eventos de recombinação entre os sítios SNPs. Não foi verificado recombinação.

Com o método de inferência Bayesiana, identificou-se 12 haplótipos (H1 a H12) na população experimental de camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*). Na Tabela 8 estão apresentados os haplótipos e sua distribuição.

O haplótipo H4 corresponde à sequência publicada no GenBank (número de acesso JX948079). Pode-se verificar que a maioria dos haplótipos se apresenta com boa distribuição na população, com frequências superiores a 4,0%. A exceção se concentra nos haplótipos H1, H6 e H12.

Quando comparadas as frequências haplotípicas nas densidades de estocagem, verificou-se que as frequências são diferentes para os haplótipos H3, H10 e H11 ($P \leq 0,05$). Entre os grupos populacionais, houve diferença significativa para as frequências dos haplótipos H2, H5, H7, H9 e H11.

Tabela 8 - Haplótipos reconstruídos para o gene da HSC70 do *M. amazonicum* e sua distribuição conforme a densidade de estocagem e classe demográfica.

Haplótipo	Sítio Variável												Frequência haplotípica				
													Densidade		Classe demográfica		Total
	43	160	247	256	313	466	694	757	856	874	877	907	40.m ⁻²	200.m ⁻²	Fêmeas	Machos TC	
H1	C	C	T	C	C	G	A	A	A	C	T	T	0,002	0,000	0,002	0,000	0,002
H2	C	C	T	C	C	G	A	A	A	T	T	T	0,047	0,055	0,031	0,053	0,102
H3	C	C	T	C	C	G	A	A	G	C	T	T	0,045	0,068	0,051	0,055	0,113
H4	T	C	T	C	C	G	A	A	A	C	T	T	0,059	0,045	0,061	0,053	0,105
H5	T	C	T	C	C	G	A	A	A	C	T	C	0,027	0,018	0,014	0,027	0,045
H6	T	C	T	C	C	G	A	A	A	T	T	T	0,002	0,002	0,000	0,002	0,004
H7	T	C	T	C	C	G	A	G	A	C	T	T	0,086	0,094	0,088	0,070	0,180
H8	T	C	T	C	C	G	A	G	A	C	C	T	0,023	0,020	0,014	0,018	0,043
H9	T	C	T	C	C	A	A	A	A	C	T	T	0,086	0,092	0,068	0,092	0,178
H10	T	C	T	T	C	G	A	G	A	C	T	T	0,043	0,025	0,029	0,035	0,068
H11	T	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	T	0,086	0,053	0,051	0,070	0,140
H12	T	T	T	C	A	G	A	A	A	C	T	T	0,010	0,010	0,008	0,010	0,021

4.2.5. Associação dos Genótipos SNPs com as Características Fenotípicas

Até o momento, os estudos que relatam associação entre SNPs e características fenotípicas em espécies aquáticas são incipientes se comparados com os organismos terrestres. Alguns dos exemplos de SNPs envolvidos em características de crescimento de peixes, moluscos e crustáceos incluem os genes do eixo do hormônio do crescimento (BLANCK, et al., 2009; SANCHEZ-RAMOS et al., 2006; TAO; BOULDING, 2003; YU et al., 2010), o gene da amilase (GLENN et al., 2005; PRUDENCE et al., 2006), o gene da parvalbumina (XU et al., 2006), o gene do hormônio hiperglicêmico de crustáceos (THANH et al., 2010), o gene transdutor de sinal e ativador da transcrição (MARTI et al., 2010), o gene do peptídeo relacionado à insulina (CONG; LI; KONG, 2013), o gene da DNA helicase dependente de ATP (PRASERTLUX et al., 2010) e o gene da miostatina (WANG et al., 2010).

Em camarões de água-doce, o único trabalho que utiliza esta abordagem disponível na literatura até o momento, é o trabalho realizado por Thanh et al. (2010). Os autores indicam que polimorfismos SNPs e haplótipos do gene do hormônio hiperglicêmico de crustáceos estão correlacionados significativamente com o crescimento de fêmeas de *M. rosenbergii*.

No que tange o estudo de polimorfismos em genes da família das HSP70 em camarões, o único trabalho realizado verificou a associação de SNPs com a resistência ao vírus da Síndrome de Taura em *L. vannamei* (ZENG et al., 2008). Em animais de produção terrestres, SNPs no gene da HSP70 se mostraram associados a características reprodutivas (HUANG et al., 2000; HUANG et al., 2002; ROSENKRANS JR et al., 2010) e características de qualidade de carne e de crescimento (HUANG et al., 2004; MAAK et al., 1998; REARDON et al., 2010). Entretanto, deve-se atentar ao fato de que estes estudos acessaram polimorfismos no gene da forma induzível da HSP70.

O presente trabalho é pioneiro ao estudar polimorfismos na forma constitutiva do gene da HSP70 (ou HSC70) e testar a associação dos mesmos à variáveis fenotípicas. Como este gene é ubiquamente expresso nos organismos e possui função fundamental na manutenção celular (dobramento e direcionamento das proteínas recém-traduzidas), trabalhou-se com a premissa de que este gene pudesse estar envolvido na determinação de características de interesse econômico do camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*), como o crescimento e a reprodução.

Na primeira abordagem para associação de SNPs às variáveis fenotípicas assumiu-se que o efeito quantificado para o SNP é constante nas duas densidades de estocagem e morfotipos estudados. No âmbito das análises realizadas, não houve nenhuma associação entre as variáveis biológicas e os polimorfismos ($P > 0,05$).

Na segunda abordagem, estudaram-se as interações entre os SNPs e o efeito da densidade de estocagem sobre as características mensuradas. Nestas análises, verificou-se somente o efeito do SNP C256T na densidade $40.m^{-2}$ ($P \leq 0,01$). Não houve efeito de nenhum SNP na densidade $200.m^{-2}$ ($P > 0,05$). Na Tabela 9, encontram-se as médias para cada variável mensurada de acordo com os genótipos do SNP C256T associado com a menor densidade.

Tabela 9 - Efeito do SNP C256T sobre as características fenotípicas (média \pm erro padrão) de *M. amazonicum* cultivados na densidade de estocagem $40.m^{-2}$.

Caracter	densidade $40.m^{-2}$	
	C/C	C/T
C_T (cm)	$6,69 \pm 0,08b$	$7,05 \pm 0,15a$
C_{ABD} (cm)	$3,56 \pm 0,05b$	$3,81 \pm 0,09a$
P_{INT} (g)	$2,21 \pm 0,10b$	$2,69 \pm 0,16a$
P_{ABD} (g)	$1,21 \pm 0,05a$	$1,39 \pm 0,09a$
P_{HEP} (g)	$0,089 \pm 0,01b$	$0,116 \pm 0,01a$
RC (%)	$55,75 \pm 1,37a$	$53,79 \pm 2,16a$
IHS (%)	$3,52 \pm 0,24a$	$3,80 \pm 0,36a$

C_T , comprimento total; C_{ABD} , comprimento abdominal; P_{INT} , peso inteiro; P_{ABD} , peso abdominal; P_{HEP} , peso do hepatopâncreas; RC, rendimento corporal; IHS, índice hepatossomático.

(1) Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Os genótipos T/T para o SNP C256T foram pouco frequentes na amostragem (somente 3) e, então foram desconsiderados. De qualquer modo, as diferenças entre os genótipos C/C e C/T na densidade 40 são interessantes e significativos para as características C_{ABD} , P_{INT} e P_{HEP} ($P \leq 0,01$). Valor de significância menos rigoroso foi obtido para a variável C_T ($P \leq 0,05$). Evidencia-se, portanto, a superioridade dos genótipos C/T no que se refere às variáveis biológicas citadas.

Como já citado, não houve efeito de SNPs na densidade de 200 camarões. m^{-2} . Sugere-se duas possibilidades de causa para a não ocorrência de efeito dos SNPs na condição de intensificação do cultivo: (1) foi estudada a forma constitutiva do gene HSC70, o qual,

teoricamente, não tem seus níveis de expressão potencializado durante uma condição estressante. E assim sendo, o efeito verificado sobre o crescimento na densidade 40 seria simplesmente o resultado da diferença na eficiência do dobramento (*folding*) normal das proteínas. Entretanto, esta afirmação pode ser controversa, uma vez que há estudos que relatam que tanto a forma induzível quanto a constitutiva do gene da HSP70 tem seus níveis de expressão aumentados sob condição de estresse (LO et al., 2004; TAVIARA et al., 1996); ou (2) existe interação genótipo x ambiente. A presença de interação genótipo x ambiente (G x A) se caracteriza por uma resposta diferenciada dos genótipos às variações ambientais, o que pode ocasionar alteração no ordenamento de desempenho dos genótipos nos diferentes ambientes (FALCONER; MACKAY, 1996).

Outros estudos que possam indicar polimorfismos em genes das HSP70s do camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*) que estejam relacionados ao melhor desempenho sob elevada densidade de estocagem devem ser conduzidos futuramente. Neste caso, as análises, além de abordar o gene da forma induzível da HSP70, deverão considerar interações genótipo x ambiente. Além disso, a possibilidade de se testar os níveis de expressão do gene da HSC70 e da HSP70 em animais estressados e não estressados não deve ser descartada.

Na terceira abordagem avaliou-se se os SNPs poderiam ter efeitos diferentes nos grupos populacionais avaliados (Tabela 10). Os morfotipos GC1, CC e os indiferenciados, como já mencionado, estão muito pouco representados e não foram incluídos na análise. Nestas análises, verificou-se o efeito do SNP T907C sobre o P_{HEP} das fêmeas ($P \leq 0,01$). Contudo, deve-se chamar a atenção para valores de significância menos rigorosos para as características de P_{INT} e P_{ABD} ($P \leq 0,05$). Dentro desta abordagem, o SNP C256T também apresentou efeito com valores menos rigorosos de significância sobre a variável P_{ABD} das fêmeas ($P \leq 0,05$).

Tabela 10 - Efeito dos SNPs C256T e T907C sobre as características fenotípicas (média \pm erro padrão) de fêmeas do *M. amazonicum*.

Caracter	Genótipos SNP C256T		Genótipos SNP T907C	
	C/C	C/T	T/T	T/C
C _T (cm)	---	---	6,19 \pm 0,06a	6,29 \pm 0,20a
C _{ABD} (cm)	---	---	---	---
P _{INT} (g)	1,67 \pm 0,05a	2,01 \pm 0,15a	1,67 \pm 0,05b	2,12 \pm 0,16a
P _{ABD} (g)	0,97 \pm 0,04b	1,18 \pm 0,09a	0,98 \pm 0,04b	1,22 \pm 0,10a
P _{HEP} (g)	0,070 \pm 0,04a	0,072 \pm 0,01a	0,07 \pm 0,004b	0,09 \pm 0,0010a
RC (%)	---	---	59,12 \pm 0,81a	57,78 \pm 2,53a
IHS (%)	---	---	---	---

C_T, comprimento total; C_{ABD}, comprimento abdominal; P_{INT}, peso inteiro; P_{ABD}, peso abdominal; P_{HEP}, peso do hepatopâncreas; RC, rendimento corporal; IHS, índice hepatossomático.

(1) Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

(2) Para níveis de significância muito elevados nas análises de interações entre o SNP e a classe demográfica, não foram geradas as médias para as variáveis fenotípicas pelo *Proc Mixed* do SAS (---).

Estes valores sugerem que os alelos variantes destes SNPs (alelo T e C, respectivamente para os SNPs C256T e T907C) têm um impacto positivo no crescimento das fêmeas de *M. amazonicum*. O efeito do SNP T907C sobre o peso corporal foi previamente verificado em um estudo preliminar (BLANCK et al., 2012) que contemplou seis dos SNPs (A694C, A757G, A856G, C874T, T877C, T907C) estudados no presente trabalho. Neste primeiro estudo, os efeitos dos SNPs sobre as variáveis fenotípicas foram analisados em um modelo fixo pelo procedimento dos Modelos Lineares Generalizados ($P \leq 0,05$).

De maneira geral, os resultados referentes aos efeitos significativos dos alelos alternativos dos SNPs C256T e T907C sobre os caracteres de crescimento do camarão-da-amazônia corroboram o envolvimento de HSPs na atrofia muscular em crustáceos. Spees et al. (2003) relatam que os níveis de mRNA da HSC70 e HSP90 foram significativamente induzidos nos estágios de pré-muda e intermuda em uma espécie de lagosta. Este envolvimento consiste no fato de que o crescimento em crustáceos está relacionado ao ciclo de mudas (ecdises) e requer muita energia (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004) e esta fase representa um período de fragilidade e estresse do animal até que o exoesqueleto esteja rígido novamente. Por isso, os crustáceos controlam a frequência dessas mudas dependendo das condições ambientais (STEVENSON, 1985).

