



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PROSPECÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM  
*Litopenaeus vannamei* E ANÁLISE DA DIVERSIDADE  
GENÉTICA EM DUAS FAMÍLIAS DE REFERÊNCIA DE  
CAMARÕES CULTIVADOS**

**CARLA GUINART MARQUES**

**São Carlos  
2009**

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

**PROSPECÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM *Litopenaeus*  
*vannamei* E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM DUAS  
FAMÍLIAS DE REFERÊNCIA DE CAMARÕES CULTIVADOS**

CARLA GUINART MARQUES

Orientador: Patrícia Domingues de Freitas

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução

**SÃO CARLOS**

**2009**

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

M357pm

Marques, Carla Guinart.

Prospecção de marcadores microssatélites em *Litopenaeus vannamei* e análise da diversidade genética em duas famílias de referência de camarões cultivados / Carla Guinart Marques. -- São Carlos : UFSCar, 2009.  
80 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Genética. 2. Marcador molecular. 3. Microssatélite. 4. *Litopenaeus vannamei*. 5. Carcinicultura. I. Título.

CDD: 575.1 (20<sup>a</sup>)

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

**Prospecção de marcadores microssatélites em *Litopenaeus vannamei* e  
análise da diversidade genética em duas famílias de referência de camarões  
cultivados**

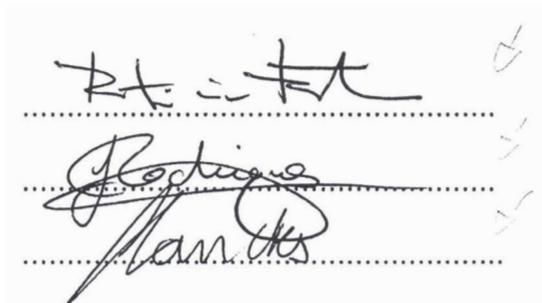
Dissertação de Mestrado de Carla Guinart Marques

Banca Examinadora

Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas

Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

Dra. Alexandra Sanches



The image shows a rectangular box containing three handwritten signatures in black ink. Each signature is written over a horizontal dotted line. To the right of each signature, there is a small handwritten mark, possibly a checkmark or initials. The signatures are: 1. Patrícia Domingues de Freitas, 2. Fernando Pacheco Rodrigues, and 3. Alexandra Sanches.

*“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos.*

*A gente pode dormir numa cama mais ou menos, comer um feijão mais ou menos, ter um transporte mais ou menos, e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro. A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos...*

*Tudo bem!*

*O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum... é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos.*

*Se não a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.”*

*Chico Xavier*

**DEDICO A MINHA QUERIDA MÃE  
E AMADO FILHO**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço A Prof<sup>a</sup> Dr. Patrícia Domingues de Freitas e o Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução pela oportunidade dada a mim dada.

Agradeço aos órgãos financeiros CNPq, FAPESP, CAPES e ABCC pela ajuda financeira dada a este projeto.

Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr. Por permitir o uso das dependências do laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética para a realização deste projeto.

Agradeço a minha querida mãe Tereza de Castro Guinart que com muito amor e sabedoria soube me guiar e acalantar nas horas mais difíceis, além de ter sido a segunda mãe de meu filho em todas as horas que não pude estar presente.

Ao meu amado filho Ariel Marques Sartório, que com sua pouca idade, muitas vezes se privou de brincadeiras, carinhos, feriados e férias ao meu lado para que eu pudesse concluir este projeto.

Ao meu amado namorado Eduardo Cassinelli Filho que agüentou meu mau humor, minhas dores de estomago e cabeça, minha ausência e falta de paciência nesta etapa final me acalmando com seus carinhos e me animando com suas palavras.

Agradeço aos meus grandes amigos: Bruno Cesar Rossini, Danielly Blanck, Ana Cristina Fazza, Beatriz Bianchi e Fernando Ramos pela paciência e dedicação nas horas em que mais precisei de uma palavra amiga.

Aos companheiros de laboratório que direta ou indiretamente estiveram envolvidos neste projeto.

A meus companheiros de republica que me faziam rir nas horas mais desesperadoras.

Por fim agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos neste projeto.



## RESUMO

A carcinicultura marinha brasileira, desde a década de 90, concentra sua produção, principalmente, na espécie exótica *Litopenaeus vannamei*, a qual era inicialmente importada de países localizados na costa do Pacífico. Devido às normas de proteção ambiental, o setor produtivo, no entanto, foi alertado sobre o risco de importar novos reprodutores para a criação dessa espécie, o que levou os produtores de *L. vannamei* a adotar práticas de endocruzamento para manutenção de seus planteis e estoques comerciais, conduzindo à perda da viabilidade genética das populações cativas ao longo das gerações. Desta forma, o monitoramento dos níveis de diversidade genética associado ao desenvolvimento de métodos de cruzamento seletivos, utilizando ferramentas moleculares, passou a ser essencial para o manejo adequado desta espécie no Brasil. Este estudo teve como objetivo desenvolver novas marcas microssatélites para esta importante espécie de camarão e analisar a variabilidade e o nível de diversidade genética de duas famílias cativas em *L. vannamei*, submetidas a um programa de melhoramento genético para caracteres divergentes. Através de uma biblioteca genômica parcial enriquecida (Hamilton *et al.* 1999), conseguimos desenvolver dez novas marcas de microssatélites úteis em *L. vannamei*, que também se mostraram eficientes em cinco outras espécies nativas a costa brasileira em testes de transferabilidade de locos. Com essas novas dez marcas foram analisadas a variabilidade e os níveis de diversidade e distancia genética em duas famílias construídas a partir de pools gênicos diferentes; Família G1 (Venezuela F22 X Panamá F7) e Família G2 (Equador F8 e Panamá). As frequências alélicas e genotípicas, o número de heterozigotos e homozigotos esperados e observados foram calculados utilizando-se o *software* Genepop v. 3.4 (Raymond & Rousset 1995). Também foi empregado o *software* Popgene, versão 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) a fim de calcular as porcentagens de locos polimórficos, as frequências gênicas (Nei, 1987), os índices de diversidade (Nei, 1973), a distância

genética (Nei, 1972) e a identidade genética (Nei, 1978). Para calcular a frequência de alelos nulos foi usado o *software* Micro Checker (Oosterhout et al. 2004). As duas famílias apresentaram déficit de heterozigotos significativo ( $p < 0,007$ ), (três locos para G1 e um para G2), sendo verificado um loco com excesso de heterozigotos na família G2. Os locos, no entanto, não apresentaram desequilíbrio de ligação. A análise de estimativa de erros de genotipagem revelou a presença de alelos nulos em três locos, apenas para a família G1, não sendo, porém, constatada a presença de *dropout* e/ou *stutters* para nenhum dos sete locos polimórficos analisados. A distância genética e a identidade genética calculadas entre as duas famílias foram de 0,42 e 0,64, respectivamente, sendo observada uma heterozigosidade média de 0,49 para G1 e 0,53 para G2. Essa heterozigosidade pode ser considerada alta quando comparada com estudos em populações selvagens e cativas, provavelmente, devido às famílias em estudo terem sido formadas a partir do cruzamento entre indivíduos pertencentes a estoques geneticamente divergentes. Nesta estratégia, o exocruzamento realizado para formar estas duas famílias parece ter ajudado a recuperar a diversidade genética dos estoques que originaram as famílias G1 (F22 x F07) e G2 (F07 x F08), os quais eram provenientes de cruzamentos endogâmicos em gerações relativamente já avançadas.

# SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	5
LISTA DE FIGURAS .....	7
INTRODUÇÃO .....	8
Aqüicultura .....	9
A espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> e seu cultivo.....	13
Estudos genéticos na aqüicultura .....	15
OBJETIVOS.....	19
Objetivo Geral .....	20
Objetivos Específicos.....	20
APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS .....	22
Capítulo I	
PROSPECÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES EM <i>Litopenaeus vannamei</i> E TRANSFERIBILIDADE EM ESPÉCIES RELACIONADAS .....	23
1.MATERIAL E MÉTODOS .....	24
1.1 Extração e quantificação das amostras de DNA .....	24
1.2 Isolamento e caracterização dos microssatélites .....	25
1.2.1 Construção de biblioteca parcialmente enriquecida .....	25
1.2.2 Digestão do DNA.....	25
1.2.3 Ligação dos adaptadores .....	26
1.2.4 Hibridização das sondas biotiniladas.....	27
1.2.5 Captura dos fragmentos .....	27
1.2.6 Amplificação dos fragmentos de DNA enriquecido .....	28
1.2.7 Ligação e clonagem do DNA .....	29
1.2.8 Miniprep .....	30
1.2.9 Reação de seqüenciamento .....	32

1.3 Caracterização dos microssatélites construção dos <i>primers</i> .....	32
1.4 Validação dos locos .....	32
1.5 Genotipagem dos alelos .....	33
1.6 Análise estatísticas dos locos genotipados .....	34
1.7 Transferabilidade de locos microssatélites .....	34
2. RESULTADOS .....	35
2.1 Prospecção de Marcadores Microssatélites .....	35
2.2 Transferabilidade dos locos microssatélites .....	44
3. DISCUSSÃO .....	45
Capítulo II	
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM DUAS FAMILIAS DE <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	53
1. MATERIAL E MÉTODOS .....	54
1.1 Obtenção das famílias .....	54
1.2 Amplificação dos locos e análises estatísticas .....	55
2. RESULTADOS .....	57
2.1 Análise da diversidade genética em duas famílias de <i>L. vannamei</i> .....	57
2.3 Análise de presença de <i>stutteres</i> e/ou <i>dropout</i> e de alelos nulos em duas famílias de <i>L. vannamei</i> .....	63
3. DISCUSSÃO .....	65
CONCLUSÕES GERAIS .....	73
10. REFERÊNCIAS .....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização dos dados obtidos pelo programa CID para prospecção de SSRs-beads a partir da análise de fragmentos de DNA com 400-1200pb obtidos via construção de bibliotecas genômicas enriquecidas da espécie *L. vannamei*. .....40

Tabela 2: Relação dos locos SSRs-beads caracterizados e selecionados, descrevendo a composição dos motifs, sua classificação e sua categorização em composto e perfeito.....38

Tabela 3: Relação dos locos SSRs-beads validados e genotipados, descrevendo o motif do microsatélite, o número de alelos observados ( $N_a$ ), a amplitude de variação dos alelos, os níveis de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e os valores encontrados para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) calculados utilizando-se o programa *Genepop*, versão 3.4 ( $p \leq 0,005$ ).....43

Tabela 4: Resultados obtidos para os testes de transferabilidade dos locos microsatélites realizados em cinco espécies relacionadas nas mesmas condições de PCR estabelecidas para os locos SSRs-beads validados para *L. vannamei*.....44

Tabela 5: Relação dos locos SSRs-beads que apresentaram polimorfismo em G1, descrevendo o motif do microsatélite, o número de alelos observados ( $N_a$ ), a amplitude de variação dos alelos, os níveis de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e os significância encontrada para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) calculados utilizando-se o programa *Genepop*, versão 3.4 ( $p < 0,007$ ).....59

Tabela 6: Relação dos locos SSRs-beads que apresentaram polimorfismo em G2, descrevendo o motif do microsatélite, o número de alelos observados ( $N_a$ ), a amplitude de variação dos alelos, os níveis de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e os significância encontrada para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) calculados utilizando-se o programa *Genepop*, versão 3.4 ( $p < 0,007$ ).....58

Tabela 7: Tamanho amostral, número de alelos encontrados (Na), numero de alelos efetivos (NE) e heterozigosidades esperadas (He) e observadas (Ho) para cada loco encontrados para a família G1 pelo programa Popgene (p<0,007).....	59
Tabela 8: Tamanho amostral, número de alelos encontrados (Na), numero de alelos efetivos (NE) e heterozigosidades esperadas (He) e observadas (Ho) para cada loco encontrados para a família G2 pelo programa Popgene (p<0,007).....	60
Tabela 9: Índices de identidade genética (diagonal acima) e distancia genética (diagonal abaixo) entre as duas famílias, G1 e G2, de <i>L. vannamei</i> analisados pelo programa Popgene.....	60
Tabela 10: Frequências observadas de cada alelo dos locos amplificados na familia G1 calculadas pelo programa Popgene e a classificação em alelos raros, comuns ou exclusivos.....	61
Tabela 11: Frequências observadas de cada alelo dos locos amplificados na família G2 calculadas pelo programa Popgene e a classificação em alelos raros, comuns ou exclusivos.....	62
Tabela 12: Listagem dos resultados de estimativas de porcentagens dadas pelo programa micro-cheker para a família G1 comparando com outros três métodos de cálculos e evidenciando a presença ou ausência significativas de alelos nulos.....	63
Tabela 13: Novas frequências alélicas calculadas pelo programa micro-checker para três locos com alelos nulos na família G1 comparando com tres outros metodos.....	64
Tabela 14: Listagem dos resultados de estimativas de porcentagens dadas pelo programa micro-cheker para a família G2 comparando com outros três métodos de cálculos e evidenciando a presença ou ausência significativas de alelos nulos.....	64

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Exemplar da espécie *Litopenaeus vannamei*.....15
- Figura 2: gel de agarose 1% para quantificação de 30 amostras de DNAs de *L. vannamei* obtidas com a metodologia de Aljanabi e Martinez (1997).....35
- Figura 3: gel de agarose 0,8% evidenciando os padrões de digestão do DNA de *L. vannamei* obtidos com as enzimas de restrição *Bst*UI e *Rsa*I submetidos a 16, 18 e 20 horas de incubação.....35
- Figura 4: Gel de agarose 1,5% evidenciando, marcador de peso molecular (M), os fragmentos eluídos do gel (E1 e E2) e o produto da reação de ligação dos fragmentos de interesse com os adaptadores dupla fita (E'1 e E'2). Observar que os fragmentos selecionados (400-1200pb), após realização dos procedimentos necessários, apresentaram tamanhos bem menores que o esperado.....36
- Figura 5 Géis de agarose evidenciando os produtos de amplificação obtidos para os testes de gradiente de temperatura, realizados com 12 temperaturas, para alguns dos locos SSRs-*beads* estabelecidos para a espécie *L. vannamei*.....39
- Figura 6: Géis de agarose 2%, evidenciando os produtos de amplificação obtidos para diferentes exemplares de L. vannamei utilizando-se locos B07-1, E076, D03-2, G10-1, C07-2, F05-1, D11-1, D09-2, C08-2 e H07-2 em reações PCR.....42*

# **INTRODUÇÃO**

## Aqüicultura

Há alguns anos, os oceanos eram considerados fontes inesgotáveis de proteína animal capazes de sustentar ilimitadamente toda a crescente população. Devido a esta idéia, as zonas pesqueiras do mundo experimentaram uma grande exploração desde a Segunda Guerra mundial, fazendo com que o crescimento da captura global aumentasse à taxa de 6 a 7% ao ano. Porém, após 1970, devido à sobre pesca e à extinção de algumas espécies importantes, o crescimento médio anual de captura caiu para apenas cerca de 1% (Arana, 1999). Esse declínio mundial dos estoques de pescados nos oceanos promoveu um rápido crescimento na aqüicultura (Naylor *et al.*, 2000).

A aqüicultura pode ser definida como cultivo de qualquer organismo aquático, seja ele de água doce, salgada ou estuarina (Pillay, 1996). Outras definições também podem ser enumeradas, como a tecnologia de produção de alimentos de origem aquática (Arana, 1999) ou como o processo de produção em cativeiro de organismos com habitat predominantemente aquático em qualquer estágio de desenvolvimento, ou seja, ovos, larvas, pós-larvas, juvenis ou adultos Rana (1997). Segundo *The State of World Fisheries and Aquaculture* (SOFIA) (2006), a aqüicultura tem sido uma grande fonte de contribuição ao suplemento mundial de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos.

Acredita-se que a aqüicultura originou-se na China, onde documentos encontrados apontam que em 2000 a.C. já eram cultivados, de forma primitiva, macroalgas marinhas e carpas (Arana, 1999). Mas foi somente nas últimas três décadas, no entanto, que esta atividade apresentou um crescimento mundial mais acentuado com taxa média de 8,8% ao ano, comparado com apenas 1,2% de pesca e captura e 2,8% da produção de carne. (SOFIA, 2008).

A captura e aqüicultura de pescados, juntas, contabilizaram cerca de 106 milhões de toneladas de alimentos produzidos em 2004, sendo que

deste total, a aqüicultura responde por 43%, equivalendo a 45,5 milhões de toneladas aproximadamente. Desta porcentagem, 18,3 milhões de toneladas são produtos da aqüicultura marinha. Os principais grupos cultivados no mundo, em ordem de quantidade, são: peixes de água doce (23.863 toneladas), plantas aquáticas (13.927 toneladas), moluscos (13.243 toneladas) e crustáceos (3.680 toneladas) (SOFIA, 2006).

Um subsetor da aqüicultura que apresenta maior potencial de crescimento em longo prazo é o cultivo de organismos marinhos, conhecido como maricultura. Dentro da maricultura as atividades de cultivo de moluscos bivalves, em especial a militicultura e ostreicultura e o cultivo de crustáceos, denominado carcinicultura, possuem grande expressão (Batalha, 2002).

A carcinicultura marinha refere-se à produção de camarões mediante técnicas de aqüicultura, isto é, à criação destes organismos em ambientes controlados, convencionalmente constituídos por tanques de terra (Arana 1999). O período entre 2000 a 2004 apresentou um forte crescimento na produção de crustáceos, em particular de espécies marinhas, com uma taxa de 19,2% ao ano. Já a produção de peixes marinhos e peixes de água doce cresceram 9,6% e 5,8%, respectivamente, neste mesmo período. Nesta época, em termos de valores econômicos, a produção de crustáceos foi a classe com valor mais significativo entre os anos de 2002 à 2004 (SOFIA 2006; 2008).