Sobretudo, no que diz respeito ao efeito do SNP T907C sobre o P_{HEP} , é possível de se estar perante um efeito com algum impacto no desenvolvimento reprodutivo das fêmeas. Esta relação feita entre o peso do hepatopâncreas e os aspectos reprodutivos das fêmeas de *M. amazonicum* consiste no fato de que, durante a maturação do ovário, os estoques de lipídeos neutros e fosfolipídeos estocados no hepatopâncreas são quebrados e transportados para o ovário, que se torna um centro adicional de metabolismo de lipídeos (HARRISON, 2000). Para a maturação gonadal, portanto, é necessário que o hepatopâncreas reserve maior quantidade de lipídeos e, desse modo, apresente maior tamanho/peso. Estudos realizados com fêmeas maduras de *P. monodon*, (MILLAMENA; PASCUAL, 1990), demonstraram que boa parte da reserva de energia acumulada no hepatopâncreas era utilizada para o gasto metabólico do animal, realizado principalmente durante a desova. Desta forma, pode-se inferir que as reservas presentes no hepatopâncreas dos animais, quando os ovários encontram-se em determinados estágios de maturação são muito importantes para a conclusão da ovogênese (RIBEIRO, 2003).

No que se refere ainda às características reprodutivas, a associação de SNPs em genes de membros da família da HSP70 à variáveis relacionadas à reprodução encontrada no presente trabalho está de acordo com os descobertos para mamíferos (HUANG et al., 2002; ROSENKRANS JR et al., 2010). Nestes estudos citados, SNPs no gene da HSP70 se apresentaram com efeito significativo sobre variáveis como taxa de partos, viabilidade espermática, número de espermatozoides por ejaculato e volume de ejaculato em suínos e bovinos.

Várias isoformas de HSP70 são conhecidas por estarem presentes em estágios específicos durante a espermatogênese em camundongos, ratos e seres humanos (ANGELIER et al., 1996; CHAN et al., 2003; MORI et al., 1997). Além disso, a HSP70 está envolvida na espermatogênese, fertilização e desenvolvimento embrionário em humanos (EGGERT et al., 2002), roedores (NEUER et al., 2000), bovinos (MATWEE et al., 2001) e espécies marinhas (EVANS et al., 2005; HEIKKILA, 2010). Segundo Fang et al. (2012) a HSP70 também é uma proteína essencial na espermatogênese e maturação dos espermatozoides de crustáceos.

Retomando aos efeitos verificados do SNP T907C sobre as variáveis P_{INT} , P_{ABD} ($P \leq 0,05$) e P_{HEP} ($P \leq 0,01$), deve-se chamar atenção ao fato de que aspectos reprodutivos como a prolificidade estão correlacionados diretamente com o peso total do corpo e com os

comprimentos total do corpo e da carapaça (ou pós-orbital) do animal (SURESHKUMAR; KURUP 1998), pois quanto maior é a fêmea, maior é a quantidade de ovos produzidos. Deste modo, a seleção de fêmeas com o genótipo T/C para este SNP, poderia ser bastante vantajosa. Além de proporcionar um aumento no peso médio na geração seguinte, o que confere um preço mais competitivo do produto final no mercado, também proporcionaria uma melhoria na larvicultura em grande escala.

Tendo em vista as evidências de associação de SNPs ao P_{HEP} de fêmeas da espécie *M. amazonicum* e os aspectos que envolvem as proteínas HSP70s na espermatogênese, fertilização e desenvolvimento embrionário de outros organismos, pesquisas futuras podem ser direcionadas à tentativa de verificar também mais profundamente a relação entre estes polimorfismos no gene da HSC70 e a ovogênese nesta espécie de camarão de água-doce.

Como verificado anteriormente, os SNPs analisados neste trabalho tratam-se de mutações sinônimas. Duas explicações parcimoniosas para os efeitos fenotípicos dos SNPs sinônimos podem ser sugeridas: (1) os efeitos fenotípicos seriam causados por alterações na estrutura do mRNA (CHAMARY; HURST, 2005; GRISERI et al. 2011; WANG et al., 2007). Pois, segundo Wang et al. (2007), estruturas de mRNAs codificados por haplótipos alternativos do gene da proteína ligadora de odor em *Drosophila* mostram que uma única substituição de base pode ter um efeito profundo sobre a estrutura secundária do mRNA. E isto pode afetar o seu transporte, o *splicing*, a ligação ao ribossomo ou a eficiência da tradução (KIMCHI-SARFATY et al., 2007). Entretanto, genes *housekeeping* como é o caso do gene da HSC70, cujas proteínas estão sob forte seleção purificadora, também estão sob a maior pressão para manter a estabilidade do mRNA (CHAMARY; HURST, 2005). Este fato afasta a possibilidade desta hipótese ser verdadeira para o presente estudo; e (2) estes SNPs se apresentam em forte desequilíbrio de ligação (DL) com algum gene que tenha efeito direto sobre as variáveis fenotípicas. Haja vista que, a detecção de associações estatisticamente significativas entre as características quantitativas e genótipos individuais de genes candidatos não representa uma confirmação de que o gene candidato tem um envolvimento direto com o fenótipo de interesse, mas o loco candidato pode simplesmente estar posicionado em uma estreita ligação física com o loco “real” que influencia o fenótipo em questão (BEUZEN; STEAR; CHANG, 2000).

4.2.6. Associação dos Haplótipos SNPs com as Características Fenotípicas

Os haplótipos desempenham um papel importante em estudos de associação e proporcionam uma visão que permite identificar os fatores que influenciam a dependência entre os SNPs (LIU; ZHANG; ZHAO, 2008).

Na análise em que se estudaram os efeitos dos haplótipos sem considerar o tratamento tampouco o sexo dos indivíduos, não foi verificado efeito estatístico dos haplótipos nas características fenotípicas estudadas ($P > 0,01$).

A análise de associação dos possíveis efeitos dos haplótipos dentro das densidades indicou que o haplótipo H7 (TCTCCGAGACTT) apresenta efeito significativo sobre alguns fenótipos na densidade 200 ($P \leq 0,01$) (Tabela 11) ao passo que o H10 (TCTTCGAGACTT) apresentou efeito significativo somente para a densidade 40 ($P \leq 0,01$) (Tabela 12).

Tabela 11 - Efeito do haplótipo H7 sobre as características fenotípicas (média \pm erro padrão) de *M. amazonicum* cultivados na densidade de estocagem 200.m⁻².

Caracter	Médias dos Haplótipos		Efeito Estatístico por cópia H10 adicionada
	H7 = 0	H7 = 1	
C _T (cm)	5,77 \pm 0,07a	5,57 \pm 0,13b	-0,3218
C _{ABD} (cm)	3,19 \pm 0,04a	3,10 \pm 0,08b	-0,1653
P _{INT} (g)	1,32 \pm 0,07a	1,24 \pm 0,11b	-0,1825
P _{ABD} (g)	0,82 \pm 0,04a	0,77 \pm 0,06b	-0,0956
P _{HEP} (g)	0,058 \pm 0,003a	0,058 \pm 0,006a	-0,0046
RC (%)	63,22 \pm 0,73a	63,51 \pm 1,17a	1,1668
IHS (%)	4,56 \pm 0,22a	4,66 \pm 0,23a	0,0654

C_T, comprimento total; C_{ABD}, comprimento abdominal; P_{INT}, peso inteiro; P_{ABD}, peso abdominal; P_{HEP}, peso do hepatopâncreas; RC, rendimento corporal; IHS, índice hepatossomático.

Tabela 12 - Efeito do haplótipo H10 sobre as características fenotípicas (média \pm erro padrão) de *M. amazonicum* cultivados na densidade de estocagem 40.m⁻².

Caracter	Médias dos Haplótipos		Efeito Estatístico por cópia H10 adicionada
	H10 = 0	H10 = 1	
C _T (cm)	6,42 \pm 0,06b	6,87 \pm 0,23a	0,4386
C _{ABD} (cm)	3,44 \pm 0,03b	3,70 \pm 0,13a	0,2561
P _{INT} (g)	1,80 \pm 0,06b	2,32 \pm 0,35a	0,4921
P _{ABD} (g)	0,984 \pm 0,03b	1,26 \pm 0,19a	0,2349
P _{HEP} (g)	0,063 \pm 0,00b	0,104 \pm 0,02a	0,0360
RC (%)	54,98 \pm 0,63a	53,01 \pm 2,02a	-1,8215
IHS (%)	3,42 \pm 0,11a	4,06 \pm 0,33a	0,5798

C_T, comprimento total; C_{ABD}, comprimento abdominal; P_{INT}, peso inteiro; P_{ABD}, peso abdominal; P_{HEP}, peso do hepatopâncreas; RC, rendimento corporal; IHS, índice hepatossomático.

As análises de comparações múltiplas envolvendo o fator densidade mostram que os indivíduos que apresentam o haplótipo H10 crescem mais do que aqueles indivíduos com os demais haplótipos, sobretudo o haplótipo H7. O polimorfismo envolvido na reconstrução destes dois haplótipos corresponde ao SNP C256T. Isto pode explicar o fato do efeito dos haplótipos H7 (alelo C para o SNP C256T) e H10 (alelo T para o SNP C256T) serem inversos. Retomando análise de associação dos locos simples, foi verificado que o alelo T deste SNP promove o aumento da média para as variáveis C_{ABD}, P_{INT} e P_{HEP} na densidade 40. O efeito positivo deste SNP corrobora o efeito positivo do haplótipo H10 sobre as características C_T, C_{ABD}, P_{INT}, P_{ABD} e P_{HEP}.

Considerando que o haplótipo H4 é o haplótipo consenso (sequência idêntica à sequência descrita e depositada no *GenBank*), observou-se que tanto no haplótipo H7 quanto no H10, há a substituição na posição correspondente ao SNP A757G. Embora, quando analisado individualmente, este SNP não tenha apresentado efeito significativo sobre os fenótipos estudados no camarão-da-amazônia, ele deve ser levado em consideração quando da utilização de haplótipos como um critério de seleção genética para a espécie.

Ainda, ao contrastarmos os dados do efeito do haplótipo H10 e a sua frequência em cada uma das densidades testadas, verificamos que o haplótipo H10 é mais frequente na densidade 40. Este evento poderia auxiliar a explicar a associação deste haplótipo com o maior crescimento dos animais submetidos a esta densidade de estocagem.

Ao analisar a interação dos haplótipos com os morfotipos, novamente foi verificado efeito negativo do haplótipo H7 (Tabela 13). Contudo, neste caso o efeito se mostrou acentuado na expressão quantitativa das características C_T e P_{ABD} tanto das fêmeas como dos machos TC ($P \leq 0,01$). Valores de significância com menor rigor estatístico foram verificados para as características C_{ABD} e P_{INT} ($P \leq 0,05$).

Tabela 13 - Efeito do haplótipo H7 sobre as características fenotípicas de fêmeas e machos de *M. amazonicum*.

Caracter	Médias dos Haplótipos		Efeito Estatístico por cópia H7 adicionada
	H7 = 0	H7 = 1	
C_T (cm)	6,09 ± 0,06a	5,88 ± 0,09b	-0,2105
C_{ABD} (cm)	3,32 ± 0,03a	3,20 ± 0,05b	-0,1124
P_{INT} (g)	1,52 ± 0,05a	1,38 ± 0,06b	-0,1569
P_{ABD} (g)	0,89 ± 0,03a	0,79 ± 0,03b	-0,1066
P_{HEP} (g)	0,058 ± 0,00a	0,057 ± 0,01b	-0,0027
RC (%)	59,16 ± 0,75a	58,44 ± 1,09a	-0,8222
IHS (%)	3,97 ± 0,18a	4,13 ± 0,18a	0,0927

C_T , comprimento total; C_{ABD} , comprimento abdominal; P_{INT} , peso inteiro; P_{ABD} , peso abdominal; P_{HEP} , peso do hepatopâncreas; RC, rendimento corporal; IHS, índice hepatossomático.

Considerando o efeito negativo do haplótipo H7 e que este é o haplótipo mais frequente na população, pode-se sugerir que seja realizada a seleção negativa quanto à presença do mesmo na população, independentemente da densidade de estocagem ou grupo demográfico testados no presente trabalho. Espera-se que a redução da frequência deste haplótipo na população cause um aumento na média de crescimento das gerações futuras. Contudo, ressalta-se que o resultado deste trabalho é preliminar e pesquisas mais aprofundadas são necessárias para validar as associações SNP-característica e/ou haplótipo-característica em grandes populações independentes.

As análises de haplótipos tornam-se mais significativas quando se sabe a fase de ligação e quando monitoramos a transmissão destes haplótipos de uma geração para outra, porém não é o caso do presente estudo. De qualquer forma, os resultados aqui revelados são de grande relevância e interesse para este tipo de análise.

Os efeitos dos SNPs C256T e T907 e os haplótipos H7 e H10 podem servir como o primeiro passo para a implementação de estratégias de seleção assistida por marcadores (MAS) para aumentar a produtividade e tem potencial de aplicação futura no melhoramento genético do camarão-da-amazônia. Entretanto, a associação estatística entre os haplótipos e as características de crescimento não significa que o gene da HSC70 tem um envolvimento direto (pode possuir efeito de ligação com outros genes que influenciam diretamente a característica) nas características de crescimento, mas eles podem ser úteis para uma melhor compreensão do desempenho de crescimento em *M. amazonicum*.

O desenvolvimento de linhagens de alto desempenho é um programa muito complexo e necessita de uma investigação mais aprofundada e validação dos resultados observados no presente trabalho. É necessário, portanto, confirmar muitos detalhes fundamentais antes que os SNPs possam contribuir efetivamente com programas de MAS para o melhoramento genético de *M. amazonicum*. Dessa maneira, para validar as associações, mais estudos devem ser repetidos em grandes populações independentes provenientes de vários ambientes. Sobretudo, os mecanismos moleculares subjacentes à associação entre as mutações e as características de crescimento também devem ser investigados por meio da quantificação das transcrições gênicas nos indivíduos de extremo desempenho. Além disso, o objetivo de seleção em *M. amazonicum*, assim como em outras espécies, deverá incluir várias características simultaneamente. Então, mais traços tais como qualidade de carne e resistência a doenças, devem ser considerados no futuro. Estes estudos poderão investigar se os SNPs envolvidos nas características de crescimento poderiam estar envolvidos em outras características de interesse econômico.

**DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO
CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA (*Macrobrachium amazonicum*) BASEADA
EM SNPs NO GENE DA HSC70**

4.3. Diversidade e Estruturação Genética de Populações do Camarão-da-Amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) Baseada em SNPs no Gene da HSC70

4.3.1. Caracterização da Diversidade Genética

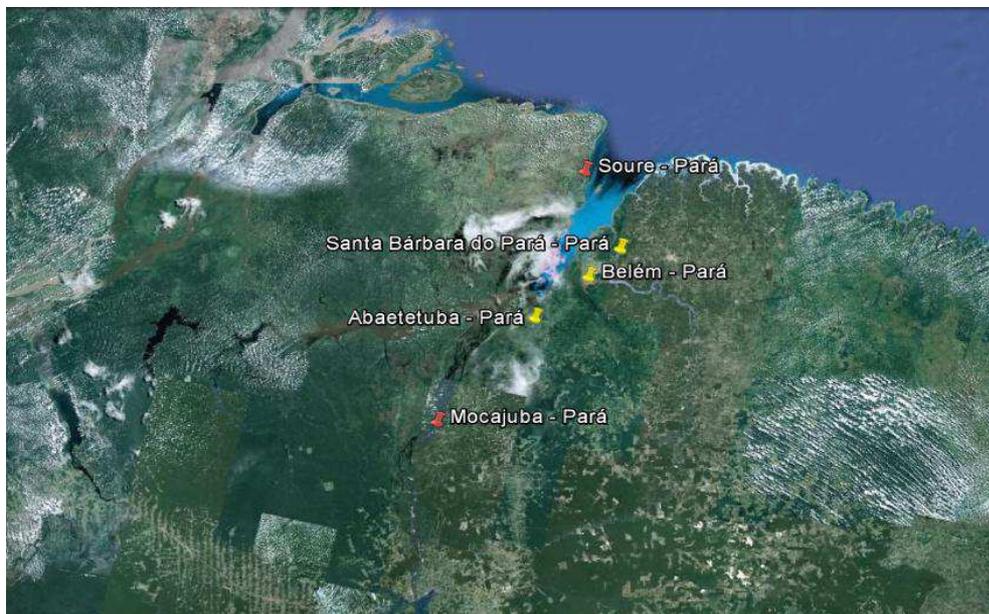
4.3.1.1. Análise de locos simples

No total foram analisados 1128 sítios nucleotídicos da região codificante do gene da HSC70 em duas populações nativas de camarões-da-amazônia. Nas sequências das duas populações, foram identificados 20 SNPs sinônimos representados por 22 mutações, uma vez que dois destes SNPs são sítios polimórficos com mais de duas variantes alélicas (sítios C313A/T e A856C/G). Treze destes sítios variáveis são classificados como parcimoniosamente informativos, pois o polimorfismo ocorre mais de uma vez em cada uma das populações. Contudo, cinco sítios não informativos (*singletons*) para ambas as populações também foram considerados para todas as análises genéticas, totalizando 18 SNPs para a população do rio Tocantins e nove para a população do rio Paracauari. Sete SNPs (T43C, T196C, C256T, G466A, G673A, A757G e A856C/G) são compartilhados entre as populações. Somente os SNPs T217C e T766C são exclusivos da população do rio Paracauari. Na Tabela 14 estão demonstrados cada um dos SNPs (informativos e não informativos) em ambas as populações de camarão-da-amazônia.

Retomando a prospecção de SNPs realizada no tópico 4.1.2 desta tese e o compartilhamento de polimorfismos entre as populações, verifica-se que os SNPs compartilhados entre as populações dos rios Tocantins e Paracauari, com exceção dos SNPs T196C e G673A, também estão presentes na população experimental do CAUNESP. Este compartilhamento de alelos pode ser indício de um polimorfismo ancestral, mantido nas populações estudadas. É importante retomar que a população experimental do CAUNESP foi fundada a partir de reprodutores coletados no Furo das Marinhas, Mosqueiro-PA (VALENTI, comunicação pessoal). Localidade esta situada geograficamente próxima aos pontos de coletas analisados no presente estudo. Logo, o compartilhamento dos alelos das populações naturais com a população experimental se deve ao efeito fundador nesta última.

A origem ancestral comum das populações costeiras do Pará foi recentemente evidenciada por Vergamini, Pileggi; Mantelatto (2011). Os autores mostraram por análises filogenéticas e de distância (sequências COI – citocromo oxidase I) que uma população ancestral originou a população continental de *M. amazonicum* da Amazônia e outra população ancestral deu origem tanto às populações continentais do Paraná/Paraguai como às populações costeiras do norte e nordeste do Brasil (Figura 26).

Figura 26 - Mapa indicando as populações de *M. amazonicum* já estudadas molecularmente.



Marcadores vermelhos: localidades do Pará (Mocajuba, rio Tocantins e Soure, rio Paracauari) estudados no presente trabalho; Marcadores amarelos: três localidades do estado do Pará (Abaetetuba, Belém e Santa Bárbara do Pará), as quais fazem parte do sistema hidrográfico Tocantins-Araguaia, estudados por Vergamini; Pileggi; Mantelatto (2011).

Como citado anteriormente, existe a ocorrência de dois SNPs trialélicos (C313A/T e A856C/G), cuja forma foi verificada somente na população do rio Tocantins. A frequência de SNPs trialélicos nesta população poderia ser explicada pela seleção natural ou *hotspots* mutacionais. Hodgkinson e Walker (2010), averiguando a ocorrência de SNPs trialélicos no genoma humano, propõem que uma nova mutação pode induzir outra mutação tanto em um mesmo indivíduo como subsequentemente durante a recombinação.

As frequências dos alelos polimórficos (Tabela 14) variaram de 1,1% a 27,7% na população do rio Tocantins e de 1,7% a 21,7% na população do rio Paracauari. Em ambas as

populações a frequência da variante do SNP A757G foi a mais alta. As frequências mínimas observadas para a validação dos SNPs estão de acordo com Brookes (1999) e Vignal et al. (2002). O alelo polimórfico do SNP C256T apresentou-se com uma frequência superior a 5% nas duas populações naturais (Tabela 14). Este alelo também está presente na população experimental do CAUNESP (frequência em 5,2%) e apresentou efeito positivo sobre características de *fitness*. Considerando unicamente a origem comum deste alelo, haja vista que o estoque do CAUNESP foi fundado a partir de uma população do Pará (VALENTI, comunicação pessoal) e que as populações desta região possuem um ancestral comum (VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011), poderia se extrapolar a informação do efeito deste SNP também nestas populações naturais.

Tabela 14 - Descrição dos SNPs (parcimoniosamente informativos e não informativos) identificados, variantes alélicas e frequências alélicas em duas populações de *M. amazonicum*.

SNP	Classificação	Alelo	Frequência alélica	
			Rio Tocantins	Rio Paracauari
Parcimoniosamente informativos				
T43C	transição	T	0,979	0,983
		C	0,021	0,017
T220G	transversão	T	0,979	---
		G	0,021	---
C256T	transição	C	0,915	0,950
		T	0,085	0,050
T304C	transição	T	0,979	---
		C	0,021	---
C313A/T	transversão/transição	C	0,968	---
		A	0,011	---
		T	0,021	---
G466A	transição	G	0,872	0,850
		A	0,128	0,150
A484G	transição	A	0,979	---
		G	0,021	---
T646C	transição	T	0,926	---
		C	0,074	---
G673A	transição	G	0,979	0,967
		A	0,021	0,033
T688C	transição	T	0,979	---
		C	0,021	---
A757G	transição	A	0,723	0,783

A856C/G	transversão/transição	G	0,277	0,217
		A	0,979	0,983
		C	0,011	0,017
T997C	transição	G	0,011	---
		T	0,979	---
		C	0,021	---
<i>SNPs informativos por população</i>			13	6
Não informativos				
A85T	transversão	A	0,989	---
		T	0,011	---
T196C	transição	T	0,989	0,983
		C	0,011	0,017
T217C	transição	T	---	0,983
		C	---	0,017
T247C	transição	T	0,989	---
		C	0,011	---
T658C	transição	T	0,989	---
		C	0,011	---
T766C	transição	T	---	0,983
		C	---	0,017
T781C	transição	T	0,989	---
		C	0,011	---
<i>SNPs não informativos por população</i>			5	3
<i>SNPs por população</i>			18	9

Os valores de heterozigidade observada e esperada (Tabela 15) variaram, respectivamente, de 0,000 a 0,468 e de 0,021 a 0,400 na população do rio Tocantins e de 0,033 a 0,367 e de 0,033 a 0,339 na população do rio Paracauari. A heterozigidade esperada média foi de 0,073 e 0,047 para as populações dos rios Tocantins e Paracauari, respectivamente. Os valores de heterozigidade são baixos provavelmente devido ao caráter bi-aliélico de alguns locos e a baixa densidade dos marcadores SNPs utilizados neste trabalho. Desse modo, estas medidas não parecem ser adequadas para a inferência da variabilidade genética. Mais adiante, esta abordagem será retomada na análise da diversidade haplotípica.

Conforme teste de desvios do EHW (Tabela 15), todos os locos SNPs utilizados para as análises genéticas não se apresentam em desequilíbrio nas duas populações ($0,004 < \alpha < 0,05$,

após correção sequencial de Bonferroni). Desequilíbrio de ligação foi verificado para nove pares de locos SNPs na população do rio Tocantins (C256T e C313A/T; T43C e T658C; A484G e T658C; T196C e G673A; C256T e G673A; T658C e G673A; T220G e T688C; C256T e A757G; G466A e T997C) e quatro pares na população do rio Paracauari (T196C e A757G; C256T e A757G; G673A e A757G e T43C e A856C/G). Para que ocorra o desequilíbrio de ligação, não é necessário apenas que os locos estejam fisicamente ligados, pois, o desequilíbrio de ligação ocorre quando há um desvio na frequência observada da combinação entre os alelos do par de locos analisado, em relação à frequência esperada. Vários fatores podem causar este desvio, incluindo mutação, acasalamento preferencial, tamanho populacional finito, fluxo gênico e seleção natural (TEMPLETON, 2011).

Os valores de F_{IS} não foram significativos ($F_{IS} = -0,0025$, para a população do rio Tocantins e $F_{IS}=0,000$, para a população do rio Paracauari) (Tabela 15), corroborando a ausência de desvios do EHW, sugerindo ausência de endocruzamento nas duas populações de *M. amazonicum*.

Tabela 15 - Índices de diversidade genética para cada um dos 20 SNPs identificados no gene da HSC70 de duas populações nativas de *M. amazonicum*.