No Brasil, foi criado pelo Governo Brasileiro nos anos 70, o "Projeto Camarão", mas apenas no período entre 1978 e 1984 foram realizados os primeiros projetos de produção comercial de camarão cultivado com a importação da espécie *Marsupenaeus (Penaeus) japonicus* e adaptação da mesma às condições locais do nordeste brasileiro. Já nos três primeiros anos foram obtidos bons resultados com o cultivo de *M. japonicus*, mas a falta de um plano abrangente de pesquisa, validações tecnológicas e, principalmente, o longo período de adaptação desta espécie às condições de cultivo do Brasil (demorando de 1978 a 1983), levou ao fracasso a domesticação desta espécie. A partir de 1984, com o término do período

seco e início de chuvas intensas, houve variações na salinidade da água, dificultando aspectos relacionados à maturação, reprodução e sobrevivência de *M. japonicus* no ambiente tropical brasileiro. Assim, em 1986 foi descartada a viabilidade para o cultivo comercial dessa espécie (ABCC, 2008).

Outra tentativa de implementação da carcinicultura no Brasil foi tentar domesticar algumas espécies nativas (*Farfantepenaeus subtilis*, *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*). Entretanto, apesar do cultivo dessas espécies nativas ter demonstrado viabilidade em relação à maturação, reprodução e larvicultura, a sua produtividade não ultrapassou 600Kg/ha/ano, não sendo satisfatória economicamente, uma vez que sua comercialização, algumas vezes, não chegava a cobrir os custos das fazendas, comprometendo, desta forma, a rentabilidade da atividade e levando algumas grandes unidades à desativação (ABCC, 2008).

Já nas décadas de 80 e 90 uma terceira etapa teve início com a importação da espécie *Litopenaeus vannamei*. A escolha da nova espécie foi baseada no fato de essa já ser cultivada com sucesso em outros países da América do Sul como Equador e Panamá, demonstrando alta adaptação, inclusive, a diferentes hemisférios. Ainda na primeira metade dos anos 90, as fazendas brasileiras adotaram o cultivo desta espécie de camarão, obtendo índices de rentabilidade e produtividade superiores aos obtidos com as espécies nativas, o que proporcionou, a partir de 1996, a expansão da produção comercial da espécie *L. vannamei* no Brasil (ABCC, 2008).

Apesar de a carcinicultura ter sido implantada no país desde a década de 70, foi somente após a introdução de *L. vannamei* que a atividade expandiu-se mais aceleradamente, principalmente, visando atender ao mercado externo. A desvalorização da moeda brasileira, associada às doenças que afetaram a produção de camarão em alguns dos principais países produtores, como Equador e em países da América Central, fez da carcinicultura brasileira um dos setores com melhor rendimento no agronegócio do país (Batalha, 2002).

Os principais fatores que contribuíram para que o Brasil ocupasse lugar de destaque no cenário da carcinicultura do Hemisfério Ocidental estavam relacionados com: (i) o desenvolvimento e adoção de tecnologia de manejo apropriada em todas as etapas do processo produtivo; (ii) o aperfeiçoamento e emprego sistemático das novas tecnologias e melhorias dos índices técnicos e, conseqüentemente, dos níveis de produtividade e rentabilidade dos cultivos; (iii) o controle o ciclo biológico de *L. vannamei* e a disponibilidade de alimentos balanceados e (iv) o aprimoramento e disseminação das técnicas de manejo e a crescente demanda por camarões cultivados por parte dos mercados europeu e americano (Batalha, 2002).

Além disso, o Brasil tem em sua zona litorânea um grande potencial para o cultivo do camarão marinho devido às boas condições climáticas, hidrobiológicas e topográficas. Isso proporciona ao país uma perspectiva de se tornar, nas próximas décadas, um dos maiores produtores de camarão marinho cultivado no mundo (Batalha, 2002). Entretanto, o manejo em cativeiro deve priorizar a sustentabilidade da atividade para que problemas relacionados à degradação do meio ambiente e surgimento de novos patógenos sejam minimizados (Tupinambá, 2006).

Aspectos relacionados à estrutura genética das populações cativas também devem ser levados em consideração. A perda da variabilidade genética, decorrente do endocruzamento e o pequeno número de reprodutores utilizados, podem vir a causar diminuição no tamanho médio dos indivíduos e aumento de deformidades, o que acarreta uma queda na produtividade (Garcia *et al.*, 1996; Wolfus *et al.*, 1997; Freitas & Galetti, 2002). Freitas & Galetti (2005), avaliaram os níveis de a variação genética em cinco gerações cativas de *L. vannamei* com marcadores moleculares multilocos evidenciando um declínio progressivo e acentuado na variabilidade genética nesses estoques com o passar das gerações, ressaltando, portanto a importância de estudos nesta área.

Deste modo, o desenvolvimento de técnicas de manejo em cativeiro associado a análises genéticas para monitoramento da variabilidade

genética dos estoques tem sido incluído como prioritários em alguns grandes centros produtores da espécie *L. vannamei*.

### **A espécie *Litopenaeus vannamei* e seu cultivo**

O subfilos Crustacea, com mais de 38.000 espécies conhecidas, inclui alguns dos artrópodes mais conhecidos, tais como os caranguejos, os camarões e as lagostas. A maioria dos crustáceos é marinha, mas existem também espécies de água doce, semiterrestres e terrestres (Barnes, 1984).

A classe Malacostraca engloba aproximadamente 60% de todas as espécies descritas de crustáceos. Os animais dessa classe possuem um tronco tipicamente dividido em 14 segmentos, mais o telson, sendo que os oito primeiros segmentos são torácicos e os restantes abdominais. Os apêndices abdominais (geralmente os cinco primeiros pares) são chamados de pleópodos e são semelhantes às birremes. Os pleópodos podem ser usados para natação, escavação, ventilação além de transporte de ovos e até mesmo troca gasosa (Barnes, 1984).

Dentro desta classe encontra-se a ordem Decapoda, a qual abrange os camarões, lagostas e caranguejos, sendo considerada a maior ordem dos crustáceos, com aproximadamente 10.000 espécies descritas, cerca de um quarto do total de crustáceos conhecidos. Os decápodes distinguem-se dos outros malacóstracos por possuírem os três apêndices torácicos modificados como maxilípedes, sendo os restantes similares a pernas, de onde derivou o nome decápoda (Barnes, 1984).

A subfamília Penaeinae, possuía cerca de 15 gêneros, porém, uma nova classificação vem subdividindo o gênero *Penaeus* em cinco novos gêneros (*Litopenaeus*, *Marsupenaeus*, *Farfantepenaeus*, *Fenneropenaeus* e *Melicertus*), Essas novas classificações foram baseadas em características biogeográficas e morfológicas (Burukovskii, 1985; Pérez-Farfante e Kensley, 1997).

Os camarões do gênero *Penaeus* constituem um diverso e abundante grupo bentônico encontrado nas águas tropicais e subtropicais em todo o

mundo (Baldwin *et al.* 1998). No Brasil, podemos encontrar pelo menos quatro espécies de camarões peneídeos: *L. schmitti*, *F. subtilis*, *F. paulensis* e *F. brasiliensis*. A espécie de camarão marinho *L. vannamei*, também conhecida popularmente como camarão branco, é exótica no Brasil. Esta espécie é nativa do Oceano Pacífico onde tem uma ampla distribuição na porção, desde o norte do México até o norte do Peru (Perez-Farfante & Kensley, 1997). Ela habita lagoas de costais e costas abertas até 70 metros de profundidade. Seu ciclo de vida consiste em um estágio larval planctônico oceânico, um estágio de pós larva e de um juvenil estuarino, retornando após este estágio para o ambiente marinho, para início da maturação e desova (Valles-Jimenez *et al.*, 2005).

O cultivo desta espécie baseia-se praticamente em 2 fases: uma é a larvicultura, onde centros especializados produzem as larvas e a outra é a fase de engorda, onde as pós larvas são destinadas as fazendas de engorda e onde ficarão até atingirem tamanho e peso ideais para comercialização (Freitas, 2003).

Taxonomicamente *L. vannamei* é classificado:

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea (Pennant, 1777)

Classe Malacostraca (Latreille, 1806)

Subclasse Eumalacostraca (Grobber, 1806)

Superordem Eucaria (Calman, 1904)

Ordem Decapoda (Latreille, 1803)

Subordem Dendrobranchiata (Bate, 1888)

Superfamília Penaeoidea (Rafinesque, 1815)

Família Penaidae (Rafinesque, 1815)

Subfamília Penaeinae (Dana, 1852)

Gênero *Litopenaeus* (Pérez Farfante e Kensley, 1997)

Espécie *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)



Figura 1: Exemplar da espécie *Litopenaeus vannamei*

## Estudos genéticos na aqüicultura

Vários estudos já demonstraram que a genética pode ajudar no melhoramento da produção de animal e vegetal. Além do melhoramento genético clássico, no qual são utilizadas ferramentas da genética quantitativa, o avanço da biologia molecular permitiu também o acesso a informações importantes sobre genes de interesse e constituição genética de uma população e/ou espécies de interesse comercial (Liu, 2006).

Muitos estudos estão buscando caracterizar a estrutura genética de populações, identificando genótipos de interesse e locos economicamente importantes para auxiliar na seleção e controle de cruzamentos específicos (Liu, 2006).

Vários tipos de marcadores genéticos podem ser utilizados nos estudos genéticos aplicados à aqüicultura. Antigamente os mais usados eram as aloenzimas e mtDNA, mais recentemente, no entanto, novos marcadores, tais como *Restriction Fragment Length* (RFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Simple Sequence Repeats* (SSR), *Single Nucleotide*

*Polymorphism* (SNP) e *Expressed Sequence Tags* (EST) passaram a ser utilizados (Liu, 2006).

Marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. Eles podem ser detectados por tecnologias de análise molecular. A função de um marcador, bem como de sua seqüência de nucleotídeos, é geralmente desconhecida, embora em alguns casos possa ter acesso a essa informação (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Dentre as várias classes de marcadores conhecidas, os microssatélites têm sido os mais amplamente utilizados em estudos genéticos, incluindo o melhoramento genético e a genética da conservação. Algumas características facilitam a aplicação desses marcadores, como o fato de serem co-dominantes e multialélicos, terem alta reprodutibilidade e resolução e serem baseados na Polymerase Chain Reaction (PCR) (Scholötterer, 1998).

Os microssatélites, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats* (SSR) ou *Short Tandem Repeats* (STR), são regiões repetitivas de DNA compostas por pequenos *motifs* de 1 a 6 nucleotídeos, repetidos em tandem, ou seja, lado a lado. Eles encontram-se dispersos nos genomas de eucariotos e procariotos (Field and Wills, 1996; Tóth *et al.*, 2000) e podem ser encontrados dentro de genes em regiões codantes, íntrons e regiões não codantes (Liu, 2006). Podem ser classificados de acordo com o número de nucleotídeos nas unidades repetitivas (*motifs*), podendo ser mononucleotídeos, dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos. De acordo com sua composição, podem ser perfeitos (quando não se encontram interrompidos por nenhuma base, ex: ATATATAT), imperfeitos (quando apenas uma base se encontra entre os *motifs*, ex: ATAT[C]ATAT), interrompidos (quando uma pequena seqüência se encontra dentro dos *motifs*, ex: ATAT[CGTG]ATAT) ou compostos (quando dois microssatélites adjacentes são encontrados, ex: ATATATCTCTCT) (Oliveira *et al.* 2006).

A taxa de mutação dos microssatélites pode variar de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  por geração, sendo significativamente mais alto que a taxa de substituição de bases. Um dos mecanismos de variação proposto para a alta diversidade de alelos dos locos SSRs é o *slippage*. Neste mecanismo é assumido que durante a replicação do DNA há um deslizamento da proteína responsável pela a replicação, a DNA polimerase, na fita molde, copiando mais de uma vez um mesmo *motif* ou deixando de copiá-lo, aumentando ou diminuindo, respectivamente, o número de *motifs* (Scholötterer, 1998).

Devido a tais características, os marcadores microssatélites vêm sendo utilizados como uma importante ferramenta para acessar a estrutura genética de diversas populações de organismos aquáticos cultivados, incluindo camarões. Wolfus *et al.* (1997) utilizaram microssatélites para analisar a variabilidade genética em famílias de *L. vannamei* derivadas de populações de camarões SPF (*Specific Pathogen Free*) e encontraram uma baixa variabilidade genética, com diferentes níveis de variação entre populações que variavam consideravelmente na performance de crescimento e na susceptibilidade a doenças.

Outro estudo realizado com microssatélites em *L. schmitti* (Bierne *et al.* 2000) evidenciou a relação entre o nível de heterozigiosidade de alguns locos microssatélites e a taxa de crescimento em populações cultivadas. Cruz *et al.* (2004) utilizaram dois locos microssatélites para monitorar os níveis de diversidade genética em duas gerações de *L. vannamei* em um programa de cruzamento seletivo. Luvesuto *et al.* (2007) investigaram a variabilidade genética em três gerações de *L. vannamei* cultivados, utilizando quatro locos microssatélites, encontrando um acentuado déficit de heterozigotos, porém não identificando uma significativa perda na variabilidade genética ao longo das três gerações estudadas.

De acordo com Freitas & Galetti (2002) o conhecimento da estrutura genética dos estoques de *L. vannamei* existentes no país é um passo importante para a sustentabilidade da atividade de cultivo dessa espécie exótica. Tal conhecimento poderia ajudar a decidir a introdução de um novo pool genético quando necessário, contribuindo, ainda para o

desenvolvimento de outras estratégias de manejo baseadas na identificação de locos de interesse econômico (QTLs e ETLs) e também em modelos de seleção assistida por marcadores. Obviamente que há ainda uma lacuna entre a aplicação dessas abordagens na indústria de camarão brasileira. Contudo, é sabido que métodos de seleção baseados exclusivamente em características fenotípicas, na utilização de um número reduzido de reprodutores e na prática da endogamia podem promover um significativo aumento na similaridade genética das populações cativas, levando a uma maior susceptibilidade a doenças e prejudicando tanto o desenvolvimento quanto o tamanho final do camarão (Luvesuto et al, 2007).

Alguns estudos realizados no Brasil com diversas classes de marcadores moleculares mostraram que estratégias de manejo podem ser desenvolvidas com base no diagnóstico genético das populações cultivadas. Um acompanhamento da diversidade genética em cinco gerações cultivadas de *L. vannamei* foi realizado por Freitas & Galetti. (2005) com marcadores de RAPD, onde se verificou um aumento progressivo na similaridade entre as gerações. Magalhães *et al.* (2007) também utilizaram-se da técnica de RAPD para avaliar a variabilidade genética de estoques comerciais do camarão *L. vannamei* em Canavieiras, BA, encontrando uma considerável taxa de endogamia entre eles. Freitas *et al.* (2007), utilizaram a técnica de RAPD para analisar a diversidade genética dentro e entre diferentes estoques de *L. vannamei* encontrando uma perda visível da variabilidade genética dentro das linhagens e em alguns casos chegam a compartilhar uma origem comum.

Já De Francisco & Galetti (2005) usaram marcadores de DNA mitocondrial para estimar a distância genética entre estoques dessa mesma espécie não encontrando divergência significativa entre os estoques utilizando a região 16S rRNA gene.

## **OBJETIVOS**

## Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo principal caracterizar marcadores microssatélites eficientes para o camarão marinho *L. vannamei* através da construção de uma biblioteca genômica parcial enriquecida e testar a de transferibilidade dos locos caracterizados como polimórficos para *L. vannamei* em cinco importantes espécies de camarões marinhos nativa à Costa Brasileira.

Além disso, uma análise para caracterização da estrutura genética de duas famílias de *L. vannamei*, submetidas a um programa de melhoramento genético para caracteres divergentes, e utilizadas como referência para a construção de um mapa genético para essa espécie, foi feita visando-se avaliar os níveis de diversidade e distância genética destas e o comportamento dos locos caracterizados em relação à presença de alelos nulos, artefatos e imperfeições da técnica.

## Objetivos Específicos

Foram estabelecidos como objetivos específicos:

- Isolar e caracterizar seqüências de microssatélites no genoma da espécie *L. vannamei* através da construção de uma biblioteca genômica parcial enriquecida.
- Validar locos microssatélites obtidos de regiões arbitrárias do genoma de *L. vannamei* em uma amostra composta por exemplares desta espécie provenientes de diferentes estoques cultivados.
- Avaliar a transferibilidade destes locos em cinco espécies de camarões taxonomicamente relacionadas: *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Xiphopenaeus kroyeri* e *Rimapenaeus constrictus*, realizando as

reações de PCR em pelo menos três exemplares de cada uma das espécies mencionadas.

- Determinar a diversidade e distância genética de duas famílias de referência de *L. vannamei*, e avaliar a presença de alelos nulos, *stutters* e erros de genotipagem, nos dados produzidos para os locos validados.

## APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS

A apresentação dos resultados encontra-se dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo relata os dados obtidos na caracterização e validação de marcadores microssatélites para a espécie de camarão marinho *L. vannamei* através da construção de uma biblioteca genômica parcial enriquecida de acordo com o método desenvolvido por Hamilton *et al.* (1999) e a transferabilidade destes locos em outras cinco espécies de camarões marinhos nativas a costa brasileira.

No segundo capítulo foram analisados os níveis de diversidade genética de duas famílias de *L. vannamei* desenvolvidas pelo Núcleo de Genética do Laboratório de Larvicultura Aquatec. Além disso, procuramos avaliar a presença de *stutters* e/ou *dropout* e a frequência de alelos nulos nestas duas famílias utilizando os métodos estatísticos disponíveis no programa Micro Checker (Oosterhout *et al.*, 2004).