SNP	Na	Ne	Ho	He	EHW	F _{IS}	pL	pS
rio Tocantins (n=47)								
C43T	2,000	1,043	0,043	0,042	1,000	-0,011	1,000	0,996
A85T	2,000	1,022	0,021	0,021	s.i.	0,000	1,000	1,000
T196C	2,000	1,022	0,021	0,021	s.i.	0,000	1,000	1,000
T220G	2,000	1,043	0,043	0,042	1,000	-0,011	1,000	0,990
T247C	2,000	1,022	0,021	0,021	s.i.	0,000	1,000	1,000
C256T	2,000	1,184	0,170	0,156	1,000	-0,082	1,000	0,714
T304C	2,000	1,043	0,000	0,042	0,011	1,000	0,011	1,000
C313A/T	3,000	1,066	0,064	0,062	1,000	-0,015	1,000	0,978
G466A	2,000	1,287	0,213	0,223	0,554	0,055	0,581	0,836
A484G	2,000	1,043	0,043	0,042	1,000	-0,011	1,000	0,990
T646C	2,000	1,160	0,149	0,138	1,000	-0,070	1,000	0,819
T658C	2,000	1,022	0,021	0,021	s.i.	0,000	1,000	1,000
G673A	2,000	1,043	0,043	0,042	1,000	-0,011	1,000	0,986
T688C	2,000	1,043	0,043	0,042	1,000	-0,011	1,000	0,989
A757G	2,000	1,667	0,468	0,400	0,935	-0,159	0,938	0,246
T781C	2,000	1,022	0,021	0,021	s.i.	0,000	1,000	1,000
A856C/G	3,000	1,044	0,043	0,042	1,000	-0,005	1,000	0,991
T997C	2,000	1,043	0,043	0,042	1,000	-0,011	1,000	0,996
Média	1,900	0,991	0,141	0,073	---	-0,025	0,7913	0,420
rio Paracauari (n=30)								
C43T	2,000	1,034	0,033	0,033	s.i.	0,000	1,000	1,000
T196C	2,000	1,034	0,033	0,033	s.i.	0,000	1,000	1,000
T217C	2,000	1,034	0,033	0,033	s.i.	0,000	1,000	1,000
C256T	2,000	1,105	0,100	0,095	1,000	-0,036	1,000	0,961
G466A	2,000	1,342	0,233	0,255	0,506	0,102	0,525	0,888
G673A	2,000	1,069	0,067	0,064	1,000	-0,018	1,000	0,976
A757G	2,000	1,514	0,367	0,339	0,809	-0,063	0,821	0,620
T766C	2,000	1,034	0,033	0,033	s.i.	0,000	1,000	1,000
A856C/G	2,000	1,034	0,033	0,033	s.i.	0,000	1,000	1,000
Média	0,900	0,510	0,086	0,047	---	0,000	0,633	0,683

Na, número de alelos; Ne, número de alelos efetivos; He, heterozigosidade esperada; Ho, heterozigosidade observada; EHW, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $0,004 < \alpha < 0,05$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); F_{IS}, coeficiente de endocruzamento; pL, valores de probabilidade para o déficit de heterozigotos; pS, valores de probabilidade para o excesso de heterozigotos. s.i., sem informação, pois estão representados por uma única cópia do alelo variante do SNP em um único indivíduo heterozigótico (locos SNP não considerados para correção sequencial de Bonferroni).

4.3.1.2. Análise dos haplótipos

Anteriormente à reconstrução dos haplótipos, foram realizados testes para verificar a presença de eventos de recombinação entre os sítios SNPs. Nenhum dos algoritmos testados indicou recombinação (GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq).

Com o método de inferência Bayesiana utilizado para a reconstrução dos haplótipos e sob a consideração dos valores de probabilidade para cada par de haplótipo superiores a 70%, identificou-se 12 haplótipos no total, sendo 10 haplótipos para a população do rio Tocantins e cinco para a população do rio Paracauari (Tabela 16). Dentre estes, três (H1, H2, H7) são compartilhados entre as populações. Somente os haplótipos H11 e H12 são exclusivos da população do rio Paracauari, sendo os restantes, exclusivos da população do rio Tocantins. É importante destacar que somente 11 sítios variáveis constituem os haplótipos reconstruídos (Tabela 16), pois na consideração dos valores de probabilidade >70% na reconstrução dos haplótipos, os SNPs T43C e A484G acabaram por ser desconsiderados.

Analisando-se a variação existente nas populações, verificou-se que a diversidade haplotípica total (H_d) das populações foi igual a 0,677. A diversidade de haplótipos para a população do rio Tocantins foi igual a 0,712 e para a população do rio Paracauari foi igual a 0,596. Esta diversidade de haplótipos é alta e significativamente diferente ($p < 0,05$) entre as populações.

Com relação aos valores de diversidade nucleotídica (π), encontrou-se $\pi=0,00092$, $\pi=0,00071$ e $\pi=0,00085$, para a população do rio Tocantins, do rio Paracauari e total, respectivamente. A diversidade nucleotídica é significativamente maior na população do rio Tocantins ($P \leq 0,05$).

Embora as populações de camarão-da-amazônia tenham se apresentado com alta variabilidade genética, verificou-se que a população do rio Paracauari apresentou menor variação haplotípica. Esta redução da variação genética no rio Paracauari pode ter uma origem histórica relacionada a efeito de fundador desta população, mas também, pode ser consequência do alto nível de degradação dos recursos deste rio, quer seja em função da poluição (principalmente pela falta de sistemas adequados de emissão de esgoto e a presença de um cemitério, um matadouro e um curtume às margens do rio) ou pela intensa pesca extrativista praticada na região.

Tabela 16 - Haplótipos, sítios variáveis e frequência relativa dos respectivos haplótipos detectados em duas populações naturais de *M. amazonicum*.

Haplótipo	Sítios variáveis											Frequência haplotípica	
	220	256	304	313	466	646	673	688	757	856	997	rio Tocantins	rio Paracauari
H1	T	C	T	C	G	T	G	T	G	A	T	0,236	0,158
H2	T	C	T	C	G	T	G	T	A	A	T	0,472	0,605
H3	T	C	T	C	G	T	G	T	A	C	T	0,014	---
H4	G	C	T	C	G	T	G	C	A	A	T	0,028	---
H5	T	C	T	C	G	C	G	T	A	A	T	0,097	---
H6	T	C	T	A	G	T	G	T	A	A	T	0,014	---
H7	T	C	T	C	G	A	G	T	A	A	T	0,083	0,158
H8	T	C	T	C	A	T	G	T	A	A	C	0,014	---
H9	T	C	C	C	G	T	G	T	A	A	T	0,028	---
H10	T	T	T	T	G	T	G	T	G	A	T	0,014	---
H11	T	C	T	C	G	T	A	T	G	A	T	---	0,026
H12	T	T	T	C	G	T	G	T	G	A	T	---	0,053

Nas populações costeiras do estado do Pará estudadas por Vergamini, Pileggi e Mantelatto (2011) encontrou-se valores semelhantes de diversidade haplotípica (total de 13 haplótipos) e nucleotídica para as sequências do gene mitocondrial COI. Os autores verificaram valores de $H_d = 0,43$, $H_d = 0,61$ e $H_d = 0,67$ para os espécies de Abaetetuba, Santa Bárbara do Pará e Belém, respectivamente. Os valores de π variaram de 0,00075 a 0,00163. Esta comparação permite sugerir que a análise de um fragmento da sequência do gene da HSC70, pode fornecer informações relevantes em estudos de variabilidade e estruturação genética de populações de *M. amazonicum*.

Segundo Li et al. (2008) a variação alélica em sítios SNPs em genes codificadores de proteínas nucleares são promissores marcadores genéticos de populações para uma grande variedade de organismos. As substituições silenciosas em regiões de genes nucleares (geralmente em posições terceiro códon) são marcadores genéticos particularmente úteis para espécies de alto fluxo de genes (UNAL; BUCKLIN, 2011). Variações em tais sítios são muito comuns porque eles são seletivamente neutros (UNAL, 2011). Unal e Bucklin (2011) analisaram SNPs em três genes diferentes (aproximadamente 2000 pb, incluindo o gene da HSP70) e identificaram 24 SNPs com padrões de variação vantajosos para resolver os baixos níveis de diferenciação genética de *Calanus finmarchicus* em toda uma gama de escalas espaciais.

A diversidade genética, expressa dentro e entre populações, reflete a melhoria da adaptação da espécie a um determinado ambiente, e também permite expandir as fronteiras de colonização e de distribuição, possibilitando a sua sobrevivência em uma ampla variedade de condições ambientais (MA; FENG; LI, 2012). Assim, altos valores de variabilidade genética entre populações de uma determinada espécie podem estar relacionados à sua versatilidade ecológica (WALKER, 1992) como parece ser o caso de *M. amazonicum*. O *M. amazonicum* tolera uma vasta gama de variação das principais características físicas e químicas da água. A literatura mostra que o camarão-da-amazônia pode existir em águas que variam temperaturas entre 20°C (BIALETZKI et al., 1997) e 32,5°C (MORAES-RIODADES; KIMPARA; VALENTI, 2006), oxigênio dissolvido em água entre 1,7 e 13,2 mg.L⁻¹ de (MORAES-RIODADES; KIMPARA; VALENTI, 2006) e acidez com pH entre 5,0 (MONTOYA, 2003) e 9,6 (MORAES-RIODADES; KIMPARA; VALENTI, 2006). Os valores destas variáveis podem diferir consideravelmente entre larvas, juvenis e adultos, e entre machos e fêmeas da espécie (DAOUD et al., 2007). Além disso, para Maciel e Valenti (2009) os limites de tolerância para os fatores ecológicos são população-específicas e pode variar em indivíduos de uma espécie que habita locais diferentes. No entanto, parece que o *M. amazonicum* tem uma elevada tolerância intrapopulacional para variáveis ambientais.

Estes aspectos reiteram importância do conhecimento molecular das adaptações e modificações em resposta às variáveis ambientais para o entendimento da biologia, distribuição e capacidade de *M. amazonicum* para se adaptar a diferentes condições e regiões geográficas. Além disso, pelo fato das HSP70's serem proteínas que apresentam relação íntima com os fatores de estresse e adaptação, o estudo de seus genes se torna de fundamental interesse em espécies com grande plasticidade ecológica, como o *M. amazonicum*.

4.3.2. Caracterização da Estruturação Genética

Nesta etapa do presente trabalho, os padrões de variação na frequência genotípica e haplotípica do gene da HSC70 foram utilizados para estimar a estruturação genética de duas populações de camarão-da-amazônia. O estudo dessa estruturação pode contribuir para o entendimento dos processos de diferenciação populacional e especiação, assim como para o

estabelecimento de estratégias de manejo e conservação da biodiversidade (McMILLEN-JACKSON; BERT, 2004).

A análise de variação molecular (Tabela 17) utilizando os haplótipos construídos a partir de 20 locos polimórficos de parte do referido gene indicou que toda a variação genética observada no camarão-da-amazônia está presente dentro das populações (100,05% dentro das populações e -0,05% entre as populações). A diferenciação entre as populações, avaliada pelo índice de fixação indicou valores de F_{ST} igual a -0,00048. Em análises do índice de fixação F_{ST} , valores negativos indicam que há mais variação intrapopulacional do que interpopulacional nessas localidades (HABIB et al., 2011). Assim, os valores negativos devem ser interpretados como zero, ou seja, ausência de diferenciação genética entre as populações (SI et al., 2012; HIDER et al., 2013), em que há, portanto, um intenso fluxo gênico entre as populações.

Tabela 17 - Análise da Variância Molecular em duas populações nativas de *M. amazonicum*.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da Variância	Varição (%)	P-valor
interpopulacional	1	0,467	0,00023 Va	-0,05	0,362+-0,015
intrapopulacional	108	51,133	0,47859 Vb	100,05	
Total	109	51,721	0,47827	100	

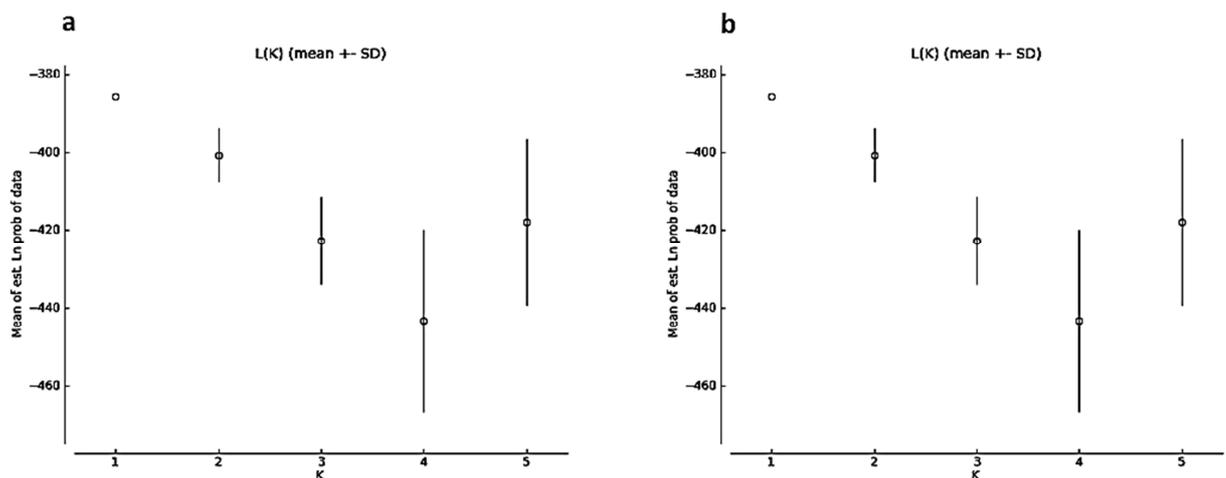
GL, grau de liberdade; SQ, soma dos quadrados.