## **CAPÍTULO I**

# **PROSPECÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES EM *LITOPENAEUS VANNAMEI* E TRANSFERABILIDADE EM ESPÉCIES RELACIONADAS**

# 1.MATERIAL E MÉTODOS

## 1.1 Extração e quantificação das amostras de DNA

Amostras de pleópodos (segundo conjunto de apêndices) de *L. vannahmei* foram submetidas à extração de DNA utilizando-se tampão salino como descrito por Aljanabi e Martinez (1997).

Um pleópodo de cada indivíduo foi macerado em nitrogênio líquido em tubo plástico (2 ml), com o auxílio de um bastão de vidro e em seguida foram adicionados, ao tecido já macerado, 200µl de solução tampão salino (NaCl 0,4M; Tris-HCL 10mM pH=8,0 e EDTA 2mM pH=8,0), 80µl de SDS 20% (Cf=2%) e 16µl de Proteinase K (20mg/ml). Posteriormente, todo o material foi incubado em banho maria a 55°C por aproximadamente 2 horas, homogeneizando-se o material a cada 25 minutos.

Terminado o tempo de incubação, adicionou-se 300µl de NaCl 6M e levou-se o tubo ao vortex por 30 segundos à velocidade máxima. Este foi centrifugado a 13.000rpm por 30 minutos e o sobrenadante formado foi retirado e transferido para um novo tubo. Em seguida, igual volume de isopropanol foi adicionado ao sobrenadante e agitado vagarosamente. Centrifugou-se novamente o material por 30 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante, desta vez, foi descartado. O *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado primeiramente com etanol 70% e em seguida com etanol 100%. Posteriormente o material foi levado à estufa para secagem a 50°C por 30 minutos para total evaporação do etanol. Depois de seco, o pellet foi ressuscitado em 100µl de TE e 2µl de RNase (20mg/ml), permanecendo overnight em temperatura ambiente. No dia seguinte, o DNA eluído foi armazenado em freezer a -20°C até sua quantificação. A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose 1%, comparando-se amostras de 1µl dos DNA extraídos com um marcador de peso molecular conhecido, Low DNA Mass<sup>TM</sup> (Invitrogen Life Technologies).

## 1.2 Isolamento e caracterização dos microssatélites

### 1.2.1 Construção de biblioteca parcial enriquecida

A construção da biblioteca genômica parcial enriquecida foi feita utilizando-se *beads* magnéticos de acordo com o método desenvolvido por Hamilton *et al.* (1999). A técnica baseia-se na seleção de fragmentos de DNA, que possam conter microssatélites, pela hibridização sondas oligonucleotídeos biotiniladas de seqüências repetitivas conhecidas e recuperadas com *beads* magnéticos como descrito a seguir:

### 1.2.2 Digestão do DNA

Inicialmente, 20 $\mu$ l de duas amostras de DNA a 200ng ,foram digeridas separadamente, uma com enzima de restrição *Bst*UI e outra *Rsa*I (GE Healthcare). A solução de digestão foi preparada conforme descrito a seguir.

Reagentes	Volumes
BSA 100x	0,25 $\mu$ l
NaCl 5M (Cf 50mM)	0,25 $\mu$ l
Tampão 2	2,5 $\mu$ l
<i>Xmn</i> I	1,0 $\mu$ l
<i>Bst</i> UI ou <i>Rsa</i> I	1,0 $\mu$ l
Volume Final	5,0 $\mu$ l

As duas soluções de digestão, com *Bst*UI e com *Rsa*I, foram mantidas em banho a 48°C e 37°C, respectivamente, por 12 horas. Passado o período de digestão, todo o conteúdo do tubo foi aplicado em gel de agarose (1%),

e a partir da comparação com o marcador *1kb plus ladder invitrogen* foram selecionados fragmentos de interesse (400 a 1200), a partir da retirada de pedaços do gel cortados especificamente nessas regiões. Os pedaços de géis contendo os fragmentos de interesse foram colocados em tubos separadamente para *Bst*UI e *Rsa*I e purificados com o Kit *Wizard SV gel and PCR clean-up System (PROMEGA)*.

### 1.2.3 Ligação dos adaptadores

Ao DNA digerido purificado, foram ligados adaptadores, também chamados *linkers*, cujas seq ncias estão discriminadas a seguir. Os *linkers* foram ligados em ambas as extremidades dos fragmentos disponibilizando seq ncias conhecidas para, assim, realizar ampliações por PCR subseqüentes.

---

5' – GTT TAA GGC CTA GCT AGC AGA ATC – 3'

3' – CAA ATT CCG GAT CGA CGA TCG TCT TAG AAA- 5' + (4P)

---

A rea o de liga o foi seguida conforme descrito a baixo com todo o conteúdo obtido com a elui o e mantido incubado a 16 C overnight.

Reagente	Volume
<i>linker</i> (dupla fita)	7,0�l
10x tampão da DNA ligase	1,5�l
DNA ligase	2,0�l
�gua Milli-Q	4,5�l
Volume final	15,0�l

#### 1.2.4 Hibridização das sondas biotiniladas

Os fragmentos de DNA já com as extremidades ligadas aos *linkers* foram hibridizados a sondas biotiniladas de seqüências repetitivas para microssatélites tetranucleotídeos são elas: (AAAC)<sub>6</sub>, (AAAG)<sub>6</sub>, (AATC)<sub>6</sub>, (AATG)<sub>6</sub>, (ACCT)<sub>6</sub>, (ACAG)<sub>6</sub>, (ACTC)<sub>6</sub> e (ACTG)<sub>6</sub>. A reação de hibridização descrita abaixo foi realizada em termociclador programado para uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de uma diminuição para 70°C e posteriormente 99 quedas sucessivas de 0,2°C na temperatura a cada 5 segundos, até atingir a temperatura de 50,2°C 40°C, permanecendo a esta temperatura por 10 minutos e em seguida passando por 20 quedas de 0,5°C a cada 5 segundos e permanecendo a 15°C após o término deste período.

---

25,0µl	2x Solução de hibridização (12x SSC 0,2% SDS)
5,0µl	Sondas biotiniladas (mix com 10µM de cada sonda)
10,0µl	DNA ligado aos <i>linkers</i>
/10,0µl	Água Milli-Q
<hr/>	
50,0µl	Volume Total
<hr/>	

#### 1.2.5 Captura dos fragmentos

A captura do DNA enriquecido foi realizada com o Kit *Streptavidin Magnetsphere Paramagnetic Particles<sup>TM</sup>* (Promega) conforme especificações do fabricante: um tubo de *beads* foi ressuspensionado até ficar homogêneo e então colocado na coluna magnética. Quando todos os *beads* se concentraram na lateral do tubo, atraídos pelo imã, foi então retirado o sobrenadante, tomando-se o cuidado para não retirar os *beads* (Streptavidin). Este passo foi repetido mais três vezes, adicionando-se 300µl

de 0,5XSSC. Uma última lavagem foi feita com 100µl de 0,5XSSC e o sobrenadante foi totalmente descartado. Posteriormente 50µl de DNA+sondas foram misturados aos *beads* por cerca de dois minutos e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Depois de decorrido este tempo, o tubo foi recolocado na coluna magnética até que os *beads* se deslocassem totalmente para a lateral do tubo e o sobrenadante se tornasse totalmente transparente. Em seguida o sobrenadante foi descartado e mais quatro lavagens com 0,1XSSC foram feitas, sendo que na última lavagem, após o descarte do sobrenadante, o material restante do tubo (DNA+*beads*) foi ressuscitado em 100µl de água *Milli-Q* e recolocado na estante magnética. Este DNA ressuscitado foi transferido para um novo tubo, sendo este passo repetido mais uma vez, tendo um volume final de 200µl. Posteriormente, 25µl de acetato de sódio 3M e 550µl de isopropanol foram adicionados e o material permaneceu *overnight* a 20°C.

No dia seguinte o DNA foi centrifugado por quinze minutos, a 13.000rpm e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200µl de etanol 70% e novamente centrifugado por dez minutos a 13.000rpm. O sobrenadante foi descartado mais uma vez e deixado secar em estufa a 37°C para evaporação do etanol. Ao *pellet* formado, foram adicionado 25µl de TE (Tris 1M; EDTA 0,5M; H<sub>2</sub>O).

#### *1.2.6 Amplificação dos fragmentos de DNA enriquecido*

Após a captura dos fragmentos de DNA contendo possíveis seqüências microssatélites, uma reação de PCR foi realizada para aumentar a quantidade destes fragmentos para posterior clonagem dos mesmos. A PCR foi feita usando-se o *linker* não fosfatado como *primer*, complementar ao *linker* fosfatado como descrito a seguir.

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

A reação foi feita em termociclador (PTC-200, MJ Research), programado para uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, e 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C e 1,5 minutos a 72°C com uma extensão final de 30 minutos. Posteriormente, o material permaneceu a 15°C até a realização da próxima etapa.

### 1.2.7 Ligação e clonagem do DNA

O produto da PCR enriquecido foi clonado utilizando-se o Kit *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector system I* (Promega). Para a ligação dos fragmentos aos vetores foi feita uma rea o que permaneceu a 4°C *overnight* como descrita a seguir.

Reagente	Quantidade
2X rapid ligation buffer	5 MI
pGEM-T	1 MI
DNA (produto da PCR)	3 $\mu$ L
T4 DNA ligase	1 MI
Volume total	10 $\mu$ L

No dia seguinte foi feita a transformação em bactérias *Escherichia coli*, cepa DH5 $\alpha$ , competentes, através de choque térmico. O material foi mantido em gelo por 20 minutos e, posteriormente, foi transferido rapidamente para o termobloco (*Eppendorf*) a 42°C, permanecendo neste por apenas 50 segundos. Em seguida, o material retornou para o gelo onde permaneceu por mais 2 minutos. Adicionou-se 200  $\mu$ L de meio de cultura líquido (Circle Grow) e por fim, este foi encubado a 37°C com agitação constante por 2 horas. Após este período foram feitas duas placas de petri contendo ~~25~~ 25  $\mu$ L de meio sólido (LB Agar + ampicilina), 125  $\mu$ L de X-Gal 2% e 250  $\mu$ L de IPTG 2,3% e 100  $\mu$ L de bactéria que foram devidamente espalhadas com alça de Drigalski e incubadas a 37°C overnight.

Após o crescimento em meio sólido, cada colônia positiva (branca) foi transferida, com o auxílio de um palito, para um megatiter (96 well), contendo meio líquido (LB + ampicilina). Esta foi incubada a 37°C com agitação por 22 horas.

### 1.2.8 Miniprep

Tendo as colônias crescidas em placa de 96 *well*, por 22 horas de incubação a 37°C, foi realizada a miniprep com o propósito de isolar o DNA clonado de cada uma delas. Para isso foi checada a uniformidade do crescimento das colônias. A placa foi centrifugada a 4000 R.P.M. a 20 °C por

6 minutos e então o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 240  $\mu\text{L}$  de GTE (Glucose 0,92%; EDTA 0,01M; Tris 0,026M) em cada poço, a placa foi selada com adesivo e levada ao vortex até ressuspender todas as células. Uma vez suspensas, foi centrifugada a 4000 R.P.M. a 20 °C por 6 minutos. O adesivo foi então removido e o sobrenadante foi descartado. A placa foi virada para baixo sobre o papel absorvente para retirar todo o excesso. Novamente foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de GTE em cada poço, a placa foi selada com adesivo fino e levada ao vortex até ressuspender todas as células. Dessa suspensão, foram transferidos 60  $\mu\text{L}$  para uma placa nova de fundo em *U* na qual foram adicionado 5  $\mu\text{L}$  de RNase (10 mg/ml) e 60  $\mu\text{L}$  da solução de NaOH/SDS (NaOH 0,2M; SDS 1%). Com adesivo fino a placa foi selada e invertida 10 vezes para homogeneizar a suspensão. Esta permaneceu à temperatura ambiente por 10 minutos. Passado esse tempo foi dado um pulso a 700 R.P.M. e adicionado 60  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio (KOAc 3M) a 4°C. A placa foi selada novamente e invertida 10 vezes para homogeneizar a suspensão e deixada novamente à temperatura ambiente por 10 minutos. Passado esse tempo, um pulso a 700 R.P.M foi dado, o adesivo foi removido e a placa foi deixada em estufa a 90° C por 30 minutos. Logo após este procedimento a placa foi colocada em gelo por 10 minutos e centrifugada a 4000 R.P.M. a 20°C por 10 minutos. Acabada a centrifugação, todo o volume do sobrenadante foi transferido para uma nova placa com filtro, a qual foi centrifugada a 4000 R.P.M. a 20°C por 6 minutos. O filtro foi removido e acrescentou-se 110  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado. A placa foi novamente selada com adesivo e misturada por inversão 10 a 20 vezes. Centrifugou-se a 4000 R.P.M. a 20°C por 45 minutos e o sobrenadante foi removido. Foram acrescentados 200 $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado, centrifugando-se novamente o material a 4000 R.P.M. a 20°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e a placa invertida sobre um papel absorvente. Posteriormente o material permaneceu secando na estufa a 50°C por 10 minutos, quando o DNA foi eluído com 20  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O e mantido a 4°C *overnight*.

### 1.2.9 Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada com o Kit *DyEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham biosciences GE Healthcare), seguindo-se os especificações do fabricante. As amostras foram analisadas em seqüenciador automático, modelo ABI 377 (Perkin Elmer) e o método realizado foi o descrito por Sanger *et al.* (1977).

### 1.3 Caracterização dos microssatélites construção dos *primers*

Os fragmentos seqüenciados, foram submetidos à análise utilizando-se o programa computacional CID (Freitas *et al.*, 2008) disponível na website <http://www.shrimp.ufscar.br/cid/index.php>. Todas as seqüências foram renomeadas pelo PHRED e posteriormente analisadas em formato multiFASTA, seguindo-se os parâmetros *default* do programa. As seqüências que apresentaram regiões repetitivas e possibilitaram o delineamento dos pares de *primers* foram selecionadas para validação.

Os *primers* foram sintetizados acrescentando-se à extremidade 5' dos *primers forward* uma seqüência de 18 pares de bases (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) complementar a seqüência universal M13 como descrito por Schuelke (2000).

### 1.4 Validação dos locos

Para a validação dos locos foram feitos vários testes de temperatura e concentrações de reagentes de PCR e DNA para estabelecimento do melhor perfil de amplificação. Com as concentrações iniciais de 1,25mM de dNTPs, 1x Taq *buffer*, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de Taq polimerase e 10pmoles de *primers*, foram testados as quantidades de DNA a 25, 50 e 100ng e temperaturas variando de 47°C a 63,5°C em termociclador *Mastercycle gradient* de 96 amostras (Eppendorf).

Os locos que não apresentaram um padrão de amplificação satisfatório foram submetidos a outros testes variando-se as concentrações de  $MgCl_2$  (2mM), Taq DNA *polimerase* (2U) e de *primer* (5 e 15pmoles). Os locos que continuaram apresentando padrão de amplificação insatisfatório em gel de agarose 2% não foram submetidos à genotipagem em seqüenciador automático.

### 1.5 Genotipagem dos alelos

Os locos que apresentaram padrão de amplificação satisfatório foram testados em 30 amostras de DNA de espécimes de *L. vannamei* provenientes de várias fazendas de cultivo. Nesta reação foi acrescentado o *primer* universal M13 (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') marcado com um fluoróforo específico (HEX, NED, FAM ou TET, Applied Biosystems Inc.). Para uma reação com volume final de 10 $\mu$ l foram usados: 1x *Taq buffer*, 1u de *Taq DNA polimerase*, 2pmoles de *primer forward*, 8pmoles de *primer reverse*, 8pmoles de *primer* M13 marcado, 200 $\mu$ M de dNTPs e 1,5mM de  $MgCl_2$  sendo o DNA variando pra cada loco. O programa de amplificação consistiu em: 5 minutos de desnaturação à 94°C, 30 ciclos de 30 segundos à 94°C, 45 segundos a  $T_M$  ótima para cada loco e 45 segundos à 72°C, seguidos por 10 ciclos de 30 segundos à 94°C, 45 segundos à 53°C e 45 segundos à 72°C, seguidos por uma extensão final de 10 minutos á 72°C.

Os produtos de PCR foram inicialmente analisados em gel de agarose 2% e posteriormente submetidos à genotipagem no Setor de Genotipagem do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) do Instituto de Biociências da Universidade do Estado de São Paulo ([http://genoma.ib.usp.br/doen\\_ataxias\\_espinocerebelarres.php](http://genoma.ib.usp.br/doen_ataxias_espinocerebelarres.php)) em seqüenciador *MegaBACE 1000 DNA Analysis System* de 96 capilares, utilizando o *software Genetic Profiler Suíte v.2.2* (Amersham Biosciences).

## **1.6 Análises estatísticas dos locos genotipados**

As frequências alélicas e genóticas e o número de heterozigotos e homozigotos esperados e observados foram calculados utilizando-se o *software* Genepop v. 3.4 (Raymond & Rousset 1995), disponível na website <http://genepop.curtin.edu.au/>. Correções seqüenciais de Bonferroni foram realizadas para testar a significância dos resultados obtidos (Rice, 1989).

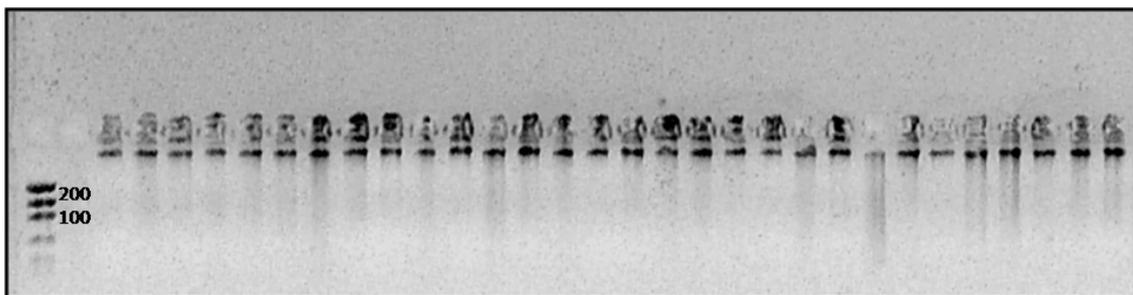
## **1.7 Transferabilidade de locos microssatélites**

Os locos que apresentaram padrões de amplificação polimórficos satisfatórios foram testados nas mesmas condições de PCR, antes padronizados para a espécie *L. vannamei*, em outras cinco espécies de peneídeos de ocorrência no litoral brasileiro: *L. schmitti*, *F. brasiliensis*, *F. paulensis*, *X. kroyeri* e *R. constrictus*.

## 2. RESULTADOS

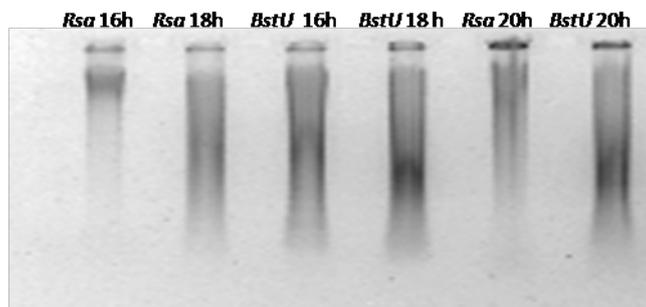
### 2.1 Prospecção de Marcadores Microssatélites

A metodologia de extração de DNA desenvolvida por Aljanabi e Martinez (1997) se mostrou eficiente quanto à concentração e integridade dos DNAs extraídos (Figura 2).



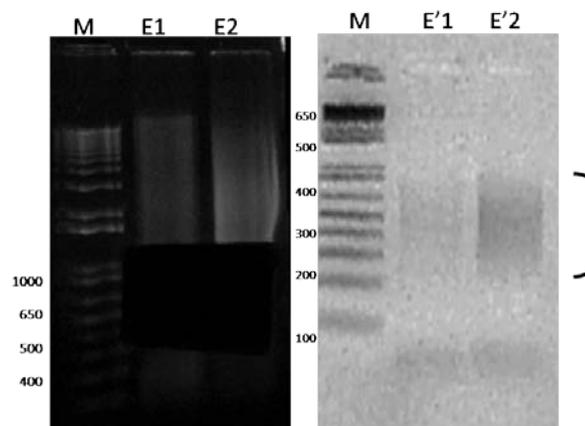
**Figura 2:** gel de agarose 1% para quantificação de 30 amostras de DNAs de *L.vannamei* obtidas com a metodologia de Aljanabi e Martinez (1997)

Para obtenção de um padrão de digestão do DNA eficiente, na construção da biblioteca genômica, foram feitos alguns testes com diferentes amostras de *L. vannamei* (4 $\mu$ g de DNA por amostra), variando-se o tempo de digestão (16, 18 e 20 horas) para duas enzimas de restrição *Bst*UI e *Rsa*I, o que demonstrou que, em geral, a enzima *Bst*UI apresentava um melhor padrão de digestão em gel de agarose 0,8% (Figura 3).



**Figura 3:** gel de agarose 0,8% evidenciando os padrões de digestão do DNA de *L. vannamei* obtidos com as enzimas de restrição *Bst*UI e *Rsa*I submetidos a 16, 18 e 20 horas de incubação.

A partir desses resultados foram feitas novas digestões com *Bst*UI com 16 horas de incubação. O produto de digestão foi analisado em gel de agarose 0,8%, e fragmentos compreendidos entre 400 e 1200pb foram recortados e eluídos do gel. Nesta etapa pode-se observar que houve uma diminuição significativa no tamanho dos fragmentos eluídos, provavelmente, decorrente de alguma possível degradação do material nas etapas posteriores à digestão (Figura 4).



**Figura 4:** Gel de agarose 1,5% evidenciando, marcador de peso molecular (M), os fragmentos eluídos do gel (E1 e E2) e o produto da reação de ligação dos fragmentos de interesse com os adaptadores dupla fita (E'1 e E'2). Observar que os fragmentos selecionados (400-1200pb), após realização dos procedimentos necessários, apresentaram tamanhos bem menores que o esperado.

Após a hibridização com sondas biotiniladas e captura dos fragmentos contendo possíveis regiões repetitivas, foi feita a transformação e clonagem em bactérias competentes, sendo posteriormente selecionadas 192 colônias recombinantes para serem seqüenciadas. A análise das seqüências no programa CID demonstrou que 63 clones apresentavam SSRs, sendo possível identificar 68 locos microssatélites (28 perfeitos e 40 compostos) e estabelecer pares de *primers* para cerca de 50% deles. Apesar da presença de repetições relativamente longas terem sido observadas, foi possível construir pares de *primer* para grande parte delas (tabela 1).

Todos os clones contendo SSRs foram alinhados entre si para verificar a presença de clones idênticos. Menos de 10% do total de locos com pares de *primer* estabelecidos apresentaram réplicas, e por tanto um baixo nível de redundância. Os locos também foram submetidos a blasts no banco de dados do NCBI (GenBank) para identificação de possíveis redundâncias. Após esta análise, foram selecionados 22 locos SSRs não redundantes para *L. vannamei*. Destes 22 locos, nove eram perfeitos não interrompidos, (cinco dinucleotídeos e quatro tetranucleotídeos), quatro eram perfeitos interrompidos (três dinucleotídeos e um trinucleotídeo) e nove locos eram compostos, com seis deles interrompidos (tabela 2). Apesar de microssatélites mononucleotídeos terem sido detectados, estes, no entanto, não foram selecionados para validação populacional.

Dos 22 pares de *primer* testados em reações de PCR de gradiente de temperatura, 12 apresentaram padrões de amplificação satisfatórios (Figura 5). Os locos A10-0, A04-2, D06-2, F03-2, F07-2 e G05-1 não foram amplificados em nenhum dos testes realizados e os locos B11-1, F01-1, F05-2 e G03-2 apresentaram padrão de bandas múltiplas.

Após estas análises iniciais, os locos B07-1, C07-2, C08-2, D03-2, D09-2, D11-1, E07-2, F05-1, G09-2, G10-1, H07-2 e H11-2, que apresentaram padrões de amplificação satisfatória, foram testados em um maior número amostral (Figura 6).

Após a genotipagem em seqüenciador automático de 30 indivíduos para cada loco, apenas os locos G09-2 e H11-2 apresentaram padrão monomórfico para todos os indivíduos analisados. Os demais apresentaram-se polimórficos, com número máximo de alelos variando de 2 para o loco E07-2 à 20 para o loco D11-1. Os níveis de heterozigosidade observadas variaram de 0,17 para o loco D09-2 a 0,88 para o loco C07-2. Apenas quatro locos apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que o loco C07-2 apresentou excesso de heterozigotos e os locos D03-2, D09-1 e D11-1 déficit de heterozigotos (Tabela 3).

Tabela 2: Relação dos locos SSRs-beads caracterizados e selecionados, descrevendo a composição dos motivos, sua classificação e sua categorização em composto e perfeito.

Loci	Nomenclatura	SSR	Composição dos <i>motifs</i>	Categorização
A10-0	L van 13	(A)7(AAAG)3*..(A)6..(AG)4	Mono, di, tetra	Composto Interrompido
B07-1	L van 14	(AGAC)5	Tetra	Perfeito
B11-1	L van 15	(GAGAGC)5(GA)28	Di, hexa	Composto
D11-1	L van 16	(AGAC)5..(CAGG)5	Tetra	Composto Interrompido
F05-1	L van 17	(TTCTT)5..(CT)10	Penta, di	Composto Interrompido
G05-1	L van 18	(CA)18	Di	Perfeito
G10-1	L van 19	(TC)6..(CT)6..(TC)7	Di	Composto Interrompido
A04-2	L van 20	(TG)24ta(TG)17..(GT)6..(GT)21	Di	Composto Interrompido
C07-2	L van 21	(CT)23ca..(CT)6	Di	Perfeito Interrompido
C08-2	L van 22	(ACAG)5g(CAGA)6	Tetra	Composto
D03-2	L van 23	(GA)12at(G)11	Mono, di	Composto
D06-2	L van 24	(AGAC)5	Tetra	Perfeito
D09-2	L van 25	(TC)6	Di	Perfeito
E07-2	L van 26	(GA)8..c(GA)8	Di	Perfeito Interrompido
F01-2	L van 27	(AAG)14..(AAG)6	Tri	Perfeito Interrompido
F03-2	L van 28	(TG)32tata(TG)6	Di	Perfeito Interrompido
F05-2	L van 29	(AGTG)7agtt(AGTG)9..(GA)9(AGAGAC)9*..(AG)12	Di, tetra, hexa	Composto Interrompido
F07-2	L van 30	(GA)42	Di	Perfeito
G03-2	L van 31	(TCAC)5	Tetra	Perfeito
G09-2	L van 32	(GA)14	Di	Perfeito
H07-2	L van 33	(TCAC)5	Tetra	Perfeito
H11-2	L van 34	(AC)24	Di	Perfeito

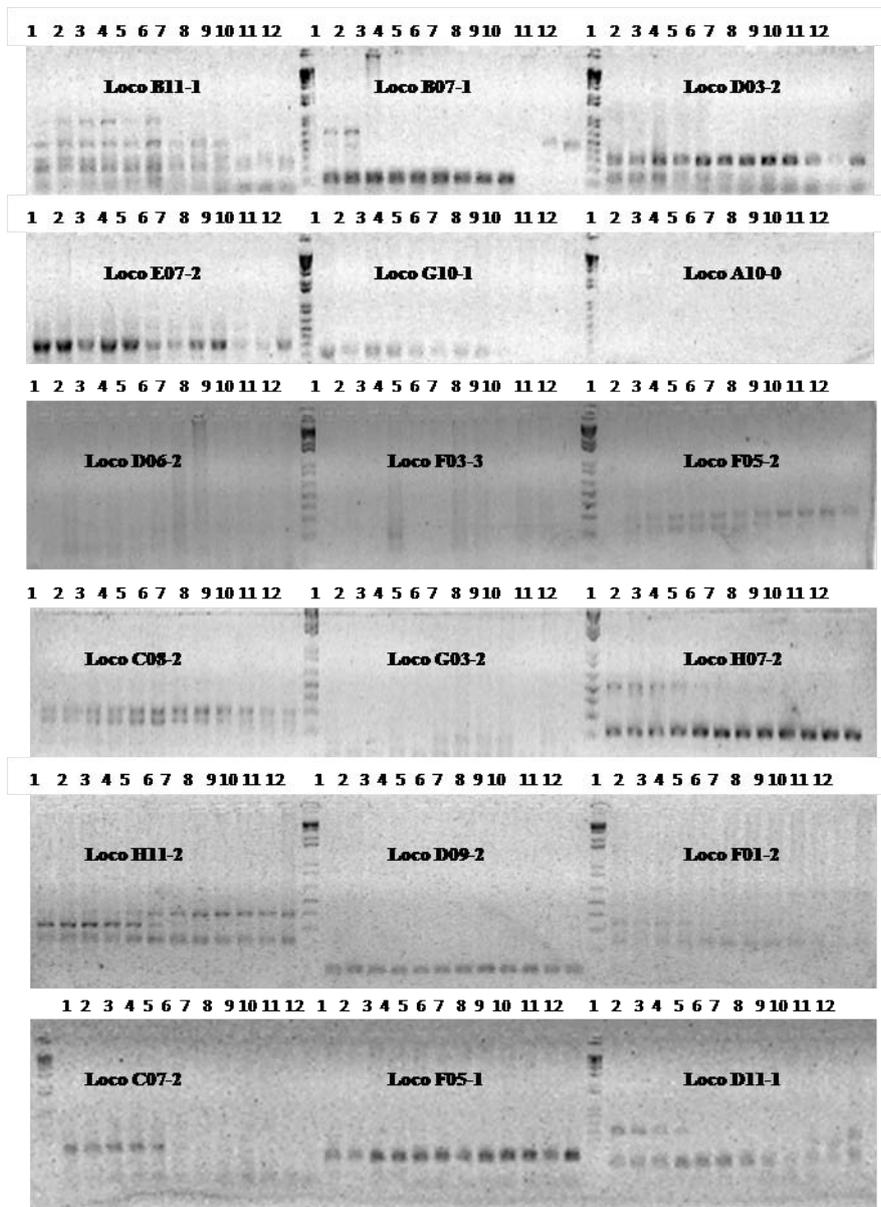


Figura 5 Géis de agarose evidenciando os produtos de amplificação obtidos para os testes de gradiente de temperatura, realizados com 12 temperaturas, para alguns dos locos SSRs-*beads* estabelecidos para a espécie *L. vannamei*.

Tabela 1: Caracterização dos dados obtidos pelo programa CID para prospecção de SSRs-beads a partir da análise de fragmentos de DNA com 400-1200pb obtidos via construção de bibliotecas genômicas enriquecidas da espécie *L. vannamei*.

ID	Número de SSRs	Tipo	SSR	Motif (pb)	Início	Fim	PRIMER FORWARD (5'-3')	TM (°C)	size	PRIMER REVERSE (5'-3')	TM (°C)	size	PRODUTO (bp)
A01-1	1	c	(CT)22a(TC)11..(TC)6(AC)7	113	8	120							
A01-1	2	p2	(TC)6	12	223	234							
A04-1	1	c	(AG)9..(TC)8	106	15	120							
A06-1	1	p2	(CA)10	20	266	285							
A07-1	1	c	(CT)22..(TC)8..(TC)6(AC)7	113	8	120							
A07-1	2	p2	(TC)6	12	223	234							
B05-1	1	c	(TTTC)6..(TCTT)6..(TC)7g(TC)50	191	84	274							
B07-1	1	p4	(AGAC)5	20	199	218	AGACAAAGGGAAGGAGAGAC	54,976	20	GGCTTATCCATGGTTGTT	54,979	19	115
B10-1	1	c	(TC)6tt(TC)16	46	270	315							
B11-1	1	c	(GAGAGC)5(GA)28	86	234	319	AAGGGGGAGAAAGTTAGATG	54,982	20	AGAGATAAGGCCGCTTGT	55,02	18	210
B12-1	1	c	(AG)9ac(AG)7aa(AG)6aa(AG)7 <sup>a</sup> a(AG)6g(GA)37..(GA)6t(AG)8..(AG)8	237	103	339							
C03-1	1	c	(AC)6..(TC)7..(CT)7	117	68	184							
C12-1	1	c	(GA)10a(AG)36..(AG)11..(GA)9..(AG)12	191	2	192							
D04-1	1	c	(TC)6tt(TC)16	46	270	315							
D06-1	1	c	(TCTG)6..(TC)6..(TC)6	89	243	331							
D08-1	1	c	(TG)15..(AGAT)5	141	43	183							
D11-1	1	c	(AGAC)5..(CAGG)5	47	48	94	CACCCGAAAGATATGAGAGA	55,3	20	TGGCTTCCCTTTGTTTATC	55,287	19	159
F05-1	1	c	(TTCTT)5ttctctctc(CT)10	55	61	115	GTACATGCCCTCACTCACT	55,127	20	GTCAAAGCGCCTTAGTTTA	55,065	20	254
F06-1	1	p2	(TG)6	12	191	202							
F12-1	1	c	(GT)11..(GT)7..(TG)10..(TG)10c(GT)27ggt(TG)7	183	77	259							
G02-1	1	c	(TG)9cg(GT)15..(AGAT)5	162	43	204							
G05-1	1	p2	(CA)18	36	32	67	ACACACACGCACACATAGAC	55,332	20	GTGGATGAGAGAGAGCCATA	55,277	20	167
G09-1	1	p2	(GA)6	12	1	12							
G10-1	1	c	(TC)6..(CT)6..(TC)7	93	207	299	GAGCAAATCTATGCGACAAT	55,486	20	GTAAAAAGCTTTGCGGGT	55,542	18	190
G11-1	1	p2	(AG)6	12	61	72	ACAGAAGCAGAAACAGAGACA	55,239	21	TGTTCGGAAGGTAATTATGG	55,195	20	178
H02-1	1	c	(AC)6..(AC)8	52	8	59							
H07-1	1	c	(GA)46..(GA)24	188	26	213							
H12-1	1	c	(GA)12..(GA)6	106	1	106							
A03-2	1	p2	(TC)26	52	168	219							
A04-2	1	c	(TG)24ta(TG)17..(GT)6..(GT)21	191	37	227	GTGCGTGAGTGAGTGTGT	53,404	18	TACACCAGCGCACATACA	55,429	18	235
A06-2	1	p4	(AGAC)5	20	150	169	AAGGGAGTGAGTGTGTGTGA	56,521	20	GGGGAAATGATGGAAGATTA	56,403	20	134
A10-2	1	p1	(T)11	11	108	118	GATATTACGTTGGCATCCAT	54,963	20	AGACAAACGCCTACAGACAT	54,877	20	131