O software Structure 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) também foi usado para investigar estruturação populacional, a partir de uma inferência Bayesiana. O modelo do *Structure* pressupõe que os locos são independentes dentro das populações. Esta suposição é susceptível de ser violado para os dados de sequência, dados de regiões como cromossomo Y ou mtDNA não recombinante (PRITCHARD; WENA; FALUSH, 2010). No presente estudo, encontraram-se valores significantes de desequilíbrio de ligação entre alguns pares de locos. Apesar destes dados não se enquadrarem bem ao modelo, os autores afirmam que o *Structure* pode ser executado razoavelmente bem. Sendo assim, considerando que a presença de locos em desequilíbrio de ligação é uma possível fonte de erro para as análises, decidiu-se utilizar duas abordagens: (1) análise de agrupamento utilizando os 11 locos SNPs como locos independentes; (2) análise de agrupamento utilizando os todos os 11 locos SNPs como loco simples ou haplótipos (PRITCHARD; WENA; FALUSH, 2009; UNAL; BUCKLIN, 2011).

Na primeira abordagem, a análise Bayesiana que considera todos os genótipos sem informação de origem dos mesmos determinou a presença de apenas uma população ($K = 1$) de *M. amazonicum* (Figura 27 a). Não foi realizada a correção de Evanno, Regnaut e Goudet (2005) porque foi apontada somente uma população. Esta correção elimina os dois valores de K extremos da análise, no caso $K=1$ e $K=5$. Sendo assim, esta correção não é adequada aos nossos dados.

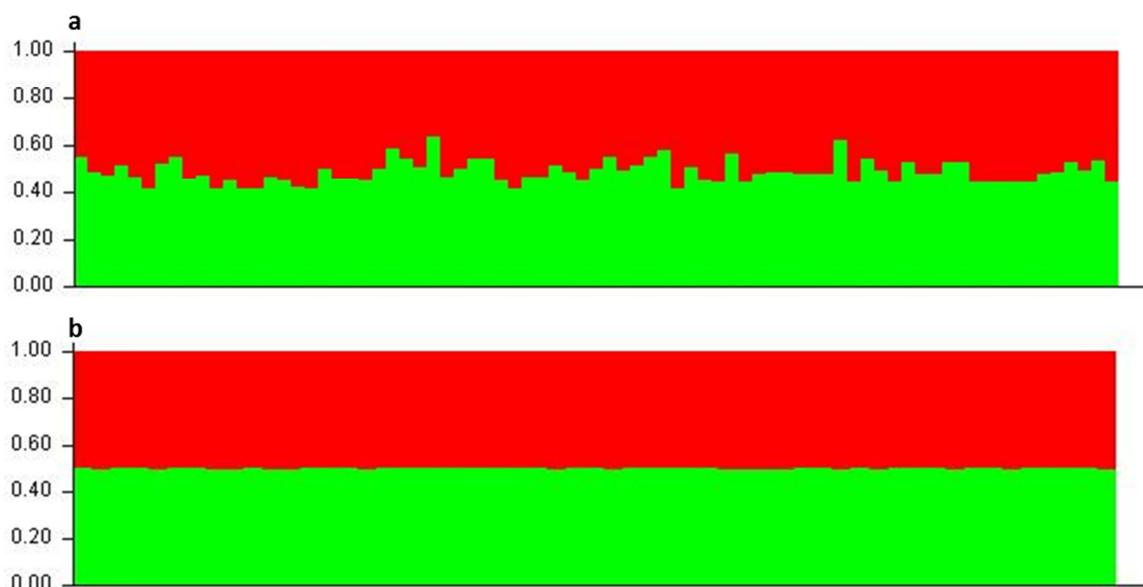
Na segunda abordagem, a mesma análise também determinou $K = 1$ (Figura 27 b). Em ambas análises, o teste de atribuição dos indivíduos mostra que todos os indivíduos possuem probabilidade semelhante de pertencer a qualquer uma das populações (Figura 28 a e b), sugerindo que se trata de uma população única de camarão-da-amazônia. Estas duas abordagens confirmam a baixa diferenciação genética entre as duas populações encontrada a partir da AMOVA e do F_{ST} . Entretanto, a aplicação prática desta informação no manejo dos recursos genéticos destas populações, se necessário, deve ser cautelosa, uma vez que no presente estudo analisou-se um fragmento nucleotídico de apenas um gene.

Figura 27 - Estimativa do número de populações de *M. amazonicum* determinadas pelo programa *Structure*.



(a) K determinado de acordo com o cálculo de $\ln(P(X|K))$ (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) na análise de agrupamento utilizando os 11 locos SNPs como locos independentes; (b) correspondem aos mesmos cálculos citados, porém abordando todos os SNPs como haplótipos.

Figura 28 - Resultado dos testes de atribuição de indivíduos de duas populações de *Macrobrachium amazonicum*, gerados pelo programa *Structure*.



(a) O gráfico representa as populações não estruturadas com $K = 2$, obtido pela análise de agrupamento utilizando os 11 locos SNPs como locos independentes. (b) O gráfico representa as populações não estruturadas com $K = 2$, obtido pela análise de agrupamento utilizando os todos os 11 locos SNPs como loco simples ou haplótipos.

A extensão do fluxo gênico pode variar consideravelmente entre as espécies, sendo ela um resultado das características de história de vida das mesmas (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002; SLATKIN, 1985). O nível de estruturação intraespecífico, contudo, é negativamente correlacionado com a capacidade de dispersão da espécie (BAY et al., 2004). Assim, é esperado que espécies que distribuem seus gametas ou zigotos através de correntes de água (por exemplo, algumas larvas de camarões de água doce) tendam a exibir menor estruturação populacional devido à alta taxa de fluxo gênico quando comparadas com espécies sésseis que não possuem fase pelágica (JENKINS et al., 2007). Como resultado, espécies aquáticas com longas fases larvais marinhas são sempre consideradas a dispersar por grandes distâncias, tendo uma ampla distribuição geográfica, alta taxa de fluxo gênico, maiores níveis de variação intraespecífica e, conseqüentemente, menores níveis de diferenciação entre as populações (BOHONAK; JENKINS, 2003; FERAL, 2002).

A ausência de estruturação genética constatada entre as populações de camarão-da-amazônia das duas localidades estudadas no presente trabalho, se analisadas em uma escala ampla, diverge de outros poucos relatos encontrados na literatura. Peixoto (2002, dados não

publicados) evidenciou, com o marcador mitocondrial COI, que populações provenientes das bacias continentais de Goiânia (GO), de Santarém (PA) e de bacias costeiras do Pará se constituem em três grupos distintos por não apresentarem fluxo gênico entre si. Da mesma forma, Vergamini; Pileggi; Mantelatto (2011), caracterizando molecularmente (marcadores 16S rRNA e COI) populações continentais e costeiras de *M. amazonicum* de todo o Brasil, identificaram divergência genética significativa entre as populações. Esta divergência estruturou as populações brasileiras em três grupos: (1) continental da Amazônia; (2) bacias do Paraná e Paraguai (Mato Grosso do Sul); e (3) sistemas costeiros do norte e nordeste (Amapá, Pará e Ceará). Em ambos os trabalhos citados, a estruturação ocorreu a partir da comparação entre populações oriundas de sistemas hidrogeográficos diferentes e foi atribuída ao isolamento geográfico existente entre estas populações, o que impede a dispersão e conectividade entre elas (VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011). O agrupamento das populações dos sistemas costeiros do norte/nordeste brasileiro (VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011) abre margens a uma comparação em escala local (Figura 26), mais apropriada ao presente estudo. Em escala local, nossos resultados concordam com os achados por Vergamini, Pileggi e Mantelatto (2011). Visto que as populações aqui analisadas alocam-se em diferentes bacias hidrográficas (bacias do Tocantins-Araguaia e do Marajó Oriental), porém sob uma pequena distância geográfica (aproximadamente 250 km) e sem isolamento geográfico, nossos resultados (ausência de estruturação genética) apresentam significado biológico plausível.

Diferentemente de nosso estudo, a existência de estruturação genética foi previamente reportada para diferentes populações de *M. nipponense*, *Macrobrachium australiense* e *Macrobrachium tolmerus* (MA; FENG; LI, 2012; SHARMA; HUGHES, 2009). É possível que a diferenciação genética observada entre populações de *M. nipponense* e *M. australiense* esteja relacionada à sua limitada capacidade de movimentação (FENG et al., 2008; SHARMA; HUGHES, 2009), pois os adultos só se movem a curtas distâncias e agarram-se às ervas daninhas ou outros objetos debaixo d'água a maior parte do tempo devido à fraca capacidade de natação (FENG et al, 2008). Além disso, a maior sensibilidade à elevada salinidade que o *M. australiense* apresenta, favorece a menor dispersão da espécie, e conseqüentemente, a estruturação destas populações (SHARMA; HUGHES, 2009). Estes argumentos, contudo, a princípio não podem ser extrapolados ao *M. amazonicum*, uma vez que

esta espécie se apresenta tolerante a uma ampla variação das condições ambientais (por exemplo, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido em água e pH), o que pode permitir sua grande capacidade de dispersão e colonização.

As populações aqui analisadas demonstraram grande variabilidade genética e um cenário com provável ausência de estruturação genética. No entanto, a ausência de diferenciação deve ser considerada com cautela, ao passo que uma conclusão equivocada pode implicar em um mau gerenciamento de planos de manejo, uma vez que toda a área de distribuição de uma espécie pode ser considerada como uma única grande população. Deste modo, sugere-se que a hipótese de ausência de estruturação deva ser aceita somente quando realizado um estudo ao longo de vários anos, com grande esforço amostral e grande número de locos/genes analisados, pois somente assim tem-se uma visão mais ampla da diversidade genética da espécie como um todo.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados na presente tese, conclui-se que:

(1) A utilização de *primers* desenhados baseados na sequência-referência do gene da HSC70 da espécie congênica *M. rosengerbii* foi satisfatória para a amplificação e sequenciamento de 1128 pb do referido gene da espécie-alvo deste estudo, o *M. amazonicum*;

(2) O fragmento do gene da HSC70 estudado apresentou polimorfismos SNPs sinônimos e informativos nas três populações de *M. amazonicum*. Detectou-se 12 SNPs na população experimental do CAUNESP, 13 na população do rio Tocantins e seis na população do rio Paracauari. Estes polimorfismos são úteis para estimar a estrutura genética de populações, bem como para verificar a sua correlação com características complexas de interesse na aquicultura, em ambos os casos, favorecendo a conservação dos estoques naturais de *M. amazonicum*.

(3) Houve efeito de interesse para dois SNPs (C256T e T907C) e dois haplótipos (H7 e H10), efeitos estes que compreendem várias características de crescimento, incluindo interações de densidade e classe populacional. Deste modo, os efeitos mais importantes foram encontrados na densidade 40 e nas fêmeas. O fato de ter sido detectado efeitos somente na densidade 40 neste primeiro estudo exclui a possibilidade de uso desta informação para a intensificação do cultivo do *M. amazonicum*. Porém, pode ser aplicado futuramente no desenvolvimento de linhagens com alto potencial de crescimento, através da Seleção Assistida por Marcadores. O efeito detectado nas fêmeas pode ser indício do envolvimento do gene da HSC70 com o desenvolvimento reprodutivo da espécie.

(4) As populações naturais de *M. amazonicum* possuem alta variabilidade genética para o gene da HSC70, analisada pela variação haplotípica. Além disso, toda a variabilidade está presente dentro das populações, indicando que as duas populações naturais estudadas não estão diferenciadas geneticamente (não estruturadas).

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of The Cell**. 4. ed. New York: Garland Publishing, 2002. 1661p.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AMMAR, D.; MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 2, p. 523-528, 2001.
- ANDERSON, R. K.; PARKER, P. L.; LAWRENCE, A. A 13C/12C tracer study of the utilization of presented feed by a commercially important shrimp *Litopenaeus vannamei* in a pond grow-out system. **Journal World Aquaculture Society**, v. 18, p. 148-156, 1987.
- ANGELIER, N. et al. Does the chaperone heat shock protein hsp70 play a role in the control of developmental processes? **International Journal of Developmental Biology**, v. 40, p. 521-529, 1996.
- ARAÚJO, V. S.; SANTOS, J. P.; ARAÚJO, A. L. C. Monitoramento das águas do rio Mossoró/RN, no período de abril/2005 a julho/2006. **Holos**, v. 23, p. 4-41, 2007.
- ARNOLD, S. J. et al. An evaluation of stocking density on the intensive production of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus esculentus*). **Aquaculture**, v. 256, p. 174-179, 2006.
- BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. 10, p. 781-91, 2006.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 155-165, 2002.
- BARBIERI JR, R. C.; OSTRENSKY, A. **Camarões Marinhos - Engorda**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 370p
- BAY, L. K. et al. High genetic diversities and complex genetic structure in an Indo-Pacific tropical reef fish (*Chlorurus sordidus*): evidence of an unstable evolutionary past? **Marine Biology**, v. 144, n. 4, p. 757-767, 2004.
- BEUZEN, N. D.; STEAR, M. J.; CHANG, K. C. Molecular markers and their use in animal breeding. **Veterinary Journal**, v. 160, p. 42-52, 2000.
- BIALETZKI, A. et al. Occurrence of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) in Leopoldo's Inlet (Ressaco do Leopoldo), upper Paraná river, Porto Rico, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, n. 2, p. 379-390, 1997.
- BLANCK, D. V. et al. Polimorfismo no gene GH1-*Pst*I associado a características corporais de linhagens de tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 1, p. 599-604, 2009.
- BLANCK, D. V. et al. SNP in the HSP70 gene and their correlation with phenotypic traits in Amazon River prawn (*Macrobrachium amazonicum*). IN: THE CRUSTACEAN SOCIETY SUMMER MEETING AND COLLOQUIUM CRUSTACEA DECAPODA MEDITERRANEA, 2012, Atenas. **Abstracts...Atenas: The Crustacean Society**, 2012.
- BOHONAK, A. J.; JENKINS, D. G. Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. **Ecology Letters**, v. 6, n. 8, p. 783-796, 2003.