10-2	2	p2	(AT)6	12	280	291	TTTGTCTGTCTGTCTATCTG	48,186	20	CGGTGTACATACAGGTATAA	48,538	20	209
A11-2	1	p2	(GA)25	50	1	50							
B03-2	1	c	(AC)18(AG)44..(GA)9..t(GA)9..(AG)6.. (ACAG)5	255	192	446							
B04-2	1	p4	(GCAG)5	20	32	51							
B06-2	1	c*	(AC)14(TCAC)24(CT)8*	139	7	145							
B09-2	1	p2	(TC)18	36	181	216							
C03-2	1	c	(AC)6..(AC)8	52	8	59							
C04-2	1	p2	(CA)10	20	266	285							
C05-2	1	c	(GAGT)5..(TG)43	151	108	258							
C07-2	1	p1	(T)10	10	53	62	AACAAGACCCCTGCTAACAAA	55,043	20	GTTCTGTGTGATAAGGTCGT	55,143	20	184
C07-2	2	c	(CT)23ca(CT)6	60	216	275	AGCATTTGTTTCATCTTCAGC	55,528	20	GAATGGAAAGAAGGAGGAAG	55,505	20	226
C08-2	1	c	(ACAG)5g(CAGA)6	45	262	306	TGTGTTGCTTGTGTTGCTACT	54,58	20	TTCCTTTTTCTCTCTAT	54,643	20	271
C09-2	1	c	(CTG)6(TC)42..(CT)7	131	12	142							
C10-2	1	c	(AG)26aac(AG)6	68	71	138	AGTGACCTTTTCGGTCAATA	54,792	20	TGACTGACTGACTGAGACACA	55,127	21	158
D02-2	1	c	(AC)6..(AC)8	52	8	59							
D03-2	1	c	(GA)12 <sup>a</sup> t(G)11	37	67	103	GCACGTCAGGAAGATTCTA	55,539	20	CCATTTCTCTTTCTTTCC	55,509	20	261
D05-2	1	c*	(AG)19..(ACAG)5(AG)8*	76	1	76							
D06-2	1	p4	(AGAC)5	20	150	169	AAGGGAGTGAGTGTGTGTA	56,521	20	GGGAAATGATGGAAGATTA	56,403	20	134
D08-2	1	c	(TC)8..(CT)24a(TG)10ta(TG)18..(GT)9	241	162	402							
D09-2	1	p2	(TC)6	12	304	315	TGGTATTGTGGTTGCTGTTA	55,081	20	AGAAGGTGAAACGTAATACTCG	55,359	22	111
E01-2	1	p2	(GA)7	14	78	91	TGGATACAGATGGTCACAAA	54,752	20	TCTCTGTCTCGCTCTCTC	54,704	20	277
E01-2	2	p2	(AG)20	40	234	273	CAGACAGACAGAGAGGGAGA	55,41	20	AGGACACCGAGTTTCTTTT	55,525	20	203
E03-2	1	c	(GTGA)26(GT)23	150	156	305							
E07-2	1	c	(GA)8..c(AG)9	105	130	234	CTGTGGCAGAATTTTCTCT	54,662	20	TGTCTCCGTTTATGTCCTCT	54,765	20	250
E09-2	1	c	(AGAC)5..(CAGG)5	47	48	94	CACCCGAAAGATATGAGAGA	55,3	20	TGGCTTCCCTTTGTTTATC	55,287	19	159
E10-2	1	c	(GA)24gg(GA)15a(AG)8..(GA)9..(AG)13	156	21	176							
F01-2	1	c	(AAG)14..(AAG)6	84	212	295	ACCACAAACAAGAAGAAGGA	54,817	20	GGGTGTGTTGGTAGTTTAGG	54,583	20	256
F02-2	1	p2	(AG)16	32	1	32							
F03-2	1	c	(TG)32tata(TG)6	80	74	153	TCTCTGTTTCCCTCTTCT	55,582	20	GTGCGATTAAACAAGGCA	55,74	18	180
F05-2	1	c*	(AGTG)7 <sup>a</sup> gtt(AGTG)9..(GA)9(AGAGAC)9 <sup>a</sup> ..(AG)12	232	89	320	AAGAGATAGACAGAATGAGGG	52,655	21	TATTGTCCTGTCCTCTC	56,894	18	280
F07-2	1	p2	(GA)42	84	52	135	TACTTCCCTTGTGACAAACC	55,12	20	GGGAAACTTTTCTTTGTCT	55,016	20	167
F10-2	1	p2	(GA)13	26	37	62	GGATAGAACCGGTAATCCAT	55,455	20	GCAAACATCAAAAAGGGA	55,38	20	159
G03-2	1	p4	(TCAC)5	20	124	143	CTTATTTTGTCAACCACGTT	55,171	20	CACGAATGAGTGAATGAGTG	55,003	20	131
G09-2	1	p2	(GA)14	28	216	243	GAGAAGATAAACAACGATGC	52,49	20	GGTTCAATTTGTGCGCATT	59,538	19	280
H07-2	1	p4	(TCAC)5	20	162	181	TTTGTCTGTCTGCCATCTG	54,485	20	GTTTCGTAATAATCCTCTCAA	54,441	20	211
H11-2	1	p2	(AC)24	48	45	92	ACGTTACACACACAGAGAG	54,481	20	GTACATATTTCCCGAGATTT	54,287	20	224

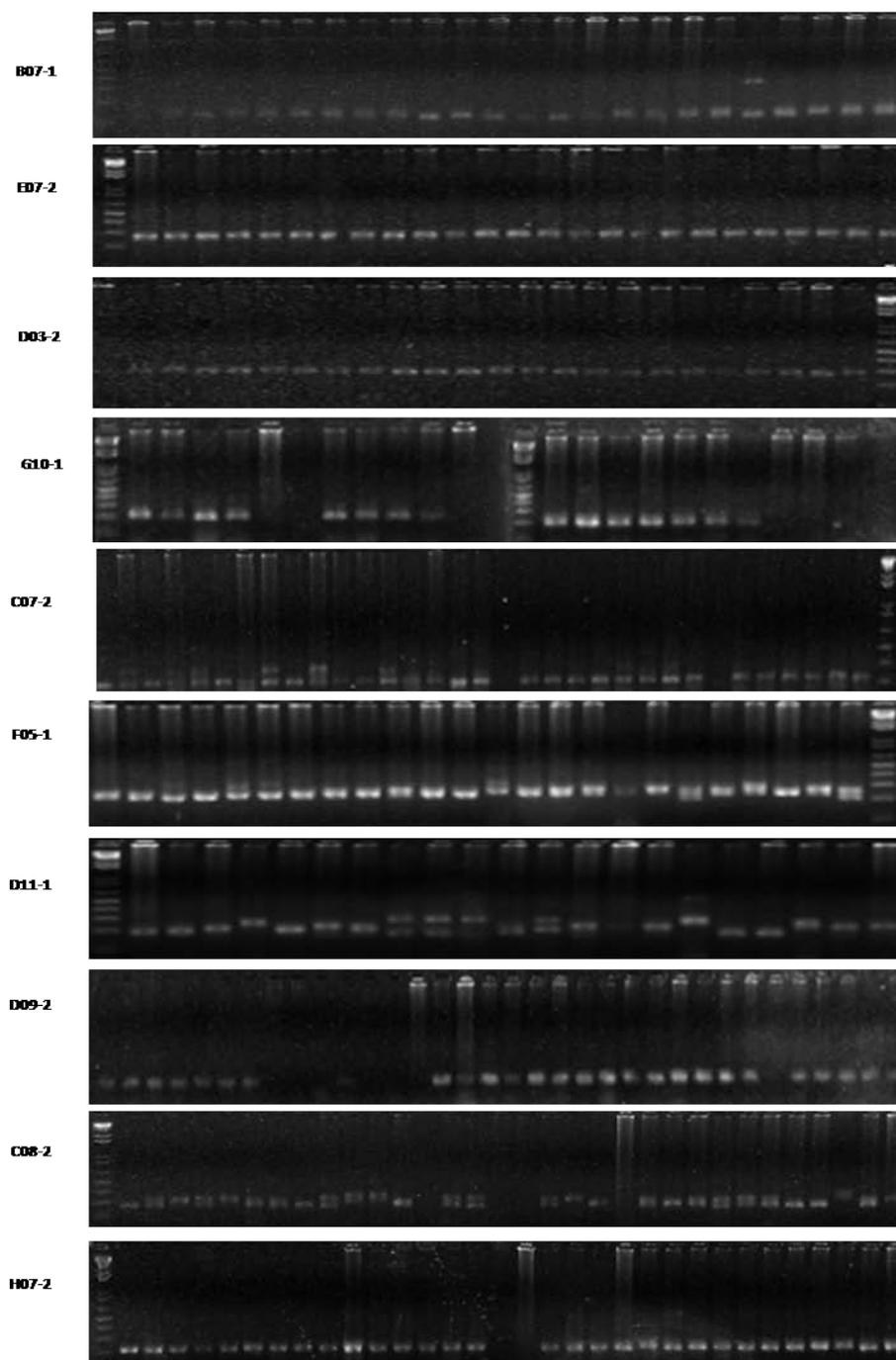


Figura 6: Géis de agarose 2%, evidenciando os produtos de amplificação obtidos para diferentes exemplares de *L. vannamei* utilizando-se locos B07-1, E076, D03-2, G10-1, C07-2, F05-1, D11-1, D09-2, C08-2 e H07-2 em reações PCR.

Tabela 3: Relação dos locos SSRs-beads validados e genotipados, descrevendo o motif do microsatélite, o número de alelos observados ( $N_a$ ), a amplitude de variação dos alelos, os níveis de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e os valores encontrados para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) calculados utilizando-se o programa *Genepop*, versão 3.4 ( $p \leq 0,005$ ).

Loco	Nomenclatura	PRIMER (5'-3')	Motivo	$T_a$ (°C)	$n_a$	alelos (bp)	$H_o$	$H_e$
B07-1	L van 14	F: AGACAAAGGGAAGGAGAGAC R: GGCTTATTCCATGGTTGTT	(AGAC)5	53	04	119-135	0,54	0,57
D11-1	L van 16	F: CACCCGAAAGATATGAGAGA R: TGGCTTCCCTTTGTTTATC	(AGAC)5..(CAGG)5	49,5	20	112-210	0,28 <sup>+</sup>	0,93
F05-1	L van 17	F: GTAACATGCCCTCACTACT R: GTCAAAAGCGCCTTAGTTTA	(TTCTT)5..(CT)10	50	17	220-329	0,77	0,83
G10-1	L van 19	F: GAGCAAATCTATGCGACAAT R: GTAAAAAGCTTTGCGGGT	(TC)6..(CT)6..(TC)7	49,5	05	208-222	0,46	0,70
mC07- 2	L van 21	F: AGCATTGTTCATCTTCAGC R: GAATGGAAAGAAGGAGGAAG	(CT)23..(CT)6	50	03	319-379	0,88 <sup>-</sup>	0,53
C08-2	L van 22	F: TGTGTTGCTTGTGTTGCTACT R: TTCCTTTTTCTCCTCTAT	(ACAG)5..(CAGA)6	51	17	258-318	0,75	0,88
D03-2	L van 23	F: GCACGTCAGGAAGATTCTA R: CCATTTCTCTTTCTTTCCC	(GA)12..(G)11	53	10	190-286	0,59 <sup>+</sup>	0,89
D09-2	L van 25	F: TGGTATTGTGGTTGCTGTTA R: AGAAGGTGAAACGTAATACTCG	(TC)6	47	06	125-135	0,17 <sup>+</sup>	0,32
E07-2	L van 26	F: CTGTGGCAGAATTTTCTCT R: TGTCTCCGTTTATGTCTCCT	(GA)8..(GA)8	53	02	249-265	0,59	0,42
H07-2	L van 33	F: TTTGTCTGTCTGTCCATCTG R: GTTCGTAAATCCTCCTCAA	(TCAC)5	51	03	234-250	0,25	0,28

(+) déficit de heterozigotos (-) excesso de heterozigotos

## 2.2 Transferabilidade dos locos microssatélites

Todos os locos que apresentaram-se polimórficos para *L. vannamei* foram testados nas cinco espécies nativas de camarões marinhos, utilizando-se os mesmo padrões de amplificação padronizados anteriormente para a espécie *L. vannamei*. Esta análise demonstrou que alguns locos podem ser eficientes também para essas espécies nativas utilizadas (Tabela 4). Todos os locos apresentaram amplificação para pelo menos uma das espécies testadas, sendo que o loco G10-1 amplificou em quase todas as espécies com exceção de *R. constrictus*. *Xiphopenaeus kroyeri* foi a espécie que menos obteve sucesso na transferabilidade dos locos testados, amplificando para apenas um loco (G10-1). Já a espécie *F. brasiliensis* foi a que apresentou uma maior transferabilidade, com resultados satisfatórios para 50% dos locos testados, seguida por *L. schmitti* com 40% de sucesso de amplificação.

Tabela 4: Resultados obtidos para os testes de transferabilidade dos locos microssatélites realizados em cinco espécies relacionadas nas mesmas condições de PCR estabelecidas para os locos SSRs-beads validados para *L. vannamei*.

Espécies	Loci									
	B07-1	D11-1	F05-1	G10-1	H07-2	C08-2	D03-2	D09-2	E07-2	C07-2
<i>Litopenaeus schmitti</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Rimapenaeus constrictus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-

### 3. DISCUSSÃO

A descrição de locos microssatélites em peneídeos, em geral, não costuma ser tão eficiente, uma vez que a literatura vem demonstrando que nestes organismos locos microssatélites costumam apresentar um número muito grande de repetições, o que inviabiliza a clonagem de fragmentos contendo ambas as regiões flangeadoras e, conseqüentemente, o delineamento de pares de *primers* adequados à amplificação do microssatélite isolado (Freitas *et al.*, 2008). Alguns autores chegam a sugerir que locos SSRs em peneídeos possuem até o dobro do tamanho daqueles encontrados no genoma de outros organismos.

No genoma de *L. vannamei* há ainda a presença de uma região repetitiva específica no genoma de peneídeos, denominada PVS1, na qual o motif CCTAA aparece repetindo inúmeras vezes. Segundo Bagshaw & Buckholt (1997), esta região PVS1 pode representar até 7% do genoma do camarão.

Em *L. vannamei*, Cruz *et al.* (2002) analisando 2 mil clones recombinantes, relataram a presença da repetição CCTAA em 42% dos 99 clones seqüenciados. Neste trabalho, 22 clones foram selecionados aleatoriamente, sendo que 16 (72%) continham microssatélites. Em outra análise, utilizando varredura com sondas repetitivas, foram selecionados 68 clones para seqüenciamento, sendo que 38 clones, ou seja, 55% aproximadamente continham 97 microssatélites com número de repetições maior que aqueles selecionados aleatoriamente (sem a utilização de sondas).

Devido a tal particularidade, alguns trabalhos têm prospectado locos SSRs em peneídeos, a partir da construção de bibliotecas genômicas baseadas em diversas classes de tamanhos de fragmentos, incluindo a seleção de SSRs com um pequeno número de repetições de sua unidade repetitiva, em geral, considerando duas e/ou três repetições para

seqüência di-, tri, tetra- ou penta-nucleotídica (Xu *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2002; Meehan *et al.*, 2003).

Em *L. vannamei*, por exemplo, Meehan, *et al.* (2003) construíram bibliotecas genômicas com fragmentos entre 150 a 800pb digeridos com a enzima Sau3AI. Foram obtidos 215 clones positivos, sendo que 173 (68,9%) possuíam de fato regiões microssatélites com *motifs* repetindo um mínimo de três vezes. Deste total, 136 (78,6%) continham ambas as regiões flangeadoras, possibilitando o delineamento dos pares de *primers*. Após a validação populacional, 93 locos (68%) apresentaram padrão de amplificação satisfatório em amostras de população cativas.

Apesar de, convencionalmente, a maioria dos trabalhos considerarem um mínimo de seis repetições para *motifs* dinucleotídeos e cinco para trinucleotídeos em diante, muitos trabalhos têm demonstrado que o número de repetições da unidade repetitiva nem sempre parece apresentar uma relação direta com o grau de polimorfismo detectado para um loco em uma população. Da mesma forma, o fato de um loco ser perfeito, imperfeito ou composto, também não parece ser um fator limitante do grau de polimorfismo que esse loco possa apresentar em um estudo de validação populacional.

Segundo Meehan, *et al.* (2003), o uso de microssatélites com unidades curtas de repetições pode apresentar uma alta variação alélica (11 alelos) e valores de heterozigosidade observada que podem chegar a 1,0 em populações de camarão cultivado.

No final da década de 90, Xu *et al.* (1999), já tinham chegado a resultados similares ao prospectar locos SSRs no camarão Tigre *Penaeus monodon*. Neste estudo foi observado um grande número de locos microssatélites perfeitos com grande número de repetições, inviabilizando os testes de validação populacional. Por outro lado, a utilização de locos compostos por mais de um tipo de motif contendo poucas repetições de sua unidade repetitiva, demonstrou grande potencial de aplicação nos estudos genético-populacionais desta espécie. Resultados similares

também foram obtidos por Garcia & Alcivar-Warrem (2007) em *L. vannamei*.

No presente trabalho não foi encontrada nenhuma região PVS1, provavelmente devido ao uso da enzima *Bst*UI, a qual não reconhece sítios que flanqueiam esta repetição. Cruz *et al.*, (2002), propõem que bibliotecas genômicas construídas para *L. vannamei* utilizem enzimas de restrições que não reconheçam nenhuma seqüência em PVS1, pois a presença abundante desta região no genoma de peneídeos, em especial, desta espécie acaba reduzindo significativamente a caracterização de novos microssatélites que não contenham em sua composição a unidade CCTAA.

Além disso, a utilização de sondas específicas, como dinucleotídicas CT e/ou tetranucleotídicas CCTAA, obviamente, pode facilitar a captura preferencial de SSRs PVS1, o que diminui significativamente a probabilidade de clonagem de fragmentos contendo locos microssatélites que possuam ambas as regiões flanqueadoras. Além disso, o fato do genoma de peneídeos possuir relativa abundância de locos dinucleotídeos perfeitos, com um alto número de repetições da região motif, também justifica a escolha adequada das sondas que serão utilizadas para enriquecer as respectivas bibliotecas (Xu *et al.* 1999).

No presente trabalho, a construção de uma biblioteca genômica para *L. vannamei* com fragmentos compreendidos entre 400 e 1200 pb, enriquecidos com sondas tetranucleotídicas de seqüências variadas permitiu a identificação de 63 microssatélites, sendo que aproximadamente 50% possuíam regiões flanqueadoras com *motifs* variados permitindo o delineamento de 31 pares de *primers*

Apesar de microssatélites relativamente extensos também terem sido encontrados aqui neste trabalho, foi possível delinear pares de *primers* para cerca de 50% dos locos identificados. Esta percentagem parece ser superior quando comparada aos resultados encontrados por Cruz *et al.* (2002), por exemplo, mas inferior aos 74% encontrados por

Meeham *et al.* (2003) para *L. vannamei* e aos 87% encontrado por Xu *et al.* (1999) para *P. monodon*.

Se formos comparar, no entanto, o rendimento final de locos SSRs considerando um mínimo de 5 repetições para di- e 6 repetições para tri-, tetra- e penta-, os dados apresentados aqui se mostram extremamente satisfatórios. No trabalho realizado por Cruz *et al.* (2002), por exemplo, do total de locos testados, apenas cinco eram polimórficos, evidenciando um rendimento final de 5,5% de validação para locos SSRs similares aos aqui identificados. Os autores ainda relataram que, pelo menos metade dos clones seqüenciados, possuíam microssatélites muito extensos ou próximos da inserção do plasmídeo ou ao lado da região PVS1, inviabilizando o delineamento de *primers* flanqueadores.

No presente trabalho foram seqüenciados 192 clones recombinantes, sendo que deste total 33% continham SSRs e 50% destes apresentaram ambas as regiões flanqueadoras. E ainda, dos 22 locos testados, 10 locos foram polimórficos, apresentando um rendimento cerca de 10 vezes maior a aquele verificado por Cruz *et al.* (2002).

Mais recentemente, um estudo realizado por Garcia & Alcivar-Warrem (2007), também isolando microssatélites para *L. vannamei*, obteve 134 (9,5%) clones positivos depois de hibridizar com sondas di- e trinucleotídicas. Deste total, 128 clones foram seqüenciados, sendo que 83 destes, ou seja, aproximadamente 64%, continham microssatélites com 3 ou mais repetições, três (2%) não continham e 42 (aproximadamente 33%) eram redundantes. Cinquenta e nove (17,3%) microssatélites encontrados possuíam uma única região flanqueadora. Mesmo assim foi possível a construção de 173 pares de *primers* para 340 locos encontrados, sendo que 150 locos microssatélites apresentaram-se polimórficos, evidenciando um rendimento de 86%, ou seja, superior ao aqui encontrado e extremamente alto quando comparado a outros estudos relatados na literatura.

Em 2006, Zhi-Ying *et al.* seqüenciaram 168 clones positivos de uma biblioteca genômica para *L. vannamei* construída com fragmentos

variando de 250 a 1000pb. Neste trabalho 62,5% dos SSRs identificados possuíam regiões flanqueadoras. Do total de 30 locos testados, porém, apenas 12 demonstram-se polimórficos, evidenciando um rendimento final de apenas 25%. Neste mesmo ano, um trabalho realizado por Freitas *et al.* (2007) para prospectar locos microssatélites a partir de fragmentos amplificados via RAPD descreveu oito locos polimórficos, para os 16 pares de *primers* testados, evidenciando um rendimento final de 50%

Em geral, rendimentos de validação semelhantes aos encontrados para *L. vannamei* neste estudo e em outros mencionados, vêm sendo encontrados para maioria das espécies de peneídeos. Entretanto, algumas exceções podem ser observadas. Em 1999, por exemplo, Xu *et al.* em um estudo com *P. monodon* obteve 83 clones positivos para hibridização com sondas, sendo que 49 destes (59%) possuíam 99 locos microssatélites, 56 com ambas regiões flanqueadoras. Ao todo 11 pares de *primers* foram analisados e 10 mostraram-se polimórficos, tendo um rendimento final de validação excelente, próximo a 100%.

Além de aspectos metodológicos, eficiência de validação e natureza polimórfica dos locos caracterizados, outra questão que se deve levar em consideração na prospecção de locos microssatélites é o número de alelos e os valores de heterozigidade estimados para as populações amostradas. Muitos estudos utilizam estoques cativos para realizar a validação populacional, o que, dependendo das características da amostra, pode refletir em baixa diversidade genética e heterozigose observada. Desta forma, aspectos relacionados à composição amostral devem ser considerados nestes estudos (Freitas, comunicação pessoal). No presente trabalho, optamos por estabelecer uma estratégia de composição artificial da população amostrada, com o objetivo de minimizar possíveis efeitos de manejo das populações cativas, decorrente de endocruzamento e baixo número de reprodutores, ocasionando a redução da variabilidade genética da população amostrada e conseqüentemente dos índices estatísticos mensurados em um estudo de validação. Esta estratégia parece ser consensual para estudos que não possuem populações nativas disponíveis

para serem amostrada, mostrando-se eficiente para caracterização de locos polimórficos que sirvam para serem utilizados em estudos futuros de caracterização da estrutura genética de outras populações.

Neste trabalho, foram identificados locos SSRs que apresentaram variações no número de alelos entre 2 e 20, com uma média observada em torno de 8,7 alelos por loco. Estes valores são próximos aos encontrados em outros estudos com *L. vannamei*, como de 7,4 alelos por loco (Cruz *et al.* 2002); 5,6 alelos por loco (Freitas *et al.* 2006) e 11,25 alelos por loco (Zhi-Ying *et al.* 2006) e outras espécies, incluindo populações naturais, como *P. monodon* com 9,5 alelos por loco (Xu *et al.* 1999); e *F. brasiliensis*, *R. constrictus* e *X. kroyeri* com 11,0; 4,0 e 6,25 alelos por loco, respectivamente (De Francisco *et al.* 2008).

A heterozigosidade observada na população aqui analisada variou de 0,17 a 0,88 com heterozigosidade média de 0,56. Em *L. vannamei* Freitas *et al.* (2006) encontrou heterozigosidade observada variando de 0,20 a 0,73 com média de 0,36; Cruz *et al.* (2002) encontrou valores variando de 0,06 a 0,53 com média de 0,36. Para a *P. monodon*, a heterozigosidade observada variou de 0,4 a 0,9 (Pan *et al.*, 2004), para *F. brasiliensis*, variou de 0,30 a 0,69 com média 0,44, para *R. constrictus* a heterozigosidade observada foi 0,14 a 0,53 com média de 0,28 e para *X. kroyeri*, 0,19 a 0,56 com média de 0,36 (De Francisco *et al.*, 2008). Tais valores parecem possuir uma amplitude de variação significativa entre os diversos estudos realizados, provavelmente, decorrente de características inerentes à amostra tomada para análise e a estrutura de cada população.

No presente trabalho, quatro dos 10 locos polimórficos descritos apresentaram desvios do Equilíbrio de HW, com três e um loco, respectivamente, com déficit e excesso significativo de heterozigotos. Como esperado, tais desvios podem ser devido a fatores inerentes a estratégia de amostragem e tamanho amostral, onde indivíduos pertencentes a diferentes estoques foram considerados, (os quais podem apresentar analogamente a populações naturais, efeito similar ao de Wahlund). Tal aspecto influencia diretamente nos possíveis desvios

observados para testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg efetuados nos testes de validação, os quais comumente evidenciam excesso e/ou déficits de heterozigotos. Porém, a presença de alelos nulos e erros de genotipagem também não podem ser descartados.

Como abordagem complementar à prospecção e caracterização de locos polimórficos para *L. vannamei*, este estudo também incluiu a realização de testes de cross-species-amplificação em cinco outras espécies de camarões peneídeos nativas à costa do Brasil. Tal abordagem deve-se ao fato, do grande esforço despendido para prospectar microsatélites para o genoma de uma espécie e da relativa falta de abundância de locos descritos para as nossas espécies. Obviamente que a caracterização de locos espécie-específicos é essencial para os estudos genético-populacionais, uma vez que grande parte dos locos microsatélites presente em regiões arbitrárias do genoma de muitas espécies relacionadas não se encontra conservada, devido ao fato dos microsatélites apresentarem uma taxa de substituição de nucleotídeos extremamente alta nestas regiões não codantes (Zane *et al.* 2002)

Entretanto, muitas vezes tais locos podem possuir organização e comportamento correlato entre o genoma de algumas espécies próximas se constituindo numa excelente alternativa para descrição de um loco polimórfico em um maior número de espécies, compensando o relativo alto custo que em geral envolve a prospecção desses marcadores (Zane *et al.* 2002; Barbará *et al.* 2007).

Em camarões, a estratégia de transferência de locos heterólogos entre as diversas espécies de peneídeos têm sido uma estratégia usual considerada por muitos pesquisadores. Muitos trabalhos estão demonstrando que a transferabilidade desses locos, de regiões não expressas, entre algumas espécies relacionadas é possível (De Francisco *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 1999; Ball *et al.* 1998), apesar de ser significativamente superior em se tratando de locos SSRs presente em regiões codificantes (Wang *et al.* 2005, Pérez *et al.*, 2005, Freitas *et al.* dados não publicados).

Neste trabalho, os testes de cross-species amplification, demonstraram que muitos dos locos aqui caracterizados podem também ser utilizados em algumas espécies nativas, sob mesmas condições de amplificação estabelecidas para *L. vannamei*. Obviamente que ajustes metodológicos e mais testes poderão ser realizados visando-se otimizar a obtenção de padrões de amplificação satisfatórios para estes e outros locos nessas e em outras espécies de interesse. Para isso, deve-se avaliar o comportamento polimórfico marcas em um maior tamanho amostral.

Independente da estratégia metodológica adotada, na última década, muitos autores têm isolado locos microssatélites para o genoma de diferentes espécies de camarões marinhos, principalmente devido à necessidade crescente de caracterizar a estrutura genética de diversas populações cativas e selvagens. A realização de todos estes estudos tem possibilitado, além da descrição de marcas eficientes para os estudos genético-populacional dessas espécies, o intercâmbio de informações sobre a estrutura de locos microssatélites no genoma de peneídeos, contribuindo, obviamente, para otimização de métodos que visem à prospecção futura de novos locos, mas também para o melhor entendimento do comportamento e organização dessas seqüências no genoma deste importante grupo animal.

## **CAPÍTULO II**

### **ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM DUAS FAMILIAS DE *Litopenaeus vannamei***

# 1. MATERIAL E MÉTODOS

## 1.1 Obtenção das famílias

Duas famílias segregantes F2 nomeadas de Grupo Genético 1 (G1) e Grupo Genético 2 (G2) foram obtidas a partir do cruzamento de linhagens de *L. vannamei* selecionadas para características divergentes. Essas famílias foram mantidas no Núcleo de Genética do Laboratório de Larvicultura Aquatec, localizado em Barra do Cunhaú, município de Ganguaretama, estado do Rio Grande do Norte. Três linhagens foram utilizadas nos cruzamentos para obtenção das famílias G1 e G2:

**Linhagem pura Panamá:** foi montada a partir de reprodutores selvagens importados em 1997 do Panamá. Essa linhagem apresentou boa adaptação às condições de cultivo no Brasil, demonstrando resistência a doenças bacterianas e viróticas e apresentava-se na F7 no momento do cruzamento.

**Linhagem pura Venezuela:** foi montada a partir de reprodutores importados em 1997 da Venezuela na F15. Estes animais possuíam um crescimento maior do que os de outras linhagens, porém, eram menos resistentes a doenças e encontravam-se na geração F22 no momento do cruzamento.

**Linhagem pura Equador:** foi montada a partir de náuplios e pós-larvas selvagens importadas em 1998 do Equador. Esta linhagem apresentou-se menos adaptada as condições de cultivo no Brasil, os animais eram menores e menos resistentes a doenças e apresentavam-se na geração F8 no momento do cruzamento.

Para a obtenção da família Grupo Genético 1 (G1) foi realizado o cruzamento entre as linhagens Panamá e Venezuela que se encontravam nas gerações F7 e F22, respectivamente. Já a família Grupo Genético 2 (G2) foi gerada a partir das linhagens Panamá e Equador, sendo que este

último encontrava-se na geração F8. Os cruzamentos foram realizados no setor de desova do Núcleo de Genética da Aquatec utilizando o método de inseminação artificial manual, onde o casal de reprodutores de cada família foi selecionado, e colocado, em tanques distintos, com as fêmeas abladas e inseminadas manualmente com o espermatozóide do macho específico selecionado.

Após 12 horas da inseminação ocorreu a eclosão dos ovos e liberando os náuplios, estes foram transferidos, no dia seguinte, para o setor de Larvicultura permanecendo 35 dias até atingirem a idade de pós-larvas. Nesta fase as PLs foram remanejadas para tanques no setor de crescimento até alcançarem o peso de 2g. Nesta fase, cada indivíduo foi marcado com elastômero para distinção da família a qual pertencia e em seguida foi colocado em um único tanque de engorda, permanecendo neste por 60 dias até atingirem o peso de 15g.

Após atingirem cerca de 15g, os indivíduos foram retirados dos tanques de engorda e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, cerca de 1g de tecido muscular foi retirado de cada camarão e conservada em tubo plástico tipo eppendorf de 2ml, contendo 0,1M de EDTA e etanol absoluto. Todos os tubos foram mantidos à  $-20^{\circ}\text{C}$  até seu transporte para o Laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética, Universidade Federal de São Carlos, SP. As amostras foram mantidas em freezer até a extração de DNA que foi realizada seguindo-se o protocolo de extração de DNA com tampão salino, proposto por Aljanabi e Martinez (1997), como descrito em detalhes no capítulo 1.

## **1.2 Amplificação dos locos e análises estatísticas**

Os locos SSRs caracterizados como polimórficos após a validação populacional em exemplares de *L. vannamei* foram utilizados para análise das duas famílias de referência G1 e G2. Primeiramente foram realizadas amplificações em 20 animais (10 de G1 e 10 de G2) utilizando-se as

mesmas condições de amplificação estabelecidas na validação populacional inicialmente já descrita. Apenas os locos que demonstraram ser polimórficos em ambas as famílias já em gel de agarose 2%, foram amplificados em um maior número amostral e posteriormente submetidos à genotipagem no setor de genotipagem DNA Consult, São Carlos, SP.

As análises estatísticas dos locos genotipados foram realizadas utilizando-se o *software* Genepop v. 3.4 (Raymond & Rousset 1995). Foram determinadas as frequências alélicas e genotípicas, o número de heterozigotos e homozigotos esperados e observados e desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O *software* Popgene, versão 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) também foi utilizado a fim de determinar o grau de polimorfismo dos locos caracterizados e os índices de diversidade (Nei, 1973), distância (Nei, 1972) e identidade (Nei, 1978) genética de Nei. Além desta análise, foram feitos testes para se verificar a possível presença de alelos nulos, erros de genotipagem e *stutters* utilizando-se o *software* Micro Checker (Oosterhout *et al.* 2004), disponível na website <http://www.microchecker.hull.ac.uk/>. Correções seqüenciais de Bonferroni foram realizadas para testar a significância dos resultados obtidos (Rice, 1989).

## 2. RESULTADOS

### 2.1 Análise da diversidade genética em duas famílias de *L. vannamei*

Dos dez locos polimórficos utilizados para a análise da diversidade genética das famílias G1 e G2, somente três locos (H07, D09 e C07) não se apresentaram polimórficos no teste inicial utilizando 10 indivíduos pertencentes a cada uma das famílias. Os sete locos restantes (D11, F05, C08, D03, E07, B07 e G10) apresentaram-se polimórficos em ambas as famílias, sendo portanto considerados nas análises posteriores.

A análise realizada na família G1 revelou um número de alelos variando de 2 a 4, sendo que três dos sete locos considerados apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, evidenciando déficit de heterozigotos significativos ( $p < 0,007$ ) para os locos D11, F05 e D03. Os valores de heterozigosidade observada variaram de 0,14 para o loco D11 a 0,76 para o loco C08, sendo observada uma média de 0,49 para esta população (Tabela 5).

Na família G2 o número de alelos também variou de 2 a 4, sendo que os valores de heterozigosidade observada variaram de 0,16 (F05) a 0,81 (E07). Dois locos apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que o loco C08 apresentou déficit de heterozigotos e o loco E07 excesso de heterozigotos (Tabela 6), fato não observado na família G1. A heterozigosidade média determinada para a população G2 foi 0,53, valor próximo ao observado na população G1.

Tabela 5: Relação dos locos SSRs-beads que apresentaram polimorfismo em G1, descrevendo o motif do microsatélite, o número de alelos observados (Na), a amplitude de variação dos alelos, os níveis de heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) e os significância encontrada para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) calculados utilizando-se o programa Genepop, versão 3.4 ( $p < 0,007$ ).

Loco	Motif	T. anelamento (°C)	Número de alelos	Alelos	He	Ho
D11	(ACAG)5..(CAGG)5	49,5	4	212-242	0,62	0,14 <sup>-</sup>
F05	(TTCTT)5..(CT)10	50	4	220-285	0,66	0,33 <sup>-</sup>
C08	(ACAG)5..(CAGA)6	51	4	259-295	0,7	0,76
D03	(GA)12..(G)11	53	4	254-284	0,69	0,50 <sup>-</sup>
E07	(GA)8..(GA)8	53	3	250-276	0,5	0,70
B07	(AGAC)5	53	2	123-131	0,49	0,44
G10	(TC)6..(CT)6..(TC)7	49,5	3	214-224	0,63	0,58

(-) déficit de heterozigotos ; (\*) excesso de heterozigotos

Tabela 6: Relação dos locos SSRs-beads que apresentaram polimorfismo em G2, descrevendo o motif do microsatélite, o número de alelos observados (Na), a amplitude de variação dos alelos, os níveis de heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) e os significância encontrada para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) calculados utilizando-se o programa Genepop, versão 3.4 ( $p < 0,007$ ).