- BOORSTEIN, W. R.; ZIEGELHOFFER, T.; CRAIG, E. A. Molecular evolution of the Hsp70 multigene family. **Journal of Molecular Evolution**, v. 38, p.1-17, 1994.
- BOVINE HAPMAP CONSORTIUM. Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. **Science**, v. 324, p. 528, 2009.
- BOYD, C. E.; ZIMMERMANN, S. Grow-out systems – water quality and soil management. In: NEW, M. B.; VALENTI, W. C. (ed.) **Freshwater Prawn Farming: THE FARMING OF *Macrobrachium rosenbergii***. Oxford: Blackwell Science, 2000. p. 221-228.
- BRADBURY, I. R. et al. Genomic islands of divergence and their consequences for the resolution of spatial structure in an exploited marine fish. **Evolutionary Applications**, v.6, n.3, p. 450-461, 2013.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, p. 177-186, 1999.
- BROWN JR, A. H. et al. Effects of Heat Shock Protein-70 Gene and Forage System on Milk Yield and Composition of. **The Professional Animal Scientist**, v. 26, p. 398-403, 2010.
- CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro SNP markers: basic concepts , applications in animal breeding and management and perspectives for the future. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 64-71, 2009.
- CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP. **Rede camarão-da-amazônia**. Disponível em: <http://www.caunesp.unesp.br/pesquisa/redes/rede_camarao.php>. Acesso em: 25 de jan 2011.
- CERVIGÓN, F. et al. **Guía de campo de las especies comerciales marinas y de agua salobres de la costa septentrional de sur america**. Roma: FAO, 1992. p. 103-162.
- CHAMARY, J. V; HURST, L. D. Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals. **Genome Biology**, v. 6, p.R75, 2005.
- CHAN, S. H. et al. Altered temporal profile of heat shock factor 1 phosphorylation and heat shock protein 70 expression induced by heat shock in nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 107, n. 2, 339-345, 2003.
- CHENG, S. H. et al. Cloning of the HSP70 gene in barnacle larvae and its expression under hypoxic conditions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p.665-71, 2003.
- CHUANG, K. H.; HO, S. H.; SONG, Y. L. Cloning and expression analysis of heat shock cognate 70 gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Gene**, v. 405, n. 1-2, p. 10-18, 2007.
- CIOBANU, D. C. et al. A major SNP resource for dissection of phenotypic and genetic variation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Animal genetics**, v. 41, n. 1, p. 39-47, 2010.
- CONG, R.; LI, Q.; KONG, L. Polymorphism in the insulin-related peptide gene and its association with growth traits in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 36-43, 2013.
- CONOVER, D. O. et al. Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 21-47, 2006.
- COOPER, D. N.; KRAWCZAK, M., Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. **Human Genetics**, v. 83, p. 181–188, 1989.

- COULONDRE, C. et al. Molecular basis of base substitution hot spots in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 274, p. 775–780. 1978.
- CUI, Z. et al. Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70 gene in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, p. 56-64, 2010.
- DAOUD, D. et al. Temperature induced variation in oxygen consumption of juvenile and adult stages of the northern shrimp, *Pandalus borealis*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 347, p. 30-40, 2007.
- DE-SANTIS, C.; JERRY, D. R. Candidate growth genes in finfish—where should we be looking? **Aquaculture**, v. 272, p. 22–38, 2007.
- DURAN, C. et al. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. **Current Bioinformatics**, v. 61, n. 1, p. 16-27, 2009.
- EGGERT, K. W. et al. Sem-inal antibodies to human 60 kd heat shock protein (HSP60) in male partners of subfertile couples. **Human Reproduction**, v. 17, p. 726-735, 2002.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Relatório P2 – Caracterização da Bacia Hidrográfica do Rio Tocantins e seus Formadores Avaliação Ambiental Integrada – AAI da Bacia Hidrográfica do Rio Tocantins e seus Formadores**. Empresa de Pesquisa Energética. 2007. 415p. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/3958053/Produto-2-Characterizacao-Texto-integral>>. Acesso em: 20 out 2012.
- EPP, M. A. Stable isotopes in shrimp aquaculture. **Journal World Aquaculture Society**, v. 33, p. 18-19, 2002.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- EVANS, T. G. et al. Zebrafish Hsp70 is required for embryonic formation. **Cell Stress & Chaperones**, v. 10, p. 66-78, 2005.
- EWING B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.
- EWING, B. et al. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47, 2005.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Harlow: Longman group Ltd., 1996. 464p.
- FANG, D. A. et al. Characterization of heat shock protein 70 in the red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*): Evidence for its role in regulating spermatogenesis. **Gene**, n. 492, p. 138–147, 2012.
- FANGUE, N. A.; HOFMEISTER, M.; SCHULTE, P. M. Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2859-2872, 2006.

- FENG, J. B.; LI, J. L.; CHENG, X. Research progress on germplasm resource exploitation and protection of *Macrobrachium nipponense*. **Journal of Shanghai Fisheries University**, v. 17, p. 371-376, 2008.
- FERAL, J. P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? **Journal of Experimental Marine Biology**, v. 268, n.2, p. 121-145, 2002.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- FLAHERTY, K. M.; DELUCA-FLAHERTY, C.; MCKAY, D. B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein. **Nature**, v. 346, p. 623-638, 1990.
- FLEXA, C. E. et al. Morfometria do camarão cascudo *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) no município de Cametá/Pará. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 14, 2005, Fortaleza. **Resumos eletrônicos...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Engenharia de Pesca, 2005.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2012**. Rome, Italy: FAO, Fisheries and Aquaculture Department, 2012. 230p.
- FORD, M. J. Effects of natural selection on patterns of DNA sequence variation at the transferrin, somatolactin, and p53 genes within and among chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) populations. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 843-855, 2000.
- FREAMO, H. et al. Outlier SNPs show more genetic structure between two Bay of Fundy metapopulations of Atlantic salmon than do neutral SNPs. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 254-267, 2011.
- GARCIA, F.; GONZÁLEZ-BARÓ M.; POLERO, R. Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borelli*. **Journal of General Physiology Online, Lipids**, v. 37, n. 6, p. 581-585, 2002.
- GAVIOL, H. C. T. et al. Genetic evaluation of the HSP70 protein in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Genetics and Molecular Research**, v.7, n.1, p.133-139, 2008.
- GAZOLA-SILVA, F. F.; MELO, S. G.; VITULE, J. R. S. *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae): possível introdução em um rio da planície litorânea paranaense (PR, Brasil). **Acta Biológica Paranaense**, v. 36, p. 83-90, 2007.
- GE, G. Molecular Characterization of a Heat Shock Cognate cDNA of Zebrafish, hsc70, and Developmental Expression of the corresponding transcripts. **Developmental genetics**, v. 233, p. 223-233, 1997.
- GEBREMEDHIN, B. et al. Frontiers in identifying conservation units: from neutral markers to adaptive genetic variation. **Animal Conservation**, n. 12, p. 107-109, 2009.
- GENEIOUS versão 6.0 criado por Biomatters. Disponível em:< <http://www.geneious.com>>. Acessado em: junho de 2012.
- GENISSEL, A. et al. No evidence for an association between common nonsynonymous polymorphisms in Delta and bristle number variation in natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 166, p. 291-306, 2004.
- GEORGOPOULOS, C.; WELCH, W. J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. **Annual Review of Cell and Development Biology**, v. 9, p. 601-634, 1993.

- GLENN, K. L. et al. SNP analysis of AMY2 and CTSL genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp. **Animal Genetics**, v. 36, 235–236, 2005.
- GORBACH, D. M. et al. Mining ESTs to determine the usefulness of SNPs across shrimp species. **Animal Biotechnology**, v. 21, p. 100–103, 2010.
- GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.
- GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Genética moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 589p.
- GRISERI, P. et al. A synonymous polymorphism of the Tristetraprolin (TTP) gene, an AU-rich mRNA-binding protein, affects translation efficiency and response to Herceptin treatment in breast cancer patients. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 23, p. 4556-4568, 2011.
- GUERRA, A. L. **Caracterização molecular da estrutura genética de populações e espécies de camarões palemonídeos do Gênero *Macrobrachium***. 2011. 53f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - São José do Rio Preto, SP, 2011.
- GUERRA, A. L. et al. Genetic polymorphism, molecular characterization and relatedness of *Macrobrachium* species (Palaemonidae) based on RAPD-PCR. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 2317- 2327, 2010.
- GUINAND, B.; LEMAIRE, C.; BONHOMME, F. How to detect polymorphisms undergoing selection in marine fishes? A review of methods and case studies, including flatfishes. **Journal of Sea Research**, v. 51, n. 3-4, p. 167-182, 2004.
- HABIB, K. A. et al. Population genetic structure and demographic history of the fat greenling *Hexagrammos otakii*. **Genes & Genomics**, v. 33, n. 4, p. 413-423, 2011.
- HARRISON, K.E. Broodstock Nutrition and Maturation Diets. In: NEW, M. B.; VALENTI, W. C. (Ed.). **Freshwater Prawn Culture: THE FARMING OF *Macrobrachium rosenbergii***. Oxford: Blackwell Science, 2000. p. 391-401.
- HARTNOLL, R. G. Growth. In: BLISS, D. E. (Ed.). **The Biology of Crustacea**. New York: Academic Press, 1982. p.111-196.
- HAUSER, L.; CARVALHO, G. R. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. **Fish and Fisheries**, v. 9, p. 333-362, 2008.
- HAYWARD, S. A. L.; RINEHART, J. P.; DENLINGER, D. L. Desiccation and rehydration elicit distinct heat shock protein transcript responses in flesh fly pupae. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p.963-971, 2004.
- HEIKKILA, J. J. Heat shock protein gene expression and function in amphibian model systems. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.156, p. 19-33, 2010.
- HELLBERG, M.E. Gene flow and isolation among populations of marine animals. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, p. 291–310, 2009.
- HESS, J. E.; NARUM, S.R. SNP loci correlated with run-timing in adult Chinook salmon from the Columbia River Basin. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 140, n. 3, p. 855-864, 2011.

- HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 846 p.
- HIDER, J. L. et al. Exploring signatures of positive selection in pigmentation candidate genes in populations of East Asian ancestry. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 150, 2013.
- HIGGINS, D. G.; SHARP, P. M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. **Gene**, v. 73, p. 237-244, 1988.
- HODGKINSON, A.; EYRE-WALKER, A. Human triallelic sites: evidence for a new mutational mechanism? **Genetics**, v. 184, n. 1, p. 233-41, 2010.
- HOFFMANN, A. A; SGRÒ, C. M. Climate change and evolutionary adaptation. **Nature**, v. 470, n. 7335, p. 479-85, 2011.
- HOLTHUIS, L. B. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The Subfamily Palaemonidae. **Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation**, v. 12, p. 1-396, 1952.
- HUANG, S. Y. et al. Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. **Animal Reproduction Science**, v.70, p.99-109, 2002.
- HUANG, S. Y. et al. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. **Animal Reproduction Science**, v. 63, p. 231-240, 2000.
- HUANG, S. Y. et al. Genotypes of 5'-flanking region in porcine heat-shock protein 70.2 gene affect backfat thickness and growth performance in Duroc boars. **Livestock Production Science**, v.85, p.181-187, 2004.
- HUANG, Y.; WIMLER, K. M.; CARMICHAEL, G. G. Intronless mRNA transport elements may affect multiple steps of pre-mRNA processing. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 18, p. 1642-1652, 1999.
- IKETANI, G. et al. The history of the introduction of the giant river prawn, *Macrobrachium cf. rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae), in Brazil: New insights from molecular data. **Genetics and molecular biology**, v. 34, n. 1, p. 142-51, 2011.
- INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. **Nature**, v. 467, n. 7311, p. 52-58, 2010.
- ISMAEL, D.; NEW, M. B. Biology. In: M. B. New, W. C. Valenti (Ed.). **Freshwater prawn culture**. Oxford: Blackwell Science, 2000. p. 18-40.
- IST 341 Issues in Human Genetics. **What is a SNPs?** Disponível em:< <http://science.marshall.edu/murraye/341/snps/Human%20Genetics%20MTHFR%20SNP%20Page.html>>. Acesso em: jan de 2013.
- JENKINS, D. G. et al. Does size matter for dispersal distance? **Global Ecology and Biogeography**, v. 16, n. 4, p. 415-425, 2007.
- JESUS, T. F.; INÁCIO, A.; COELHO, M. M. Different levels of hsp70 and hsc70 mRNA expression in Iberian fish exposed to distinct river conditions. **Genetics and molecular biology**, v. 36, n. 1, p. 61-9, 2013.