Loco	Motif	T. anelamento (°C)	Número de alelos	Alelos	He	Ho
D11	(ACAG)5..(CAGG)5	49,5	3	180-204	0,65	0,66
F05	(TTCTT)5..(CT)10	50	3	220-253	0,2	0,16
C08	(ACAG)5..(CAGA)6	51	4	259-295	0,63	-0,51
D03	(GA)12..(G)11	53	4	254-284	0,46	0,54
E07	(GA)8..(GA)8	53	3	250-276	0,53	*0,81
B07	(AGAC)5	53	2	123-131	0,48	0,54
G10	(TC)6..(CT)6..(TC)7	49,5	3	214-224	0,53	0,55

(-) déficit de heterozigotos; (\*) excesso de heterozigotos

De acordo com as análises realizadas no programa Genepop, nenhum dos locos apresentou desequilíbrio de ligação para ambas as famílias.

O número de alelos efetivos e as heterozigosidades esperadas e observadas também foram estimadas, através da utilização programa Popgene, para a família G1 e G2 e estão listados nas tabelas 7 e 8 respectivamente.

Tabela 7: Tamanho amostral, número de alelos encontrados (Na), numero de alelos efetivos (NE) e heterozigosidades esperadas (He) e observadas (Ho) para cada loco encontrados para a família G1 pelo programa Popgene ( $p < 0,007$ )

Loco	Tamanho amostral	Na	NE	He	Ho
D11	39	4	2,59	0,623	0,128
F05	30	4	2,88	0,663	0,333
C08	43	4	3,24	0,700	0,767
D03	53	4	3,21	0,695	0,509
E07	20	3	1,98	0,500	0,700
B07	25	2	1,95	0,497	0,440
G10	43	3	2,68	0,634	0,581

Os índices de distância (Nei, 1972) e identidade genética (Nei, 1978) calculados usando o programa Popgene evidenciaram relativa similaridade genética entre estas duas famílias (tabela 9).

Houve uma ligeira divergência entre as frequências dos alelos encontradas para cada loco em ambas as famílias, sendo encontrados alelos comuns, alelos raros e alelos exclusivos (tabela 10 e 11).

Os índices de diversidade genética de Nei (1973) calculados para as duas famílias evidenciaram uma média de 0,61 para a família G1 com desvio padrão de 0,084, e 0,50 para a família G2 com desvio padrão de 0,138.

Tabela 8: Tamanho amostral, número de alelos encontrados (Na), número de alelos efetivos (NE) e heterozigosidades esperadas (He) e observadas (Ho) para cada loco encontrados para a família G2 pelo programa Poppene ( $p < 0,007$ )

Loco	Tamanho amostral	Na	NE	He	Ho
D11	57	3	2,79	0,647	0,667
F05	24	3	1,29	0,230	0,166
C08	43	4	2,69	0,636	0,511
D03	48	4	1,84	0,463	0,541
E07	53	3	2,1	0,531	0,810
B07	24	2	1,91	0,488	0,540
G10	60	3	2,12	0,533	0,550

Tabela 9: Índices de identidade genética (diagonal acima) e distancia genética (diagonal abaixo) entre as duas famílias, G1 e G2, de *L. vannamei* analisados pelo programa Poppene

Famílias	G1	G2
G1	****	0,6545
G2	0,4239	****

Tabela 10: Freqüências observadas de cada alelo dos locos amplificados na família G1 calculadas pelo programa Popgene e a classificação em alelos raros, comuns ou exclusivos.

Loco	Alelo (pb)	Freqüência
D11	232	0,2692+
	212	0,5385+
	242	0,0513+
	228	0,1410+
F05	220	0,0833*
	253	0,5000*
	285	0,1667+
	277	0,2500+
C08	259	0,3953*
	263	0,1977*
	271	0,3256*
	295	0,0814*
D03	280	0,4623*
	284	0,1981*
	276	0,1887+
	254	0,1509*
E07	250	0,6500*
	266	0,2750*
	276	0,0750*
B07	123	0,5800*
	131	0,4200*
G10	216	0,3488*
	214	0,4651*
	224	0,1860*

(\*) alelos comuns; (+) alelos exclusivos; (-) alelos raros

Tabela 11: Freqüências observadas de cada alelo dos locos amplificados na família G2 calculadas pelo programa Popgene e a classificação em alelos raros, comuns ou exclusivos.

loco	alelo (pb)	Freqüência
D11	180	0,4298+
	184	0,2105+
	204	0,3596+
F05	253	0,8750*
	220	0,0833*
	249	0,0417+
C08	259	0,1744*
	263	0,2791*
	271	0,5116*
	295	0,0349*
D03	280	0,7083*
	284	0,1354*
	264	0,1458+
	254	0,0104*
E07	250	0,4615*
	266	0,0288*
	276	0,5096*
B07	123	0,6042*
	131	0,3958*
G10	216	0,5167*
	214	0,4500*
	224	0,0333*

(\*) alelos comuns; (+) alelos exclusivos; (-) alelos raros

### 2.3 Análise de presença de *stutteres* e/ou *dropout* e de alelos nulos em duas famílias de *L. vannamei*.

Os dados obtidos para avaliar a diversidade genética para as famílias G1 e G2 foram analisadas no Micro Checker para verificar possíveis evidências de alelos nulos e erros de genotipagem para os sete locos considerados. As estimativas de porcentagens de alelos nulos foram feitas utilizando-se diferentes métodos de estimativas, disponíveis no programa.

Na família G1, três dos sete locos analisados sugeriram a possível presença de alelos nulos (mesmo após correção de Bonferroni) (Tabela 12). Neste caso, todas as frequências alélicas para os supostos locos com presença de alelos nulos foram redefinidas utilizando-se cada um dos parâmetros considerados para análise de alelos nulos (Tabela 13).

Para a Família G2, no entanto, nenhum dos locos analisados evidenciou valores significativos para a presença de alelos nulos, não sendo, portanto, neste caso, recalculadas as frequências alélicas corrigidas (Tabela 14).

Tabela 12: Listagem dos resultados de estimativas de porcentagens dadas pelo programa micro-cheker para a família G1 comparando com outros três métodos de cálculos e evidenciando a presença ou ausência significativas de alelos nulos.

<b>Loco</b>	<b>Alelos nulos</b>	<b>Oosterhout</b>	<b>Chakraborty</b>	<b>Brookfield 1</b>	<b>Brookfield 2</b>
D11	Presente	0,3631	0,6550	0,3014	0,6426
F05	Presente	0,2374	0,3239	0,1933	0,7144
C08	Ausente	-0,0635	-0,0517	-0,0446	0,3548
D03	Presente	0,1272	0,1496	0,1061	0,2435
E07	Ausente	-0,4072	-0,1703	-0,1362	0,7535
B07	Ausente	0,0472	0,0509	0,0317	0,7321
G10	Ausente	0,0499	0,0380	0,0282	0,4157

Tabela 14: Listagem dos resultados de estimativas de porcentagens dadas pelo programa micro-checker para a família G2 comparando com outros três métodos de cálculos e evidenciando a presença ou ausência significativas de alelos nulos.

<b>Loco</b>	<b>Alelos nulos</b>	<b>Oosterhout</b>	<b>Chakraborty</b>	<b>Brookfield 1</b>	<b>Brookfield 2</b>
D11	Ausencia	-0,0057	-0,0135	-0,0107	0,2403
F05	Ausencia	0,0970	0,1504	0,0482	0,7985
C08	Ausencia	0,0885	0,1027	0,0719	0,5374
D03	Ausencia	-0,1583	-0,0831	-0,0570	0,4136
E07	Ausencia	-0,3288	-0,2134	-0,1870	0,2426
B07	Ausencia	-0,0691	-0,0621	-0,0429	0,7673
G10	Ausencia	-0,0207	-0,0190	-0,0134	0,1928

Tabela 13: Novas frequências alélicas calculadas pelo programa micro-checker para três locos com alelos nulos na família G1 comparando com tres outros metodos.

**Loco D11**

<b>Alelos</b>	<b>Freq. observada</b>	<b>Oosterhout</b>	<b>Chakraborty</b>	<b>Brookfield 1</b>	<b>Brookfield 2</b>
212	0,5385	0,3206	0,1858	0,3761	0,1925
228	0,0513	0,0527	0,0177	0,0358	0,0183
232	0,2692	0,1835	0,0929	0,1881	0,0962
242	0,141	0,0801	0,0487	0,0985	0,0504

**Loco F05**

<b>Alelos</b>	<b>Freq. observada</b>	<b>Oosterhout</b>	<b>Chakraborty</b>	<b>Brookfield 1</b>	<b>Brookfield 2</b>
220	0,0833	0,0871	0,0563	0,0672	0,0238
253	0,5000	0,3675	0,3380	0,4034	0,1428
277	0,2500	0,1835	0,1690	0,2017	0,0714
285	0,1667	0,1244	0,1127	0,1345	0,0476

**Loco D03**

<b>Alelos</b>	<b>Freq. Observada</b>	<b>Oosterhout</b>	<b>Chakraborty</b>	<b>Brookfield 1</b>	<b>Brookfield 2</b>
254	0,1509	0,0889	0,1284	0,1349	0,1142
276	0,1887	0,1874	0,1605	0,1687	0,1427
280	0,4623	0,3857	0,3931	0,4132	0,3497
284	0,1981	0,2109	0,1685	0,1771	0,1499

### 3. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado que a manutenção de linhagens fechadas, sem a introdução de novos pools gênicos para manutenção dos plantéis reprodutores, conduz a uma perda progressiva da variabilidade genética ao longo das gerações, decorrente do aumento na taxa de endocruzamentos e conseqüentes níveis de consangüinidade nos estoques cativos (Freitas & Galetti., 2002; 2005; Freitas *et al*, 2007). Entretanto, os dados obtidos no presente trabalho, demonstram que o cruzamento entre linhagens divergentes pode favorecer um incremento de variabilidade genética em populações consangüíneas, contribuindo para a manutenção do potencial adaptativo desses estoques.

Neste trabalho, as populações G1 e G2 avaliadas foram originadas a partir de um exocruzamento realizado entre parentais de diferentes linhagens fechadas, que apresentavam características de performance bem diferenciadas (Gonçalves, comunicação pessoal). Além disso, tais linhagens apresentavam origens e gerações também distintas (Venezuela em F22, Panamá em F07 e Equador em F08), o que em geral costuma refletir em uma maior distância genética e em níveis de diversidade genética também divergentes.

Um estudo anterior realizado em dois destes plantéis (Venezuela e Panamá), utilizando marcadores moleculares de VNTRs, evidenciou níveis de diversidade e similaridade genética diferenciados para estes dois estoques, sendo que o plantel da Venezuela (que na época estava em F17) apresentou valores de similaridade próximos a 0,91 e Panamá (em F3) próximos a 0,53. Neste estudo, ficou evidenciada uma significativa menor variabilidade genética para o estoque F17 em relação ao estoque F3, cuja freqüência de locos polimórficos variou, respectivamente de 0,11 a 0,44 e 0,67 a 1,0 para estes dois plantéis (Freitas & Galetti 2002).

Posteriormente, um estudo realizado por Freitas & Galetti (2005), também na espécie *L. vannamei*, utilizando marcadores de RAPD,

evidenciou uma perda progressiva nos níveis de variabilidade genética ao longo de cinco gerações com uma diferença significativa entre as gerações F5 (0,27) e F9 (0,22).

Wolfus *et al.* (1997), estudando a diversidade genética de diferentes estoques cativos de *L. vannamei* com apenas um loco de microssatélite, estimou níveis diferenciados para estas populações, sendo determinados valores de heterozigosidade observada iguais a 0,45 para a geração F7, variando de 0,96 a 1,00 para gerações F1 e 0,97 para geração F3. O número de alelos também foi superior em gerações menos avançadas (6 a 23 alelos/loco) que a F7 (2 a 4 alelos/loco).

No presente trabalho os níveis de diversidade genética observados para as famílias analisadas, evidenciaram a presença de relativo polimorfismo para os locos considerados, sendo possível observar a presença de até quatro alelos para alguns locos, valor este considerado máximo para as amostras aqui analisadas, uma vez que cada família se originou do cruzamento entre um macho e uma fêmea e, por tanto, partindo deste pressuposto, caso os parentais fossem heterozigotos e portassem alelos diferentes, seria possível se encontrar um máximo de somente quatro alelos diferente para cada loco considerado. Para locos que apresentaram a presença de 2 e/ou 3 alelos, podemos supor que ou os parentais eram homozigóticos para alelos diferentes, ou eram heterozigóticos para alelos iguais ou ainda que ocorriam ambas as situações. Entretanto, tal afirmação só poderia ser confirmada caso pudessemos analisar também os genótipos dos parentais, fato que não foi possível devido a indisponibilidade de amostras de DNA dos parentais para este estudo.

A presença de alelos nulos, também poderia conduzir a detecção de um menor número de alelos. Em um estudo realizado por Wolfus *et al.* (1997), em famílias cultivadas de *L. vannamei*, a análise de diferentes famílias evidenciou que alguns descendentes possuíam alelos ou apenas maternos ou apenas paternos e muitas vezes não possuíam nenhum dos alelos dos parentais, levando os autores a suporem que os parentais não

eram homozigotos para tal loco e, provavelmente, alelos nulos estavam ocorrendo nesta análise.

Apesar da relativa diversidade máxima de alelos encontrada nestas populações, alguns dos locos testados apresentaram-se monomórficos em ambas as famílias (H07, D09 e C07), apesar destes terem, inicialmente, se mostrado polimórficos na validação realizada em estudo anterior, considerando uma população composta por diferentes exemplares de *L. vannamei*, pertencentes a vários estoques. Sendo assim, dos 10 locos aqui analisados, apenas sete se mostraram úteis para análise de diversidade genética nas famílias G1 e G2, provavelmente, devido à origem destas famílias (cada uma descendente de um único casal).

Os valores de heterozigosidade média observada para as famílias não apresentaram divergências estatísticas significativas nem entre as famílias nem entre os resultados obtidos através da utilização de ambos os programas utilizados neste estudo. A heterozigosidade observada para as famílias G1 e G2 utilizando o *software Genepop v. 3.4* (Raymond & Rousset, 1995) variou de 0,14 a 0,76 e 0,16 a 0,81, respectivamente, sendo observada uma média de 0,49 para família G1 e 0,53 para família G2. Com o *software Popgene v. 1.31* (Yeh *et al.*, 1999), os resultados encontrados para heterozigosidade observada foram de 0,12 a 0,70 pra G1, com média de 0,49 e de 0,16 a 0,80 pra G2, com média de 0,54. A ligeira diferença entre as duas análises, provavelmente, decorre de arredondamentos intrínsecos dos dois *softwares* (Yeh *et al.*, 1999; Raymond & Rousset 1995), os quais, neste caso, não foram estatisticamente significantes.

Os valores de heterozigosidades e diversidade alélica observados para G1 e G2 parecem supor que o exocruzamento realizado para a formação dessas famílias teve um efeito positivo sobre a diversidade genética dessas populações. Em um estudo similar, realizado por Xu *et al.* (2001), utilizando seis locos microssatélites em quatro populações selvagens e duas cativas de *P. monodon*, os valores de heterozigosidade observadas variaram suas médias de 0,74 a 0,79 para as populações

selvagens e de 0,74 a 0,79, não apresentando diferenças entre as duas amostragens. Apesar de neste trabalho, os autores terem utilizado famílias formadas através do cruzamento entre linhagens na F2 e F3 e na F1 e F2, as quais estavam em gerações substancialmente menos endogâmicas que as utilizadas no presente estudo (F22 x F07 e F08 x F07), evidenciando, portanto, valores de heterozigosidades médias superiores aos aqui encontrados, este estudo demonstra também um possível efeito benéfico do exocruzamento sobre a diversidade genética de linhagens endogâmicas, as quais apresentaram valores de heterozigose iguais aos de populações selvagens.

Apesar de estes dados indicarem uma aparente "melhoria" na variabilidade genética de estoques cativos, obviamente, não devemos desconsiderar possíveis erros amostrais e artefatos da técnica. Em um estudo utilizando cinco locos microssatélites em quatro populações selvagens de *L. vannamei*, por exemplo, Valles-Jimenes *et al.* (2005), encontraram valores de heterozigosidade observada variando de 0,164 a 0,535 com médias entre 0,241 a 0,388, ou seja, inferiores aos aqui encontrados para esta mesma espécie. Em outro estudo, Luvesuto *et al.* (2007) utilizando quatro locos microssatélites para estudar a variação genética em três gerações (F5, F6 e F7) de *L. vannamei* de uma linhagem fechada encontrou uma variação de heterozigosidade observada entre 0,25 a 0,85 com médias variando de 0,37 a 0,67, valores esses mais próximos aos encontrados aqui neste estudo.

Quando analisamos a variabilidade entre as duas famílias encontramos uma identidade genética de 0,65 e uma distância genética de 0,42 o que sugere uma similaridade genética relativamente alta entre G1 e G2, uma vez que as linhagens que originaram tais famílias possuíam característica de performance e origens divergentes. Tais valores obviamente devem estar relacionados ao fato de um dos parentais de ambas as famílias ter origem comum, uma vez que pertenciam a mesma linhagem do Panamá. Entretanto, a frequência de alelos comuns nas duas famílias, em sua maioria, foi diferente. A família G1 apresentou um maior

valor de alelos por locos (3,42), maior número de alelos exclusivos (7) e maior valor médio de número de alelos efetivos (2,65), quando comparado com a família G2 que mostrou 3,14; 5 e 2,10, respectivamente.

O índice de diversidade genética de Nei (1973) foi de 0,61 para G1 e 0,50 para G2, entretanto estas diferenças não foram estatisticamente significativas (test-t). Se considerarmos a origem dessas famílias, no entanto, G1 (F22 x F7) e G2 (F8 x F7) podemos inferir que a introdução de um novo *pool* gênico, no caso, de animais em F7, realizado para a formação dessas famílias, pode ter tido um efeito extremamente vantajoso sobre a diversidade genética de ambas as linhagens, em especial da linhagem da Venezuela que se encontrava em uma geração extremamente avançada (F22). Obviamente que esta estratégia deve levar em conta a manutenção da performance dessas linhagens para características de interesse, bem como algum efeito de heterose, ou vigor híbrido, nesses animais.

Dentro deste contexto, e levando-se em conta que o manejo de estoques cativos de camarão em geral ocasiona a perda de diversidade genética com conseqüentes efeitos negativos na produção (Wolfus *et al.*, 1997; Freitas & Galetti 2002; Keys *et al.*, 2004), alternativas de manejo mais eficientes poderão ser estabelecidas com base em estudos da estrutura genética dessas populações e delineamento de cruzamentos dirigidos. Entre tanto não podemos desconsiderar que tais dados estejam refletindo um possível erro amostral ou artefato da técnica.

Poucos estudos utilizando dados moleculares para inferências da estrutura genética de populações costumam quantificar a taxa de eventuais erros de genotipagem. Entretanto, tal fato pode enviesar significativamente os dados obtidos, levando a interpretações equivocadas (Pompanon *et al.*, 2005). Segundo Hoffman & Amos (2005) uma taxa de erro de genotipagem menor que 1% em um estudo de parentesco pode resultar em mais de 20% de possíveis paternidades não atribuídas.

As análises genético-populacionais, em geral, costumam ser realizadas assumindo-se como hipótese nula que as populações são panmíticas e encontram-se em equilíbrio, o que geralmente, não ocorre na maioria dos estudos. Desta forma é natural encontrar desvios significativos no equilíbrio de Hardy–Weinberg. Obviamente que estes desvios podem ser de fato inerentes à estrutura genética das populações. Mas também podem ser devido a artefatos de técnica com não amplificação de alelos específicos. A ausência desses alelos, ditos nulos, é comum em análises que utilizam marcadores microssatélites conduzindo à desvios nos valores de heterozigosidade e diversidade alélica em consequência de erros nas estimativas das frequências alélicas e genotípicas dos indivíduos.

Além da presença de alelos nulos decorrentes de mutações nas regiões flanquadoras dos locos, outros dois fatores devem ser levados em consideração nas análises genético-populacionais. Um deles refere-se à presença de *large allele dropout* ou apenas *dropout*, que é amplificação preferencial de determinado alelo, em geral, a dominância de amplificação de um alelo pequeno em relação a um alelo grande. Neste caso, um alelo pequeno amplifica muito mais vezes que um alelo grande, fazendo com ocorra erros durante a genotipagem.

Outro fator, não menos importante que os alelos nulos e o *dropout*, são os *stutters*. *Stutters* são picos que ficam adjacentes aos picos de um alelo em um eletroferograma. Quando o alelo difere de outro por apenas uma repetição, esses *stutters* podem encobrir o segundo alelo levando a genotipar um indivíduo heterozigoto como um homozigoto, conduzindo também a erros nas estimativas das frequências alélicas e genotípicas e consequentemente nos índices que avaliam a estrutura genética de uma população.

No presente trabalho, as análises realizadas no programa MicroChecker não indicaram a presença de *droupout* e *stutteres* para nenhuma das duas famílias analisadas. Três locos (D11, F05 e D03), entretanto, indicaram presença de alelos nulos na família G1, com uma

freqüência relativa de 30, 19 e 10%, respectivamente, de acordo com o método de Brookfield 1. Tais locos foram aqueles que apresentaram desvios para o Equilíbrio de HW, quando utilizamos o *software Genepop v. 3.4*, com déficit significativo de heterozigotos. Esses mesmos três locos quando levado em conta as freqüências de alelos nulos e as novas freqüências calculadas pelo *software Micro-checker*, apresentam-se em equilíbrio de HW, portanto. Desta forma, tais desvios podem ser atribuídos a presença de alelos nulos para esta família.

Na família G2, no entanto, apesar de terem sido observados dois locos com desvios no equilíbrio de HW sendo um com déficit (C08) e outro excesso de heterozigotos (B07), não evidenciou a presença de alelos nulos para nenhum dos sete locos, segundo o *software Micro-checker*. Desta forma, a estrutura genética da população ou outros motivos podem estar causando este desequilíbrio.

Erros amostrais e outros erros de genotipagens que não são mensurados na análise no Micro checker, como por exemplo a baixa qualidade e quantidade de DNA e erros humanos, podem também levar a interpretações errôneas. De acordo com uma revisão feita por Pompanon *et al.* (2005), eventuais falhas humanas podem ser responsáveis por cerca 0,2% a 15% dos erros de genotipagem por loco, valor considerado não desprezível.

Alguns autores, por meio de simulações computacionais, tentam fazer aproximações das taxas e conseqüências dos erros de genotipagens (Dakin & Avise, 2004; Hoffman & Amos, 2005). Entretanto, nenhuma bibliografia relata quais parâmetros e métodos estatísticos devem ser considerados para estimar taxas aceitáveis de alelos nulos para marcadores microssatélites em estudos populacionais, ressaltando apenas a importância de efetuar a estimativa dessas taxas e a necessidade de padronização na elucidação e quantificação dos mesmos (Dakin & Avise, 2004; Hoffman & Amos, 2005; Pompanon *et al.* 2005).

Entretanto, há diferentes métodos disponíveis para efetuar esta análise. Quando o programa Micro Checker encontra evidências de alelos

nulos, utilizando o seu *default* (Oosterhout *et al*, 2004), este compara a estimativa das frequências estabelecidas para cada loco com as estimativas das frequências obtidas por outros dois métodos: (1) Chakraborty *et al.* (1992) e (2) Brookfield (1996) para questão de comparação e escolha do método que melhor se adapte aos dados do estudo.

A estimativa de Chakraborty *et al.* (1992) considera que a degradação do DNA é a causa da não amplificação e então desconsidera as mesmas dos cálculos caso a falta de amplificação também ocorra nos outros locos. Para Brookfield (1996) há duas estimativas que o programa compara, a Brookfield 1 e Brookfield 2. A estimativa de Brookfield 1 desconsidera todas as amostras não amplificadas pressupondo que não existem alelos nulos homozigotos e que a falta da amplificação é por degradação do DNA, problemas relacionados a própria PCR ou até mesmo falha humana. A segunda estimativa de Brookfield assume que a falta de amplificação realmente são alelos nulos homozigotos, com isso todas as amostras são consideradas nos cálculos da estimativa.

A evidência de alelos nulos, entretanto, não descarta a história de formação dessas famílias, as quais possuem efeitos de endocruzamento, seleção e deriva. Portanto, apesar de tentarmos avaliar os dados em sua completude, flutuações nas frequências alélicas e genóticas dessas famílias são esperadas e tais fenômenos podem, de fato, modificarem a estrutura genética das populações, conduzindo a desvios reais nos pressupostos ao equilíbrio de HW.

Entretanto o fato de na formação das famílias terem sido realizados exocruzamentos, ou seja, os parentais selecionados eram de linhagens fechadas geneticamente diferentes (Panamá, Venezuela e Paraguai), onde os alelos se encontravam em frequências diferentes, não pode ser desprezado, pois pode ser um dos fatores que pode ter contribuído para que o loco B07 apresentasse desvio no equilíbrio de HW apresentando excesso de heterozigotos e o loco C08 apresentando déficit.

## CONCLUSÕES GERAIS

- A Biblioteca genômica parcial enriquecida mostrou-se eficiente para a identificação de novos microssatélites para esta importante espécie de camarão marinho, sendo identificados 63 novos locos microssatélites, dos quais 22 foram testados e 10 mostraram-se polimórficos, demonstrando seu potencial para uso em estudos futuros de análise da diversidade e estrutura genética de *L. vannamei*.
- Alguns dos locos microssatélites caracterizados como polimórficos em *L. vannamei* também demonstraram ser eficientes para outras espécies de camarões nativas a costa brasileira (*Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Xiphopenaeus kroyeri* e *Rimapenaeus constrictus*), demonstrando seu potencial de transferibilidade e de uso em estudos genético-populacionais de outras espécies de peneídeos.
- A análise das duas famílias de referência, G1 e G2, utilizando os 10 locos microssatélites caracterizados neste trabalho, evidenciou polimorfismo em sete locos, os quais possibilitaram avaliar a estrutura genética destas populações. Tais locos poderão também ser utilizados, juntamente com outros marcadores, na saturação do mapa genético de *L. vannamei* que vem sendo estabelecido a partir da análise dessas famílias.
- Os valores de diversidade e distância genética estimados para as famílias G1 e G2 indicam que a estratégia para formação dessas famílias pode ter um efeito benéfico sobre a estrutura genética destas, as quais evidenciaram níveis de diversidade genética satisfatórios e relativa distância genética a despeito de ambas possuírem um dos parentais de origem comum.

## 10. REFERÊNCIAS

- ABCC, Associação Brasileira de Criadores de Camarão, Histórico da carcinicultura no Brasil disponível em <http://www.abccam.com.br/>  
Acesso em dezembro 2008
- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt- extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25 (22): 4692-4693, (1997).
- ARANA, L.V. Aqüicultura e Desenvolvimento Sustentável: subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura brasileira. Editora da UFSCar, Florianópolis, SC (1999).
- BAGSHAW, J.C.; BUCKHOLT, M.A., A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Gene*, 184: 211–214, (1997).
- BALDWIN, J. D. *et al*, Molecular Phylogeny and Biogeography of the Marine Shrimp *Penaeus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 399-407, (1998).
- BALL, A. O.; LEONARD, S.; CHAPMAN, R. W. Characterization of (GT)<sub>n</sub> from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Molecular Ecology* 7: 1251-1253, (1998).
- BARBARÁ, *et al*. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16: 3759–3767 (1998)
- BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados. Editora Roca, São Paulo, SP. (1984)
- BATALHA, M.O. A Maricultura no Estado de São Paulo. SEBRAE: GEPAL: GEM-AQUÍ. São Paulo, 297p. (2002).
- BIERNE, N. *et al*. Microsatellite associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 184: 203-219, (2000)
- BROOKFIELD, J.F.Y.; A Simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455, (1996).

- BURUKOVSKII, R.N. Key to Shrimps and lobsters. In: Kothekar vs (ed) Russian translation series Copyright, A. A. Balkema, Rotterdam, 174 pp, ( 1985).
- CHAKRABORTY, R. *et al.* Apparente heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implication in forensic applications, *Annals of Human Genetics*. 56: 45-57, (1992).
- CRUZ P.*et al* , Isolation and Characterization of microsatellites in Pacific White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Molecular Ecology* 2:239-241, (2002).
- CRUZ, P. *et al.*. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Biotechnology* 6: 157–164, (2004).
- DAKIN, E.E.; AVISE, J.C.. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93: 504-509, (2004)
- DE FRANCISCO, A. K.; GALETTI Jr, P. M.. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. *Genetics and Molecular Biology*, 28(2): 258-261, (2005).
- DE FRANCISCO, A.K. *et al.* Isolation and Characterization of Microsatellites in Three Overexploited Penaeid Shrimp Species Along the Brazilian Coastline. *Conservation Genetics*, 10:563–566, (2008).
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Brasília: Embrapa-Cenagen, p.220, (1995)
- FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellite in simple organism. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 263: 209-215, 1996.
- FREITAS, P. D.; Estudos de diversidade genética em estoques reprodutoras de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no Brasil. Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, (2003).
- FREITAS, P. D.; CALGARO, M. R.; GALETTI JR., P. M. Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) and its implication

- for the gene pool conservation. *Brazilian Journal of Biology.*, 67(4, Suppl.): 939-943, 2007
- FREITAS, P. D.; GALETTI Jr. P. M. Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *African Journal of Biotechnology*, v. 4 (12) p. 1362-1367, (2005).
- FREITAS, P. D.; GALETTI, Jr, P. M. PCR based VNTR core sequence analysis inferring genetic diversity in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Genetic Molecular Biology*, 25 (4): 431-434, (2002).
- FREITAS, P. D.; JESUS, C. M.; GALETTI Jr. P. M. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in the other penaeid species. *Molecular Ecology Notes*, 7(2): 324-326, (2006).
- FREITAS, P. D.; MARTINS, D. S.; GALETTI JR., P. M. CID (Clipping vectors, Identifying SSR, Design of *primers*): a rapid and efficient bioinformatic tool for the detection of simple sequence repeats (SSRs) from genomic libraries. *Molecular Ecology Resources*, 8: 107-108, (2008).
- GARCIA, D.K.; ALCIVAR-WARREN, A. Characterization of 35 new microsatellite genetic markers for the pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks, tracing pedigree in breeding programs, and linkage mapping. *Journal of Shellfish Research*, 4: 1203-1216, (2007).
- GARCIA, K. D.; DHAR, A. K.; ALCIVAR-WARREN, A. Molecular analysis of RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5(1): 71-83, (1996).
- HAMILTON, M. B. *et al* Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* 27: 500-507, (1999)
- HOFFMAN, J.I.; AMOS, W. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology*, 14: 599- 612, (2005).

- KEYS, S *et al* Comparative growth and survival of inbred and outbred *Penaeus (marsupenaeus) japonicus*, reared under controlled environment conditions: indications of inbreeding depression. *Aquaculture* 241: 151–168, (2004).
- LIU, P. Polymorphic analysis of microsatellite DNA in wild population of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Aquaculture Research*, 37(6): 556-562, (2006).
- LUVESUTO, E.; FREITAS, P.D.; GALETTI JR., P.M. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, 30(4): 1156-1160, (2007).
- MAGALHÃES, M; MARTINEZ, R.A.; GAIOTTO, F.A. Genetic diversity of *Litopenaeus vannamei* cultivated in Bahia State, Brazil *Pesquisa agropecuária brasileira*, 42(8): 1131-1136, (2007).
- MEEHAN, D. *et al*. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea:Decapoda]. *Marine biotechnology* 5:311-330, (2003).
- NAYLOR, R.L. *et al*. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1024, (2000).
- NEI. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106:283-292, (1972).
- NEI. The theory and estimation of genetic distance. In: Morton NE (ed) Genetic structure of populations University of Hawaii, Honolulu, pp 45-54, (1973).
- NEI. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590, (1978).
- NEI. Molecular Evolutionary Genetics Columbia University Press, New York, pp 176-187, (1987).
- OLIVEIRA, J.E. *et al*. Origin, Evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2): 294-307, (2006)
- OOSTERHOUT, C.V *et al*, MICRO-CHECKER: *Software* for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538, (2004).

- PAN, YU-WEN.; *et al.* Isolation and characterization of 23 polymorphic microsatellite markers for diversity and stock analysis in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Molecular Ecology Notes*, 4: 345-347, (2004).
- PÉREZ, F. *et al.* Development of EST-SSR Markers by Data Mining in Three Species of Shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus biridy*. *Marine Biotechnology*. 7: 554–569, (2005).
- PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B.. Penaeoid and sergestoid shrimp and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. Paris, France: Memoires du Musuem National D'Historie Nuturelle, (1997).
- PILLAY, T.V.R The challenges of sustainable aquaculture, *World Aquaculture* 27(2): 7-9, (1996).
- POMPANON, F. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6: 847-859, (2005).
- RANA, K.. Recent trends in a global aquaculture production: 1984-1995. *FAO Aquaculture Newsletter* 16: 14-19, (1997).
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Population genetics *software* for exact tests and ecumenecism. *Journal Heredity* 86: 248-249, (1995).
- RICE, W.R.. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 223–225, (1989).
- SANGER, F.; NICKLEN S.; COULSO; A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467, (1977).
- SCHOLÖTTERER, C. Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? *Dispatch* 8: 132-134, (1998).
- SCHUELKE, M.. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature America Inc.* 18: 233-234, (2000).
- SOFIA, The State Of Woeld Fisheries FAO - Fisheries and Aquaculture Department. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS 2006, Rome (2007)
- SOFIA, The State Of Woeld Fisheries FAO - Fisheries and Aquaculture Department. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS 2008, Rome (2009)

- TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10(7): 967-981, (2000).
- TUPINAMBÁ, S. V.. Criação de camarões degrada manguezais no nordeste. Oitava conferencia das partes da convenção sobre diversidade. Disponível em: <http://www.cdb.gov.br/Membros;carlost/criacao-de-camaroes-degrada-manguezais-no-nordeste>. Acesso em: 12 agosto 2008.
- VALLES-JIMENEZ, R.; CRUZ, P.; PERZ-ENRIQUEZ, R. Population Genetic Struture of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from México to Panamá: Microsatellite DNA Variation. *Marine Biotechnology*, 6: 475-487, (2005).
- WANG, H.; LI, F.; XIANG, J. Polymorphic EST–SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 249: 107– 114, (2005).
- WOLFUS, G. M.; GARCIA, D. K.; ALCIVAR-WARREN A.. Application of microssatélite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152: 36-47, (1997).
- Xu Z, *et al.* Identification and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. *Animal Genetics*, 30: 150–156, (1999).
- XU, Z., PRIMAVERA, J.H., DE LA PENA, L.D., PETTIT, P., BELAK, J., ALCIVAR-WARREN, A., 2000. Genetic diversity of *Penaeus monodon* shrimp in four geographic regions representing different mangrove habitats and shrimp aquaculture systems in the Philippines. In: Alcivar-Warren, A. ŽEd., Proceedings of the Symposium on Aquaculture and Conservation of Marine Shrimp Biodiversity, Tufts University School of Veterinary Medicine, December 10, 1998. In pressXU, Z.; DHAR, A. K.; WYRSKOWSKI, J.; ALCIVAR-WARREN, A. (1999). Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. *Animal Genetics*, 30: 150-156.
- XU, Z. Genetic diversity of wild and culture Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*, 199: 13-40, (2001).
- YEH, F.; YANG, R.; BOYLE, T.. Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, Popgene version 1.31, (1999).

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T.; Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16, (2002).

Zhi-Ying , J. Isolation and characterization of microsatellite markers from pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Molecular Ecology Notes* 6: 1282-1284. (2006)