- JIAO, C. Z. et al. Cloning, sequencing and expression analysis of cDNA encoding a constitutive heat shock protein 70 (HSC70) in *Fenneropenaeus chinensis*. **Chinese Science Bulletin**, v. 49, p.2385-2393, 2004.
- JOHNSON, B. D. et al. Hop modulates hsp70/hsp90 interactions in protein folding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, p. 3679–3686, 1998.
- JUNG, H. et al. Transcriptomics of a giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): de novo assembly, annotation and marker discovery. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e27938, 2011.
- JUNG, H. et al. Genes and growth performance in crustacean species: a review of relevant genomic studies in crustaceans and other taxa. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, p. 1-34, 2013.
- KANG, J. H. et al. Allele-specific PCR genotyping of the HSP70 gene polymorphism discriminating the green and red color variants sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). **Journal of genetics and genomics**, v. 38, n. 8, p. 351–355, 2011.
- KAPOOR, M.; CURLE, C. A.; RUNHAM, C. The hsp70 family of *Neurospora crassa*: cloning, sequence analysis, expression, and genetic mapping of the major stress-inducible member. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 212-221, 1995.
- KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, p. 183-201, 1998.
- KIM, W. J.; JUNG, H. T.; GAFFNEY, P. M. Development of Type I genetic markers from expressed sequence tags in highly polymorphic species. **Marine Biotechnology**, v. 13, p. 127-132, 2011.
- KIMCHI-SARFATY, C. et al. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. **Science**, v. 315, p. 525-528, 2007.
- KIMPARA, J. M. et al. Limnology of *Macrobrachium amazonicum* grow-out ponds subject to high inflow of nutrient-rich water and different stocking and harvest management. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 1289 – 1297, 2011.
- KRUGLYAK, L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. **Natural Genetic**, v.17, p. 21–24. 1997.
- KRUMMENAUER, D. et al. Viabilidade do cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Crustácea: Decapoda) em gaiolas sob diferentes densidades durante o outono no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, p. 252-257, 2006.
- KURIS, A. M. et al. Morphotypic differentiation of male Malaysian giant prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 7, p. 219-237, 1987.
- KWOK, P.Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them. **Molecular Medicine Today**, v. 5, p. 538-543, 1999.
- LARSEN, P. F. et al. Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). **Molecular Ecology**, v. 16, p. 4674-4683, 2007.
- LEIGNEL, V. et al. Identification of new subgroup of HSP70 in Bythograeidae (hydrothermal crabs) and Xanthidae. **Gene**, v. 396, p. 84-92, 2007.
- LI, J. Z. et al. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. **Science**, v. 319, n. 5866, p. 1100-1114, 2008.

- LI, X. L. et al. Single nucleotide polymorphism discovery of molt inhibiting hormone gene 3 exons and its association with growth traits in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, p. 2856-2858, 2011.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.
- LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 631-677, 1988.
- LIU, J. et al. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Cell Stress and Chaperones**, v.9, p.313-323, 2004.
- LIU, N. J.; ZHANG, K.; ZHAO, H. Y. **Haplotype-association Analysis, Genetic Dissection of Complex Traits**. 2. ed. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2008. p. 335–405.
- LO, W. Y. et al. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Cell Stress & Chaperones**, v. 9, n. 4, p. 332-43, 2004.
- LOBÃO, V. L.; ROJAS, N. E. T. **Camarões de água-doce. Da coleta ao cultivo, à comercialização**. São Paulo: Ícone, 1991. 112p.
- LOURENÇO, G. et al. Maturidade gonadal do camarão de água-doce *Macrobrachium jelskii* (Decapoda, Palaemonidae) no córrego Talhado. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 25, 2004, Brasília-DF. **Resumos eletrônicos...** Brasília-DF: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2004.
- LUAN, W. et al. Identification of a novel inducible cytosolic Hsp70 gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and comparison of its expression with the cognate Hsc70 under different stresses. **Cell Stress and Chaperones**, v. 15, n. 1, p. 83-93, 2010.
- LUIKART, G. et al. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 12, p. 981-994, 2003.
- MA, K.; FENG, J. B.; LI, J. L. Genetic variation based on microsatellite analysis of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* from Qiandao Lake in China. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 4235-44, 2012.
- MA, K. J. et al. Transcriptome analysis of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* using 454 pyrosequencing for discovery of genes and markers. **PloS One**, v. 7, n. 6, p. e39727, 2012.
- MAAK, S.; PETERSEN, K.; von Lengerken, G. Association of polymorphisms in the porcine HSP70.2 gene promoter with performance traits. **Animal Genetics**, v. 29, n. 71, 1998.
- MACIEL, C. R.; VALENTI, W. C. Biology, Fisheries and Aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: A Review. **Nauplius**, v. 17, n. 2, p. 61-79, 2009.
- MAGALHÃES, C.; et al. Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of São Paulo, Brazil: records and possible causes of their introduction. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 1929-1945, 2005.
- MAGALHÃES, C.; I. WALKER. Larval development and ecological distribution of central Amazonian palaemonid shrimps (Decapoda, Caridea). **Crustaceana**, v. 55, n. 3, p. 279-292, 1988.

- MARTIEN, K. K.; GIVENS G. H.; ARCHER, E. A note on the ability of STRUCTURE to correctly infer the number of populations for Bering-Chukchi-Beaufort Seas bowhead whales. **International Whaling Commission**, 2007. Paper SC/59/BRG34.
- MARTIN, D. P. et al. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, v. 26, p. 2462-2463, 2010.
- MARTINEZ-ARIAS, R. et al. Sequence variability of a human pseudogene. **Genome Research**, v. 11, p. 1071– 1085, 2001.
- MARTIN-MARTI, S. et al. SNP analyses of the 5HT1R and STAT genes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 1, p. 53-55, 2010.
- MATWEE, C. N. et al. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, p. 829-837, 2001.
- MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 62, p.670-684, 2005.
- MCLENNAN, A. G.; MILLER, D. A biological role for the heat shock response in crustaceans. **Journal of Thermal Biology**, v. 15, n. 1, p. 61-56, 1990.
- MCMILLEN-JACKSON, A. L.; BERT, T. M. Genetic diversity in the mtDNA control region and population structure in the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 24, p. 101-109, 2004.
- MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água-doce do Brasil**. São Paulo: Editora Loyola, 2003. 430 p.
- MIDLEN, A.; REDDING, T. **Environmental management for aquaculture**. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 2000. 223 p.
- MILLAMENA, O. M.; PASCUAL, F. P. Tissue lipid content and fatty acid composition of *Peneaus monodon* fabricus broodstock from the wild. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 21, p. 116-161, 1990.
- MOEN, T. et al. Identification and characterisation of novel SNP markers in Atlantic cod: evidence for directional selection. **BMC genetics**, v. 9, p. 18, 2008.
- MONTOYA, J. V. Freshwater shrimps of the genus *Macrobrachium* associated with roots of *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth) in the Orinoco Delta (Venezuela). **Caribbean Journal of Science**, v. 39, p. 155-159, 2003.
- MORAES-RIODADES, M. C.; VALENTI, W. C. Morphotypes in male Amazon River Prawns, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, v. 236, p. 297-307, 2004.
- MORAES-RIODADES, P. M. C. **Cultivo do camarão-da-amazônia, *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) em diferentes densidades: fatores ambientais, biologia populacional e sustentabilidade econômica**. 2005. 117f. Tese (Doutorado em Aquicultura). – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2005.
- MORAES-RIODADES, P. M. C.; KIMPARA, J. M.; VALENTI, W. C. Effect of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* culture intensification on ponds hydrobiology. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 18, n. 3, p. 311-319, 2006.

- MORAES-RIODADES, P. M. C.; VALENTI, W. C. Crescimento relativo do camarão canela. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 4, p. 1169-1176, 2002.
- MORAES-VALENTI, P. M. C.; VALENTI, W. C. Effect of Intensification on Grow Out of the Amazon River Prawn, *Macrobrachium amazonicum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 4, p. 516-526, 2007.
- MORAES-VALENTI, P. et al. Effect of density on population development in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. **Aquatic Biology**, v. 9, p. 291-301, 2010.
- MORI, C. et al. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testes development in normal and Hsp 70–2 knockout mice. **Developmental Dynamics**, v. 208, n. 1, p. 125–136, 1997.
- MORIMOTO, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes & Development**, v. 12, p. 3788–3796, 1998.
- MORIN, P. A.; LUIKART, G.; WAYNE, R. K. SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 4, p. 208-216, 2004.
- MOSELEY, P. L. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. **Journal Applied Physiology**, v. 83, p.1413-1417, 1997.
- MOSS, K. K.; MOSS, S. M. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 35, p. 536-542, 2004.
- MOTIF SEARCH: Finding de-novo protein motif sequences. Disponível em:<<http://motifsearch.com/index.php?page=motifproteinseq>>. Acesso em: 23 dezembro 2012.
- NAGAHORI, K., et al. Basic characterization of 90 kDa heat shock protein genes HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1 and TRAP1 expressed in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Animal Science Journal**, v. 81, n. 4, p. 513–518, 2010.
- NEIGEL, J. E. Is FST obsolete? **Conservation Genetics**, v. 3, n. 2, p. 167-173, 2002.
- NEUER, A. et al. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction**, update 6, 149–159, 2000.
- NEW, M. B. History and global status of **Freshwater Prawn Farming**. In: NEW, M. B.; VALENTI, W. C. (Ed.). **Freshwater Prawn Farming: THE FARMING OF *Macrobrachium rosenbergii***. Oxford: Blackwell Science, 2000. p.01-11.
- NIELSEN, E. E. et al. Population genomics of marine fishes: identifying adaptive variation in space and time. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 3128-3150, 2009.
- ODINETZ-COLLART, O.; RABELO, H. Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 16, n. 4, p. 684-688, 1996.
- OLIGOANALYZER. Disponível em: <<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>>. Acesso em: 30 junho 2009.
- OLIVIER, M., A haplotype map of the human genome. **Physiological Genomics**, v. 13, p. 3-9, 2003.

- OTOSHI, C. A. et al. Super intensive growout of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Recent advances at the oceanic institute. IN: PROCEEDING O THE 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE RECIRCULATING AQUACULTURE, 6, 2006, Blacksburg. **Resumos...**Virginia Tech University, Blacksburg, 2006.
- OTOSHI, C.A. et al. Shrimp behavior may affect culture performance at super intensive stocking densities. **Global Aquaculture Advocate**, p.67-69, 2007.
- PAPA, L. P. et al. Diferenciação morfológica de machos do camarão de água-doce *Macrobrachium amazonicum* a partir da análise do hepatopâncreas e do sistema reprodutor. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, n. 4, p. 463-467, 2004.
- PASSANO, L. M. Molting and its control. IN: TALBOLT, H. W. (Ed.). **The Physiology of Crustacea: metabolism and growth**. New York: Academic Press, 1960. p. 473-536.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v.1, p.6-8, 2012.
- PEIXOTO, S. N. B. **Caracterização molecular e biologia reprodutiva de *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae)**. 2002. 71f. Dissertação (Mestrado em Biologia Ambiental) - Universidade Federal do Pará, Bragança, 2002.
- PENTEADO, J. M. A. **Análise da produtividade e viabilidade econômica de quatro sistemas de berçários do camarão-da-amazônia, *Macrobrachium amazonicum***. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2012.
- PETTOVELLO, A. D. First record of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae) in Argentina. **Crustaceana**, v. 69, p. 113-114, 1996.
- PLACE, S. P.; HOFMANN, G. E. Temperature interactions of the molecular chaperone Hsc70 from the eurythermal marine goby *Gillichthys mirabilis*. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 2675-2682, 2001.
- PORTO L. A. C. **Estudos morfológicos em populações do complexo *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) em diferentes bacias hidrográficas brasileiras**. 2004. 149f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- PRASERTLUX, S. et al. Expression levels of RuvBL2 during ovarian development and association between its single nucleotide polymorphism (SNP) and growth of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 308, p. 83–90, 2010.
- PRETO, A. L. et al. Efeito da densidade de estocagem sobre o biofilme e o desempenho de pós-larvas do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* cultivado em gaiolas. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1417-1423, 2005.
- PRETO, B. L. **Uso de aeradores e substratos no cultivo semi-intensivo do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum*: análise técnica, econômica e emissão de gases do efeito estufa**. 2012. 94f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2012.
- PRIMER 3 PLUS. Disponível em:< <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>>. Acesso em: 19 nov 2009.

- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-59, 2000.
- PRITCHARD, J. K.; WENA, X.; FALUSH, D. **Documentation for Structure Software: Version 2.3**. Chicago: University of Chicago, Department of Human Genetics, 2009.
- PRUDENCE, M. et al. An amylase gene polymorphism is associated with growth differences in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*. **Animal Genetics**, v. 37, p. 348-351, 2006.
- QIN, W. et al. Cloning and characterization of a member of the hsp70 gene family from *Locusta migratoria*, a highly thermotolerant insect. **Cell Stress Chaperones**, v. 8, n. 2, p. 144-152, 2003.
- RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p. 94-100, 2002.
- RAMYA, T. N. C.; SUROLIA, N.; SUROLIA, A. 15-Deoxyspergualin modulates *Plasmodium falciparum* heat shock protein function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, p. 585-592, 2006.
- RAVAUX, J. et al. Heat-shock response and temperature resistance in the deep sea vent shrimp *Rimicaris exoculata*. **Journal of Experimental Biology**, n. 206, p. 2345-2354, 2003.
- RAVAUX, J. et al. First Hsp70 from two hydrothermal vent shrimps, *Mirocaris fortunata* and *Rimicaris exoculata*: characterization and sequence analysis. **Gene**, v. 386, p. 162-172, 2007.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.
- REARDON, W.; MULLEN, A. M.; SWEENEY, T. et al. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 270-5, 2010.
- RIBEIRO, K. **Efeito dos ácidos graxos poli insaturados sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)**. 2003. 66f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2003.
- RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223-225, 1989.
- ROMERO, M. E. Preliminary observations on potential of culture of *Macrobrachium amazonicum* in Venezuela. In: NEW, M. B. (Ed.). **Giant Prawn Farming**. Amsterdam: Elsevier, 1982. p. 411-416.
- ROSENKRANS JR, C. et al. Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with Heat Shock Protein 70 genetic polymorphisms. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n. 3-4, p. 178-182, 2010.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 365-386, 2000.
- RUBIN, D. M. et al. Genomic structure and sequence analysis of *Drosophila melanogaster* HSC70 genes. **Gene**, v. 128, n. 2. p. 155-63, 1993.
- RYCHLIK, W. Selection of *Primers* for Polymerase Chain Reaction in *Methods in Molecular Biology*. IN: WHITE, B. A. (Ed.). **PCR Protocols: CURRENT METHODS AND APPLICATIONS**. New Jersey: Humana Press Inc., 1993. p. 31-40. v.15.

- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A LABORATORY MANUAL**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SÁNCHEZ-RAMOS, I. et al. Identificación de RFLP en genes relacionados con el crecimiento en dorada *Sparus aurata* L., 1758. **Boletín del Instituto Español de Oceanografía**, v. 21, p. 253-259, 2006.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SANTACRUZ, H.; VRIZ, S.; ANGELIER, N. Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, hsc70, and developmental expression of the corresponding transcripts. **Developmental Genetics**, v. 21, p. 223-233, 1997.
- SASAMOTO, B. et al. Amplificação e sequenciamento de um fragmento do gene da β -actina no camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum*. IN: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFSCAR, 20, 2013, São Carlos. **Anais de Eventos da UFSCAR...São Carlos**, 2013.
- SCHLÖTTERER, C. Towards a molecular characterization of adaptation in local populations. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, p. 683-687, 2002.
- SCHRÖEDER, G.L. Sources of fish and prawn growth in polyculture ponds as indicated by δ C analysis. **Aquaculture**, v. 35, p. 29-42, 1983.
- SHARMA, S. A.; HUGHES, J. M. Genetic structure and phylogeography of freshwater shrimps (*Macrobrachium australiense* and *Macrobrachium tolmerum*): the role of contemporary and historical events. **Marine and freshwater research**, v. 60, p. 541-553, 2009.
- SHISHEHCHIAN, F. et al. Nitrogenous excretion of *Penaeus monodon* postlarvae fed with different diets. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1- 12, p. 224-227. 1999.
- SHONHAI, A; BOSHOFF, A; BLATCH, G. L. *Plasmodium falciparum* heat shock protein 70 is able to suppress the thermosensitivity of an *Escherichia coli* DnaK mutant strain. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 274, n. 1, p. 70-78, 2005.
- SI, C-L. et al. Genetic diversity of *Salanx cuvieri* in South China inferred from mtDNA cytb sequences. **Marine Fisheries**, v. 34, n. 1, 2012.
- SILVA, A. F. **Influência da densidade de estocagem sobre o desempenho do camarão branco *Litopenaeus vannamei* durante a fase final de engorda em sistema superintensivo**. Rio Grande: FURG, 2009. 45f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.
- SILVA, G. M. F. et al. M. Gonadal structure analysis of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) from a wild population: a new insight on the morphotype characterization. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 798-803, 2009.
- SILVA, K. C. A.; SOUZA, R. A. L.; CINTRA I. H. A. Camarão-cascudo *Macrobrachium amazonicum* (Heller,1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) no município de Vigia-Pará-Brasil. **Boletim Técnico-Científico do Cepnor**, v. 2, n. 1, p. 41-73, 2002.

- SILVA, M. C. N. **Dinâmica populacional do camarão cascudo *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862) da ilha de Combú – Belém-PA.** 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2006.
- SLATKIN, M. Gene Flow in Natural Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p. 393-430, 1985.
- SMITH, C. T. et al. Single nucleotide polymorphisms provide rapid and accurate estimates of the proportions of US and Canadian Chinook salmon caught in Yukon River fisheries. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 25, p. 944–953, 2005.
- SNUTCH, T. P.; HESCHL, M. F.; BAILLIE, D. L. The *Caenorhabditis elegans* hsp70 gene family: a molecular genetic characterization. **Gene**, v. 64, p. 241–55, 1988.
- SOLORZANO, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. **Limnology and Oceanography**, v. 14, p. 799-801, 1969.
- SØRENSEN J. G.; KRISTENSEN, T. N.; LOESCHCKE, V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. **Ecology Letters**, v. 6, p. 1025-1037, 2003.
- SOUZA, I. G. et al. Proporção sexual do camarão *Macrobrachium brasiliense* Heller, 1868 do córrego Talhadinho, Distrito de Talhado-São Paulo. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 25, 2004, Brasília-DF. **Resumos eletrônicos...** Brasília-DF: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2004.
- SPEES, J. L. et al. Molt cycle-dependent molecular chaperone and polyubiquitin gene expression in lobster. **Cell Stress & Chaperones**, v. 8, n. 3, p. 258-64, 2003.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS. **SAS/STAT User's Guide. Version 8.** SAS Institute, 1999.
- STEPHANI, R. M. P.; GOMES, S.L. A unique intron-containing hsp70 gene induced by heat shock and during sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. **Gene**, v. 152, p.19–26, 1995.
- STEPHENS, M.; SMITH, N.J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 978–989, 2001.
- STEVENSON, J.R. Dynamics of the Integument. In: BLISS, D., MANTEL, L. H. (Ed.). **The Biology of Crustacea: INTEGUMENT, PIGMENTS AND HORMONAL PROCESSES.** New York: The Academic Press, 1985. 550p.
- SUN, Y. et al. Cloning and expression analysis of an inducible heat shock protein 70 gene from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. **Shui sheng sheng wu hseh bao**, v. 33, n. 4, p. 627-635, 2009.
- SURESHKUMAR, S.; KURUP, B M. Fecundity indices of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 13, p. 181-188, 1998.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p.1-24, 2011.

- TAO, W.; BOULDING, E. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Heredity**, v. 91, p.60-69, 2003.
- TAVIARA, M. et al. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. **Cell Stress & Chaperones**. v. 1, p. 23-28, 1996.
- TEMPLETON, A. R. **Genética de Populações e Teoria Microevolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011. 705 p.
- THANH, N. M. et al. Single nucleotide polymorphisms in the actin and crustacean hyperglycemic hormone genes and their correlation with individual growth performance in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v. 301, n. 1-4, p. 7-15, 2010.
- TIMMONS, M. B. et al. **Recirculating Aquaculture System**. 2. ed. Ithaca: Cayuga Aqua Ventures, 2002. 769 p.
- UNAL, E. **Population Genetic Structure and Gene Expression Patterns of the Copepod *Calanus finmarchicus* in the North Atlantic Ocean**. 2011. 184f. Tese (Doutorado em Ciências Marinhas) - University of Connecticut, 2011.
- UNAL, E.; BUCKLIN, A. Basin-scale population genetic structure of the planktonic copepod *Calanus finmarchicus* in the North Atlantic Ocean. **Progress in Oceanography**, v. 87, n. 1-4, p. 175-185, 2010.
- VALENCIA, D. M.; CAMPOS, M. R. Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of Colombia. **Zootaxa**, v. 1456, p. 1-44, 2007.
- VALÊNCIA, D. M.; CAMPOS, M. R. Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of Colombia. **Zootaxa**, v. 1456, p. 1-44, 2007.
- VALENTI, W. C.; MELLO, J. T. C; CASTAGNOLLI, N. Efeito da densidade populacional sobre as curvas de crescimento de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) em cultivo semi-intensivo (Crustacea, Palaemonidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 10, n. 3, p. 423-438, 1993.
- VALENTI, W.C. **Criação de Camarões em Águas Interiores**. São Paulo: FUNEP, 1996. 81p.
- VALENTI, W.C. **Cultivo de Camarões de Água-doce**. São Paulo: Nobel, 1985. 82 p.
- VERGAMINI, F. G.; PILEGGI, L. G.; MANTELATTO, F. L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda). **Contributions to Zoology**, v. 80, n. 1, p. 67-83, 2011.
- VIGNAL, A. et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 275-305, 2002.
- WALKER I. Life history traits of shrimps (Decapoda: Palaemonidae) of Amazonian inland waters and their phylogenetic interpretation. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 27, p. 131-143, 1992.
- WANG, P. et al. Association of Polymorphisms in Odorant-Binding Protein Genes With Variation in Olfactory Response to Benzaldehyde in *Drosophila*. **Genetics**, v. 177, p. 1655-1665, 2007.
- WANG, X. L. et al. SNPs in the myostatin gene of the mollusk *Chlamys farreri*: association with growth traits. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 155, p. 327-330, 2010.
- WASIELESKY JR, W. et al. Effect of natural production in brown water super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 258, p. 396-403, 2006.

- WASIELESKY JR, W. et al. Effect of stocking density on growth of pen reared pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) (Crustacea, Penaeidae). **Nauplius**, v. 9, p. 163-167, 2001.
- WEI, T. et al. Characterization and SNP variation analysis of a HSP70 gene from miiuy croaker and its expression as related to bacterial challenge and heat shock. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 3, p. 632-640, 2012.
- WICKINS, J.F.; LEE, D. O. **Crustacean Farming: RANCHING AND CULTURE**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2002. 446 p.
- WILLIAMS, A. S.; DAVIS, D. A.; ARNOLD, C. R. Density-dependent growth and survival of *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* in a semi-closed recirculating system. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.27, p.107-112, 1996.
- WRIGHT S. **Evolution and the Genetics of Populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1969. v.2.
- WRIGHT, S. Evolution and genetics of populations. In: **The Theory of Gene Frequencies**. London: University of Chicago Press, 1978. 511p.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, n.3, p. 395-420, 1965.
- WU, R. et al. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (HSC 70) in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Molecular Biology**, v. 42, n. 2, p. 234-242, 2008.
- WU, R. et al. Amplification and sequence analysis of complete Hsp70 gene of *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Jinan University**, v. 26, p. 428-433, 2005.
- XU, Y. X. et al. Characterization of two parvalbumin genes and their association with growth traits in Asian seabass (*Lates calcarifer*). **Animal Genetics**, v. 37, p. 266–268, 2006.
- YAMASHITA, M.; HIRAYOSHI, K.; NAGATA, K. Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: Molecular evolution of stress protein HSP70 in vertebrates. **Gene**, v. 336, p. 207-218, 2004.
- YEH, F. L.; HSU, T. Differential regulation of spontaneous and heat-induced HSP 70 expression in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 293, p. 349-359, 2002.
- YOST, H.; LINDQUIST, S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. **Cell**, v. 25, p. 185-193, 1986.
- YU M.; CHENG, Y.; ROTHSCHILD, M. F. SNP analysis of molting related genes in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* shrimp. **Archiv fur Tierzucht Dummerstorf**, v. 49, p. 411–412, 2006.
- YU, J. H. et al. Isolation of IGF2 and association of IGF2 polymorphism with growth trait in genetically improved farmed tilapias, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 743–750, 2010.

ZENG, T. et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of HSP70 gene segments and their association with laying performance of domestic duck. **Acta Agriculturae Zhejiangensis**, v. 25, n. 2, p. 230-234, 2013.

ZENG, D. et al. Analysis of Hsp70 in *Litopenaeus vannamei* and Detection of SNPs. **Journal of Crustacean Biology**, v. 28, n. 4, p. 727-730, 2008.